



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**“Propiedades antibióticas de *Porphyridium
cruentum* y su aplicación en peces”**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Rojo Zentella Ana Patricia

2152027535

Asesora interna:

Dra. María del Carmen Monroy Dosta (28906)

RESUMEN:

Las microalgas han demostrado tener múltiples aplicaciones en la industria biotecnológica. Lípidos, proteínas, polisacáridos, compuestos fenólicos, carotenoides, entre otros bioproductos proveniente de microalgas pueden ser utilizados como fuente de ingredientes para productos funcionales, por lo cual se han utilizado como alternativas de control de enfermedades de origen natural con el fin de limitar el impacto de los antibióticos y la creación de resistencia entre las bacterias. Es por esto que hoy en día surge el interés de probar diversas sustancias o moléculas con actividad antimicrobiana de origen marino, principalmente en los metabolitos secundarios de las microalgas para su aplicación en la industria acuícola. La microalga roja *Porphyridium cruentum* contiene polisacáridos que inhiben la replicación viral. Además, estos polisacáridos promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno. Esta investigación evalúa la actividad y capacidad antimicrobiana de *Porphyridium cruentum* en comparación con dos diferentes antibióticos por medio del método de difusión en placa frente a las bacterias *Vibrio fluviales* y *Enterobacter sp*, patógenas en peces. Dando como resultado una mejor respuesta inhibitoria por parte de la microalga *Porphyridium cruentum* que por parte de los antibióticos Amoxicilina y Tetraciclina en ambas bacterias cultivadas por lo que el uso en la acuicultura de este extracto podría combatir enfermedades presentes en granjas acuícolas y ser una alternativa para el control de enfermedades.

Palabras clave: *Porphyridium cruentum*, inhibición, antibióticos, acuicultura.

INDICE:

INTRODUCCIÓN:	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA:	2
OBJETIVOS:.....	3
General:.....	3
Específicos:	3
METODOLOGIA:.....	3
Cultivo de microalga.	3
Cosecha de microalgas.....	4
Prueba de inhibición por el método de difusión en placa.	4
RESULTADOS:	4
DISCUSION:.....	6
CONCLUSIONES:	7
REFERENCIAS:.....	8

INTRODUCCIÓN:

La producción de organismos por medio de la acuicultura constituye una de las principales fuentes de alimento y trabajo en los países que se dedican a esta actividad. A medida que se han desarrollado sistemas intensivos de producción, la incidencia de enfermedades bacterianas y virales se ha incrementado, debido principalmente a que en estos sistemas se cultivan densidades altas creando condiciones de estrés que favorecen el establecimiento de patógenos oportunistas. Algunos no sólo ocasionan pérdidas económicas, sino igualmente, impactan a poblaciones naturales de organismos acuáticos, así como a la salud humana (Kikenlin *et al.*, 1985).

Existen diferentes tratamientos para el control de enfermedades, pero en la producción acuícola, el tratamiento más practicado es el uso de antibióticos; sin embargo, su uso inadecuado ha creado resistencia entre las bacterias, por lo cual se ha buscado alternativas de control de enfermedades de origen natural con el fin de limitar el impacto de los antibióticos (Balcázar, 2002). Por lo que hoy en día surge el interés de probar diversas sustancias o moléculas con actividad antimicrobiana de origen marino, principalmente en los metabolitos secundarios de las microalgas (Faulkaner, 1995). Tal es el caso de la microalga roja *Porphyridium cruentum*, que está encapsulada por una pared celular con polisacáridos sulfatados. Esta microalga ha demostrado tener múltiples aplicaciones en la industria biotecnológica, tal como la producción de ácido araquidónico, pigmentos y polisacáridos extracelulares. Los polisacáridos de *P. cruentum*, inhiben la replicación viral y son un potente agente hipocolesterómico en ratas y gallinas. Además, estos polisacáridos promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno. La modulación de la función de los macrófagos puede ayudar a incrementar la fagocitosis, la actividad antimicrobial, la quimiotaxis y la presentación antígena a células T, por tanto, sirve como estrategia preventiva y terapéutica contra algunas enfermedades (Abdala-Díaz *et al.*, 2010).

Debido a lo anterior esta microalga puede ser una buena estrategia para el control de enfermedades en peces, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo establecer la capacidad antibiótica de *Porphyridium cruentum* y su efectividad como inhibidor de *Vibrio fluviales* y *Enterobacter sp*, causantes de infección bacteriana en peces cultivados.

REVISIÓN DE LA LITERATURA:

Para lograr una prevención de enfermedades exitosa es necesario el uso de alternativas biotecnológicas con microalgas encaminadas tanto a eliminar bacterias patógenas, así como a estimular el sistema inmune de los organismos cultivados (Villamil-Díaz *et al.*, 2012). Las microalgas constituyen una de las más importantes reservas de nuevos productos y aplicaciones. Sin embargo, de las especies cultivadas, menos del 1% ha sido sometido a trabajos de “screening” o pruebas desafío para la identificación de nuevas sustancias bioactivas o potenciales aplicaciones agrarias (Assuncao *et al.*, 2011).

Bernaldez (2005), experimento con tres extractos de la microalga *Porphyridium cruentum* los cuales originaron halos de inhibición en ensayos con bacterias patógenas para humanos (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas auriginosa*).

Se han realizado otros estudios sobre la microalga *Porphyridium cruentum* donde se reporta la producción de un exopolisacárido que evita que *Vibrio campbellii*, *Vibrio ordalii* y *Streptococcus saprophyticus* (bacterias patógenas de peces), se adhieran a las células hospederas (Guzmán-Murillo y Ascencio, 2000). Según Saracco-Alvarez (2007) los extractos de *Porphyridium cruentum* también presentan halos de inhibición hacia la bacteria *Aeromonas hydrophila*, causante de septicemia hemorrágica en cultivo de peces marinos.

Por otra parte, se ha reportado que los azúcares de algas aumentan la síntesis de citoquinas, lo que influye en las propiedades inmunomoduladoras de los polisacáridos de *Porphyridium cruentum* (Abdala-Díaz *et al.*, 2010).

OBJETIVOS:

General:

- Evaluar la actividad de *Porphyridium cruentum* frente a *Vibrio fluviales* y *Enterobacter sp.*

Específicos:

- Evaluar el crecimiento de *Porphyridium cruentum* en un sistema de cultivo estático.
- Establecer la capacidad de antimicrobiana de *Porphyridium cruentum* *In vitro*.
- Determinar la mínima concentración inhibitoria de *Porphyridium cruentum* para el control de *Vibrio fluviales* y *Enterobacter sp.*

METODOLOGIA:

Cultivo de microalga.

Para la realización de este trabajo se utilizaron las cepas de la microalga roja *Porphyridium cruentum*, obtenidas de la Colección de Cultivos Microalgales del Centro de Investigaciones biológicas de Noreste (CIBNOR). Para lo cual se inocularon en placas Petri con agar bacteriológico enriquecido con Triple 17 y Silicatos de sodio (0.5ml/L) con el propósito de lograr cultivos frescos. Cuando alcanzaron la fase de crecimiento exponencial se inocularon en botes de plástico de 20 Litros de capacidad con una salinidad 30%. Todo se llevó a cabo por triplicado. El crecimiento de los cultivos se monitoreo diariamente.

Cosecha de microalgas.

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, se filtraron 5 L de *P.cruentum* a través de filtros Whatman número 4, separando así el paquete celular del sobrenadante. Inmediatamente después del filtrado, el paquete celular se mantuvo en congelación a -10 °C. El sobrenadante se mantuvo a una temperatura de -20 °C para utilizarlos posteriormente.

Prueba de inhibición por el método de difusión en placa.

Las bacterias patógenas que se utilizaron en el presente trabajo fueron aisladas previamente de procesos infecciosos en peces (Guardiola-Álvarez *et al.*, 2016) y corresponden a las especies *Vibrio fluviales* y *Enterobacter sp.* que se mantienen dentro del cepario del Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo para la acuicultura. Las cepas se inocularon en placas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) por triplicado y se incubaron a 27°C durante 24 horas y posteriormente se resuspendió el paquete celular microalgal y mediante el uso de discos de papel filtro de 7mm de diámetro, se impregnaron con 30 µl de la microalga y se colocaron sobre la doble capa de bacterias inoculadas; al término de 24 h de incubación y a una temperatura de 26 °C, se midieron los halos de inhibición en mm con la ayuda de un vernier, los cuales se tomaron como una indicación de la producción de, por lo menos, un metabolito antibacteriano por parte de la microalga. Como controles se utilizaron sensidiscos impregnados de los antibióticos amoxicilina y tetraciclina (5 mg.l-1).

RESULTADOS:

Los resultados de este estudio indican que el extracto de *Porphyridium cruentum* presenta actividad antimicrobiana frente a *Vibrio fluvialis* y *Enterobacter sp* al obtenerse halos de inhibición de entre 0.3 a 3.0 mm. Como se observa en la figura 1.

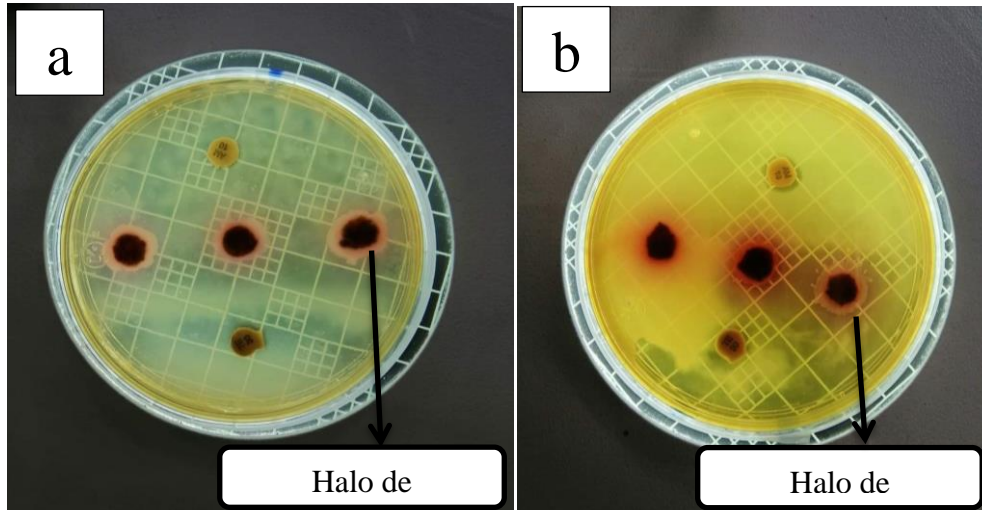


Figura 1. Halos de inhibición producidos por las bacterias patógenas frente a los extractos microalgales y antibióticos utilizados, (a) Placa de *Vibrio fluvialis* (b) Placa de *Enterobacter spp.*

En los halos producidos por el efecto de los antibióticos, se observaron variaciones de tamaño de los halos entre cada una de las cepas bacterianas. Así mismo en la mayoría de los casos los halos de inhibición fueron mayores con los extractos microalgales utilizados, seguramente tendríamos que duplicar la concentración de los antibióticos para alcanzar la misma inhibición que los extractos (Tabla1).

Tabla 1. Valores promedio de los halos producidos entre los tratamientos con el uso de *P. Cruentum*.

Bacteria	<i>P. cruentum</i>	Amoxicilina	Tetraciclina
<i>Vibrio fluvialis</i>	0.5 mm	0.5 mm	0.5 mm
<i>Vibrio fluvialis</i>	1.0 mm	0.3 mm	0.5 mm
<i>Vibrio fluvialis</i>	2.0 mm	1.0 mm	2.0 mm
<i>Enterobacter spp</i>	2.0 mm	0 mm	0 mm
<i>Enterobacter spp</i>	3.0 mm	0.5 mm	0.3 mm
<i>Enterobacter spp</i>	1.0 mm	0.5 mm	0.3 mm

DISCUSION:

De acuerdo a los resultados obtenidos que se comprobó la actividad antibiótica de los extractos microalgales de *P. cruentum*, esto puede deberse a los compuestos que normalmente se encuentran en las microalgas como pigmentos, alcoholes, aminoácidos, glicerol, etc. así como polisacáridos extracelulares ácidos polinsaturados y ácido domóico con propiedades antibacterianas tal como lo señala Gomez-Luna, (2007).

Se ha demostrado también que diferentes especies de fitoplancton, entre ellas *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis sp.*, *Amphipropra paludosa*, *Porphyridium cruentum* y *Chaetoceros muelleri* han presentado actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, utilizando hexano, diclorometano y metanol como solventes para la extracción (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). Asimismo, se ha reportado que *P. cruentum* produce un exopolisacárido que evita que *Heliobacter pilori* y *Aeromonas veronii* (bacterias patógenas del humano), *Vibrio campbellii*, *Vibrio ordalii* y *Streptococcus saprophyticus* (bacterias patógenas de peces), se adhieran a las células hospederas (Guzmán-Murillo y Ascencio, 2000). Tal es el caso del estudio reportado por Sanchez-Saavedra *et al.* (2010) quienes obtuvieron halos de inhibición de la bacteria *P. aeruginosa* con extractos a partir de la biomasa de *Porphyridium cruentum*.

En el presente trabajo los extractos microalgales presentaron inhibición en las diferentes cepas bacterianas Gram-negativas. La bacteria *Vibrio fluvialis* presentó menor inhibición al extracto microalgal, Schmidt y Hansen (2001) sugieren que esto se deba quizás a la membrana adicional que existe en las bacterias Gram (-). El compuesto activo de los extractos puede tener dificultades para penetrar la membrana adicional. Contrario a esto en el trabajo de Saracco-Álvarez (2007) la bacteria *Vibrio spp.* presentó mayor sensibilidad a los extractos microalgales de *P. cruentum* al igual que Cooper *et al.* (1983) informo la actividad antibacteriana de *P. cruentum* contra *Vibrio spp.* Por lo que sería recomendable aumentar la

concentración del extracto para mejores resultados ya que la magnitud de la inhibición se relaciona con la concentración de la sustancia (Ramírez y Marin, 2009). El extracto microalgal obtenido en el presente trabajo presento halos de inhibición de entre 0.33 - 3.0 mm, siendo menores que los obtenidos por Saracco-Álvarez (2007), donde los extractos de *Nannochloropsis oculata* y *P. cruentum*, originaron halos de inhibición de 7.83 a 20.00 mm, esto con la utilización de solventes para la extracción de metabolitos secundarios a partir de la biomasa.

En este trabajo no se utilizo ningún tipo de solvente, esto podría presentar una ventaja debido a que uno de los factores más importantes en la búsqueda de productos naturales es la selección de un solvente adecuado para solubilizar extractos orgánicos, ya que este puede ser toxico para los organismos de ensayo, lo que puede influir en la evaluación de su actividad (Randhawa, 2008). Por lo que al no utilizar solvente alguno se espera que pueda ser utilizado en organismos sin riesgo alguno.

El conocimiento de interacciones específicas entre bacteria-microalga, nos permite la optimización de sistemas productivos para la acuicultura disminuyendo los costos, facilitando el manejo, reduciendo el uso de antibióticos y otros químicos que causan el deterioro ambiental (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003). Por lo que con base en los resultados anteriores de sensibilidad por parte de las bacterias *Vibrio fluvialis* y *Enterobacter spp* al extracto acuoso obtenido por *Porphyridium cruentum* se sugiere como posible alternativa en la industria acuícola en respuesta a enfermedades infecciosas en peces causadas por bacterias.

CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos se puede observar que el extracto acuoso de la microalga *Porphyridium cruentum* tiene la capacidad de inhibir bacterias patógenas para peces, por lo que el uso en la acuicultura de este extracto para combatir enfermedades presentes en granjas acuícolas podría ser una alternativa para el control de enfermedades. Sin embargo, se requieren continuar con los estudios para

comparar distintas concentraciones que den una mayor protección a los organismos acuáticos contra las enfermedades sin las problemáticas que representan los químicos y antibióticos en acuicultura.

REFERENCIAS:

Assuncao, P., de la Jara A., Carmona L., Freijanes K., Portillo E. y Mendoza H. (2011). Potencial biotecnológico de las microalgas. Departamento de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Canarias (ITC). 45 p.

Balcázar, J.L. (2002). Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. Facultad de Acuicultura, Universidad de Machala, Ecuador. 8:877 p.

Bernaldez, S.J. (2005). Actividad antimicrobiana en microalgas y cianobacterias marinas. Tesis (Químico Farmacobiólogo). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

Cooper, S., Battat, A., Marsot, P. y Sylvestre, M. (1983). Production of antibacterial activities by two Bacillariophyceae grown in dialysis culture. Revista canadiense de Microbiología, 29.

Abdala-Díaz R.T., Chabrilón M., Cabello-Pasini A., López-Soler B. y Figueroa F. L. (2010). Efecto de los polisacáridos de *Porphyridium cruentum* sobre la actividad de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Department of Ecology, Faculty of Sciences, University of Málaga, Málaga, Spain. 345-346 p.

Faulkner, D.J. (1995). Marine natural products. Natural Products Reports. 12:223 p.

Gómez-Luna, L.M. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química, XIX (2).22

Guardiola-Álvarez, K.A., Monroy-Dosta, M.C., Rodríguez-Gutiérrez, M. y Núñez-Cardona, M.T. (2016) Biological control of *Aeromonas salmonicida* in *Puntius conchonus* culture using probiotics under laboratory and fish farm conditions. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 2016; 4(4): 440-443.

Guzmán-Murillo, M. y Ascencio, F. (2000). Antiadhesive activity of sulphated exopolisaccharides of microalgae on attachment of red sore disease associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. Revista Letters in Applied Microbiology. 12.

Kikenlin, P., Michel, C. y Ghittino, P. (1985). Tratado de las enfermedades de los peces. Acribia, S.A. Zaragoza España. 353 p.

Ramirez, L.S. y Marin, C.D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Revista Scientia et Technica. 15(42).

Randhawa, M.A. (2008). Dimethyl sulfoxide (DMSO) Inhibits the germination of *Candida albicans* and the Arthrospores of *Trycophyton mentagrophytes*. Revista Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi: Japanese Journal of Medical Mycology. 27(4).

Riquelme, E.C. y Avedaño-Herrera, R.E. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. Revista Chilena de Historia Natural. 76(4).

Sanchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A.F. y Bernaldez-Sarabia, J. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. Revista de Biología Marina y Oceanografía . 45 (3).

Saracco-Álvarez, M.R. (2007) Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 12-13 p.

Schmidt, L.E y Hansen, P.H. (2001) Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. Revista Marine Ecology Progress series 216.

Villamil-Díaz, L.M., Infante-Villamil, S.M. y Lecompte-Pérez, O.P. (2012). Uso de microorganismos benéficos en el alimento vivo para controlar la aparición de enfermedades durante el cultivo de animales acuáticos. Revista Mutis. Universidad Jorge Tadeo Lozano. 94 p.