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

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**“*Chlorococcum sp.* como tratamiento para el control de
infecciones bacterianas en peces”**


QUE PRESENTA EL ALUMNO

Axel Omar Rivera Ramirez

Matrícula

2153063535

Asesora interna:



Dra. María del Carmen Monroy Dosta (28906)

RESUMEN

Las microalgas han sido objeto de estudio durante los últimos años debido a su potencial biotecnológico que está relacionado con las sustancias que producen, dentro de las cuales se encuentran pigmentos fotosintéticos, ácidos grasos, polisacáridos, carbohidratos, alcoholes y enzimas inhibidoras. Dichas sustancias pueden ser utilizadas en diversos sectores productivos como es el caso de la acuicultura, ya que estudios recientes reportan actividad antibacteriana en diversas especies de microalgas de agua dulce y marinas, lo que puede ser una alternativa a los quimioterapéuticos que han generado resistencia bacteriana en la producción de organismos acuáticos. Por lo que en esta investigación se determinó el potencial de *Chlorococcum sp.* para inhibir *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* in vitro. Para lo cual se inocularon 50 µl de las cepas bacterianas en placas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) por triplicado y se incubaron a 27°C durante 24 horas para posteriormente resuspender 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. Como controles se utilizaron sensidiscos impregnados de los antibióticos amikacina (30 mg.l⁻¹) y ciprofloxacino (5 mg.l⁻¹). Se obtuvieron resultados positivos con el uso de *Chlorococcum sp.* ya que generó mayor cantidad de halos de inhibición y de mayor tamaño (2.5 ml) en comparación a los antibióticos utilizados (2.0 ml). Lo anterior es muy relevante al obtener una estrategia de control de *A. hydrophila* y *P. fluorescens* sin el uso de antibióticos. Se sugiere profundizar en las pruebas de inhibición In vivo en condiciones de granja.

Palabras clave: *Chlorococcum sp.*, microalgas, antibióticos, biotecnología.

INDICE:

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
OBJETIVOS	3
General	3
Específicos.....	3
METODOLOGÍA.....	3
Cultivo de <i>Chlorococcum sp</i>	3
Cosecha de microalgas.....	4
Prueba de inhibición por el método de difusión en placa.....	4
RESULTADOS	4
DISCUSIÓN.....	6
CONCLUSIONES.....	8
REFERENCIAS	8

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de las microalgas en biotecnología ha crecido debido a su capacidad para producir biomoléculas con actividad biológica importante.

Las microalgas son organismos fotosintéticos con capacidad de sintetizar innumerables compuestos como: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, pigmentos y diversos compuestos bioactivos. Por lo tanto, se puede utilizar en la fabricación de gran variedad de productos biotecnológicos como: biocombustibles, suplementos alimenticios, biofertilizantes, pigmentos para la industria cosmética o alimenticia y en la remoción de patógenos debido a sus propiedades antimicrobianas. (Santos, 2014; Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

La actividad antagónica de las microalgas con respecto a las bacterias ha sido atribuida a la producción de sustancias como ácidos grasos con más de 10 átomos de carbono que provocan la lisis bacteriana, como lo han documentado Riquelme y Avendaño-Herrera (2003) para el caso de la microalga *Skelotema costatum*. Así mismo se ha reportado que la presencia de microalgas en cuerpos de agua reduce la cantidad de organismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, virus y protozoos, debido a que un ambiente favorable para microalgas es desfavorable para ellos (Hernandez-Perez y Labbé, 2014). En cuanto a la industria acuícola y agrícola el consumo de varias especies de microalgas genera beneficios en los animales que las ingieren, mejorando la respuesta inmune y la fertilidad (Hernandez-Perez y Labbe, 2014).

Chlorococcum sp. al igual que otras microalgas ha sido sugerida como un alimento para larvas de peces, moluscos filtradores y crustáceos. De acuerdo con Bhagavathy *et al.* (2011) *Chlorococcum humicola* ha demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas y hongos patógenos debido a la existencia de compuestos bioactivos como carotenoides, alcaloides, flavonoides, ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos. En el caso de *Chlorococcum amblystomatis* también se ha identificado que produce una gran variedad de estos ácidos grasos y carbohidratos los cuales penetran en la bicapa lipídica bacteriana desestabilizándola y produciendo una acidificación dentro de la célula que termina provocando su muerte (Correia *et al.*, 2020; Naeyaert, 2016).

Uno de los problemas más grandes en la producción animal es la resistencia bacteriana provocada por el uso inadecuado de antibióticos convencionales, antibióticos como la

tetraciclina, ácido oxolínico, la flumequina y penicilinas son utilizados en grandes cantidades por la industria acuícola, incluso más que la medicina humana. La mayoría de estos antibióticos no son biodegradables, lo que quiere decir que si son aplicados en animales de consumo humano cuando estos llegan al consumidor provocan que las bacterias hospedadas en él adquieran resistencia aumentando su patogenicidad y mortalidad. (Alós, 2015)

La falta de información respecto a las propiedades antimicrobianas de las algas es una limitante para su desarrollo como producto biotecnológico. Es importante buscar alternativas eficaces que desplacen el uso de antibióticos convencionales, evitando el aumento de la resistencia bacteriana. Por lo que el propósito de este trabajo es aportar información en cuanto la capacidad de *Chlorococcum sp.* para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en el cultivo de peces.

ANTECEDENTES

Existen muy pocos trabajos relacionados con los efectos antimicrobianos directos de las microalgas en peces, sin embargo, hay evidencia de que los compuestos que estas producen son efectivos al momento de evitar la proliferación de microorganismos patógenos. Tal es el caso del trabajo de Maadane *et al.* (2017), donde utilizaron extractos obtenidos de las microalgas *Dunaliella Salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Dunaliella sp.*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis sp* para la inhibición de bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. A si mismo reportaron que la microalga *Tetraselmis sp.* además, afecta el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Sin embargo hay que considerar que el éxito del uso de las microalgas está determinado a los métodos del cultivo microalgal ya que como lo señalan Campoverde-Alvarado y Pomaquiza-Lema (2014), la efectividad de los compuestos de las microalgas se puede ver afectada por la disponibilidad de nutrientes durante su crecimiento, ya que ellos obtuvieron resultados negativos en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al utilizar extractos metabólico y clorofórmico obtenido de las algas *Euglenea viridis* y *Oscillatroia sp.*

Simić *et al.* (2012), aseguran que a las microalgas no solo se le atribuyen propiedades antimicrobianas si no también antioxidantes como en un estudio que realizó con la especie *Trentepohlia umbrina* que demostró ser efectiva para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella*

pneumoniae (ATCC 70063), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y los hongos: *Aspergillus niger* (DBFS 267), *Candida albicans* (DBFS). Así mismo se verificó la captación de radicales libres con valores de CI50 de 665.28 µg /ml y la eliminación de radicales de aniones superóxido.

Existen otras alternativas a los antibióticos tal como lo son las nanopartículas de plata las cuales al ser incluidas en un medio de incubación junto con *Chlorella vulgaris* reducen el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* en un 98 % (da Silva *et al.*, 2016)

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto antimicrobiano de *Chlorococcum sp* sobre las bacterias patógenas de peces *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens*.

Específicos

- Establecer la concentración mínima inhibitoria de *Chlorococcum sp* para el control de *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens*.
- Comparar los halos de inhibición producidos por *Chlorococcum sp* contra antibióticos comerciales.

METODOLOGÍA

Cultivo de Chlorococcum sp

El cultivo de la microalga se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo del DEHA. Se utilizó una cepa de *Chlorococcum sp*, obtenida del Laboratorio de Producción de Alimento Vivo del mismo departamento.

La cepa se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 2 litros de agua dulce y se fertilizó con triple 17 (10 ml/L) y Bayfolan (10ml/L) cada tercer día. El crecimiento se monitoreó diariamente, desdoblado la microalga periódicamente hasta conseguir un volumen de 20 L.

Cosecha de microalgas

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria, se centrifugaron 10 L de *Chlorococcum sp* en tubos Falcon de 50 ml, separando así el paquete celular del sobrenadante. Inmediatamente después del centrifugado, el paquete celular se mantuvo en refrigeración a -3 °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 cepas de *Aeromonas hydrophila* (CAIM 347) y *Pseudomonas fluorescens* (CAIM 2379). Se inocularon 50 µl de las cepas en placas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) por triplicado y se incubaron a 27°C durante 24 horas para posteriormente resuspender 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 *Chlorococcum sp*. Como controles se utilizaron sensidiscos impregnados de los antibióticos amikacina (30 mg.l-1) y ciprofloxacino (5 mg.l-1).

RESULTADOS

La microalga *Chlorococcum sp*. presento un mayor grado de efectividad al inhibir el crecimiento de las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* en comparación con los antibióticos de control. En el caso de *A. hydrophila* la microalga logro crear halos de inhibición en las todas las placas y sensidiscos inoculados, mientras que ninguno de los antibióticos tuvo efectividad. Entretanto *P. fluorescens* tuvo mayor resistencia a la microalga presentando halos en solo cuatro de los 9

sensidiscos colocados, sin embargo, en la placa “I” ambos antibióticos presentaron halos de inhibición siendo estos de 0.2 mm cada uno (Tabla 1)

Tabla 1.- Tamaño en milímetros de los halos de inhibición producidos por *Chlorococcum sp.* y los antibióticos de control Ciprofloxacino y Amikacina.

	Sensidiscos <i>Chlorococcum sp.</i>			Ciprofloxacino	Amikacina
	1	2	3		
<i>A. hydrophila</i> I	0.5	0.5	0.5	0	0
<i>A. hydrophila</i> II	2.0	2.5	1.5	0	0
<i>A. hydrophila</i> III	2.0	1.0	2.5	0	0
<i>P. fluorecens</i> I	0	0.5	0	2.0	2.0
<i>P. fluorecens</i> II	0	0	0	0	0
<i>P. fluorecens</i> III	1.0	1.5	1.0	0	0

En promedio *Chlorococcum sp* tuvo mayores halos de inhibición dentro de las placas pertenecientes a *A. hydrophila* al contrario de los antibióticos utilizados los cuales no tuvieron efecto inhibitorio contra la misma bacteria (Figura 1). Las placas que mostraron mayor efectividad en el caso de cada bacteria fueron *A. hydrophila* II y *P. fluorecens* III teniendo los halos de inhibición más grandes de 0.25 mm y 0.15 mm respectivamente (Figura 2)

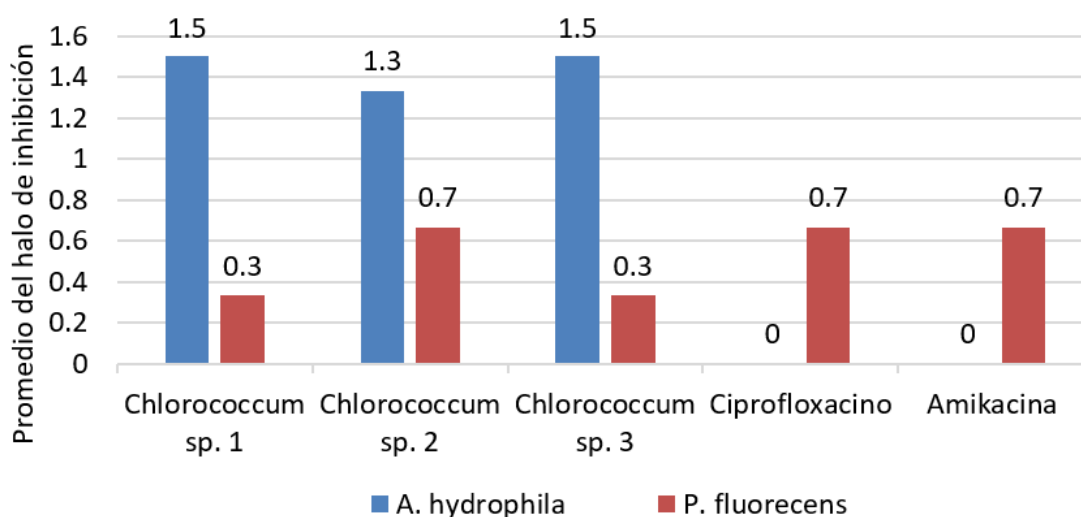


Figura 1.- Grafica de promedios de halos de inhibición producidos por *Chlorococcum sp* y antibióticos frente a las dos cepas bacterianas.

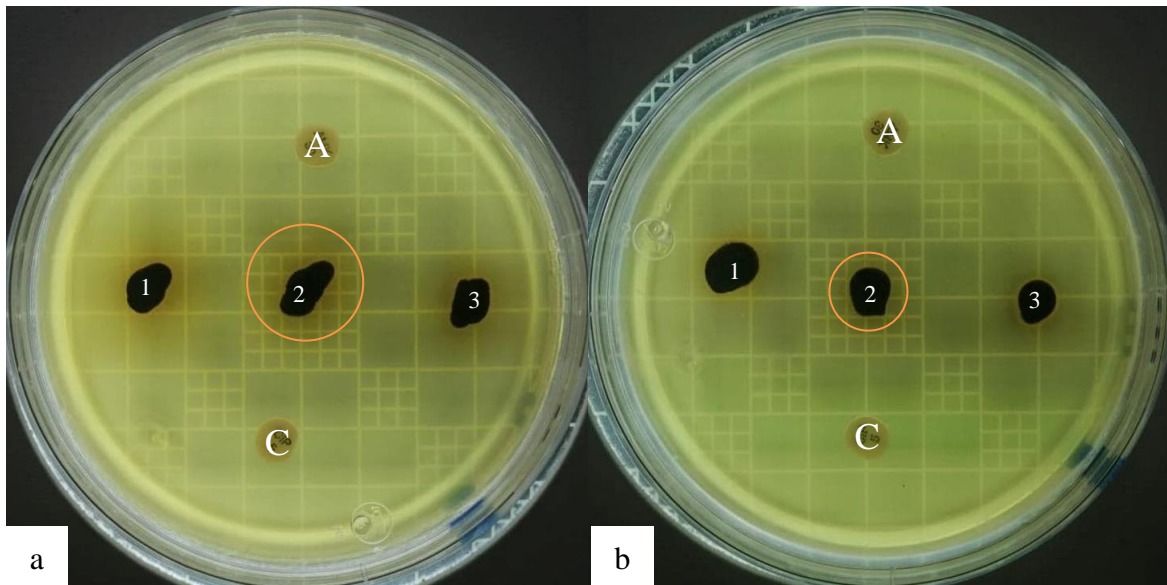


Figura 2.- Halos de inhibición producidos por sensibilizadores impregnados con *Chlorococcum* sp. (1, 2 y 3) y los antibióticos Ciprofloxacino (C) y Amikacina (A) Frente a *Aeromonas hydrophila* II (a) y *Pseudomonas fluorescens* III (b).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que *Chlorococcum* posee actividad antimicrobiana al lograr la inhibición *in vitro* de *Aeromonas hydrophila* mejor que los antibióticos comerciales como Ciprofloxacino y amikacina, esto concuerda con lo reportado por Shiels, *et al* (2021), quienes han reportado que *Chlorococcum* sp. tiene efectividad para controlar el crecimiento de diversos patógenos esto puede deberse a que es rica en compuestos bioactivos como carotenos, flavonoides y lípidos activos. Por otro lado, Bhagavathy S. *et al* (2011) utilizaron una cepa de *Chlorococcum humicola* para inhibir el crecimiento de diversas bacterias entre las cuales se encontraba *Pseudomonas aeruginosa* utilizando extractos orgánicos y pigmentos purificados de la microalga obteniendo resultados negativos en la inhibición con pigmentos y resultados muy favorables con los extractos, teniendo halos de inhibición de hasta 18 mm.

En el caso particular de este experimento al probar el inhibir el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* el resultado fue una baja efectividad con halos de máximo 1.5 mm, debido quizás a la utilización del paquete celular completo evitando que el extracto activo surtiera efecto, mientras tanto *Aeromonas hydrophila* fue inhibida con mayor eficiencia creando halos de hasta 2.5 mm. Mostafa E. y colaboradores en 2020 obtuvieron un rango de efectividad en los halos de inhibición de entre 15 ± 0.2 mm los resultados obtenidos en este experimento demostraron una baja eficacia de la microalga *Chlorococcum sp.* Hay que resaltar que los antibióticos comerciales en la mayoría de los casos no mostraron halos de inhibición, lo cual indica que las bacterias probadas ya presentan resistencia a los antibióticos Ciprofloxacino y Amikacina, esto debido muy probablemente al uso excesivo de estos dentro de las industrias de producción de animales para el consumo humano e incluso en su uso como medicamento para los seres humanos.

En este trabajo no se utilizó 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 tóxico 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, al mismo tiempo el no utilizar solventes puede afectar la eficacia del extracto negativamente.

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 *A. hydrophila* y *P. fluorescens* al extracto acuoso obtenido por *Chlorococcum sp.* se sugiere como posible alternativa en la industria acuícola en respuesta a enfermedades infecciosas en peces causadas por bacterias.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos concluir que el uso de microalgas como *Chlorococcum sp.* puede ser una opción en acuicultura para limitar el uso de antibióticos

Se requiere profundizar en los estudios para ver concentraciones, las moléculas bioactivas y la forma de administrar la microalga para obtener mejores resultados.

REFERENCIAS

- Alós, J.I. (2015) Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 33, Issue 10, Pages 692-699, ISSN 0213-005X, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. y Jancy Sherene Bell, I. (2011) 'Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity', Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1(1), pp. S1-S7. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60111-1.
- Cabello, F.C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Revista médica de Chile, 132(8), 1001-1006.
- Campoverde-Alvarado, M. V., y Pomaquiza-Lema, G. (2014). Tesis. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/5040>.
- Correia, N., Pereira, H., Silva, J.T., Santos, T., Soares, M., Sousa, C.B., Schuler, L.M., Costa, M., Varela, J., Pererira, L. y Silva, J. (2020). Isolation, Identification and biotechnological applications of a Novel, Robust, Free-living *Chlorococcum (Oophilia) amblystomatis* Strain Isolated from a Local Pond. Appl. Sci. 2020, 10, 3040; doi:10.3390/app10093040
- da Silva Ferreira, V., Eugenio, M., Maurício T.R., Lima, L., Frases, S., de Souza, W. y Sant'Anna, C. (2016). Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Enzyme and Microbial Technology. 97. 10.1016/j.enzmictec.2016.10.018.
- Guardiola-Álvarez KA, Monroy-Dosta MC, Rodríguez-Gutiérrez M y Núñez-Cardona MT. (2016) Biological control of *Aeromonas salmonicida* in *Puntius conchoni* culture using probiotics under laboratory and fish farm conditions. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 4(4): 440-443.
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía, 49(2), 157-173.
- Maadane, A., Merghoub, N., Mernissi, N.E., Ainane, T., Amzazi, S., Wahby, I. y Bakri, Y. (2017). "ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MARINE MICROALGAE

- ISOLATED FROM MOROCCAN COASTLINES", *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 6, no. 6, pp. 1257-1260.
- Naeyaert, W. (2016). Ácidos grasos de cadena mediana en la batalla contra la resistencia de antibióticos y a favor de la salud intestinal en cerdos. *Actualidad Porcina* N° 29, Año 5.
- 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, C. E., y Avendaño-Herrera, R. E.. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista chilena de historia natural*, 76(4), 725-736. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2003000400014>.
- Santos, A. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de Mecánica y Electricidad*, 91(1), 20-28.
- Simić, S., Kosanić, M. y Ranković, B. (2012). Evaluation of In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Green Microalgae *Trentepohlia umbrina*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40. 86-91. 10.15835/nbha4027933.
- Shiels, K.; Tsoupras, A.; Lordan, R.; Nasopoulou, C.; Zabetakis, I.; Murray, P.; Saha, S.K. Bioactive Lipids of Marine Microalga *Chlorococcum* sp. SABC 012504 with Anti-Inflammatory and Anti-Thrombotic Activities. *Mar. Drugs* 2021, 19, 28. <https://doi.org/10.3390/md19010028>
- Bhagavathy S et al./*Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011)S1-S7
- Mostafa E. Elshobary, Rania A. El-Shenody, Mohamed Ashour, Hossain M. Zayed, Xianghui Qi, Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*, *Food Bioscience*, Volume 35, 2020, 100567, ISSN 2212-4292