

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

IMPACTO DEL USO DE MACROALGAS EN EL
CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS PARA EL
CAMARÓN (*Pennaeus vannamei*)

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Karla Estefanía Gaona Vázquez

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

HIGHER POLYTECHNICAL SCHOOL OF THE LITORAL

Faculty of Maritime Engineering and Marine Sciences

IMPACT OF THE USE OF SEaweEDS ON THE
CONTROL OF PATHOGENIC BACTERIA FOR THE
SHRIMP (*Pennaeus vannamei*)

INTEGRATORY PROJECT

Prior to obtaining the title of:

Aquaculture Engineer

Presented by:

Karla Estefania Gaona Vazquez

GUAYAQUIL, ECUADOR

Year: 2022

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi familia que han estado tanto en mis triunfos como en mis fracasos. Agradezco por mis hermanos que han sido mis mejores amigos, a mi mamá por su ejemplo de siempre seguir adelante y su compañía en cualquier camino que elija y a ti compañero fiel y de aventuras mi perrito Bruno siempre me impresionó tu sabiduría. Les amo a todos ustedes y gracias por estar en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica del Litoral, a sus profesores por todo conocimiento impartido y sus hermosas instalaciones. Ha sido una gran oportunidad haber estado aquí.

A mi tutor MSc. Adrián Marquez por su paciencia, apoyo e inspiración para este proyecto

Al CENAIM por permitir realizar el proyecto y a todos los investigadores que están contribuyendo a la acuicultura ecuatoriana.

Y gracias a la persona que ha sido mi punto de inflexión y me ayudo cuando estaba confundida con su amor y sabiduría.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (**Karla Estefanía Gaona Vázquez**) y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

A handwritten signature in black ink, reading "Karla E. V.", written over a horizontal line.

Karla Estefanía Gaona
Vázquez

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA**

M Sc. Wilfrido Arguello

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**ADRIAN JOSE
MARQUEZ
MONTIEL**

M Sc. Adrián Marquéz

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El sector camaronicultor se ha visto afectado a lo largo de los años por la aparición de las enfermedades emergentes y reemergentes en los cultivos, generando así grandes pérdidas económicas en el mundo. El tratamiento más utilizado hasta la actualidad han sido el uso de antibióticos, aunque el uso de estos genera resistencia bacteriana y degradación del medio ambiente, por esta razón se ha buscado una alternativa más sustentable. Las macroalgas exhiben un efecto sobre el control de crecimiento de bacterias muchas de ellas patógenas (*V.vulnificus* y *V.parahemolyticus*) para el camarón. Los extractos que demostraron mayor porcentaje de inhibición bacteriana fueron obtenidos de la macroalga *Gelidium sclerophyllum* y *Acanthophora spicifera* con una inhibición del 98.9% y 71.6 % respectivamente. También se realizó identificación de biocompuestos presentes en las macroalgas en la cual no se pudo observar ninguna relación directa entre la concentración de los compuestos y la actividad antimicrobiana. *Kappaphicus alvarezzi mostro* altas concentraciones en muchos de sus componentes bioquímicos aunque esta obtuvo el menor porcentaje de inhibición antimicrobiana.

Palabras Clave: Macroalgas, Inhibición bacteriana, *Vibrios*, Biocompuestos.

ABSTRACT

*The shrimp farming sector has been affected over the years by the appearance of emerging and re-emerging diseases in crops, thus generating significant economic losses worldwide. The most used treatment to date has been the use of antibiotics. However, this use induces bacterial resistance and degradation of the environment; for this reason, a more sustainable alternative has been sought using macroalgae extracts to combat pathogenic bacteria (*V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*) for shrimp. The extracts that showed the highest percentage of bacterial inhibition were the macroalga *Gelidium sclerophyllum* and the cultivated macroalga *Acanthophora spicifera*, with inhibition of 98.9% and 71.6%, respectively. Identification of biocompounds present in macroalgae was also carried out to determine if there is a relationship with antimicrobial activity. They are turning out to have interesting predominant biocompounds, the *Kappaphicus alvarezzi* macroalga, although this macroalga obtained the lowest percentage of antimicrobial inhibition.*

Keywords: *Macroalgae, Bacterial inhibition, Vibrios, Biocompounds.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	6
RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema	11
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	12
1.4 Marco teórico.....	12
1.4.1 Macroalgas	12
2. Especies de macroalgas seleccionadas	13
• <i>Acanthophora spicifera</i>	13
• <i>Aspargopsis taxiformis</i>	14
• <i>Kappaphycus alvarezii</i>	15
• <i>Gelidium sclerophyllum</i>	16
3. Contenido bioquímico de las macroalgas.....	16

4.	Bacterias del género <i>Vibrio</i> que afectan al cultivo del camarón	17
•	<i>Vibrio campbelli</i>	18
CAPÍTULO 2		19
5.	Metodología.....	19
5.1.1	Recolección de muestras	19
5.1.2	Evaluación antimicrobiana	20
•	Actividad antibacteriana.....	20
5.1.3	Caracterización bioquímica de las macroalgas	21
•	Actividad antioxidante total.....	24
CAPÍTULO 3		26
6.	Resultados Y ANÁLISIS	26
•	Actividad antimicrobiana.....	26
•	Actividad antioxidante.....	28
•	Concentraciones de auxinas	29
•	Concentraciones de fenoles.....	29
•	Concentraciones de ficocianina y ficoeritrina.....	30
•	Contenido de clorofila.....	31
•	Carotenoides.....	32
5.2	Presupuesto del proyecto	32
CAPÍTULO 4		34
7.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	34
	Recomendaciones.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diluciones del ácido indol-3-acético	22
Tabla 2 Inhibición bacteriana a las 8 horas de 5 diferentes extractos de macroalgas	27
Tabla 3 Inhibición bacteriana a las 24 horas	28
Tabla 4 Presupuesto del ensayo.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estado mundial de la pesca y la acuicultura. (SOFIA,2022)	9
Figura 2 <i>Acanthophora spicifera</i> . Fuente: World Register of Marine Species	13
Figura 3 <i>Aspargopsis taxiformis</i>	14
Figura 4 <i>Kappaphycus alvarezzi</i>	15
Figura 5 <i>Gelidium sclerophyllum</i>	16
Figura 6 Zona de muestreo de macroalgas. Fuente: Google Earth.....	19
Figura 7 Gráfico de mareas de julio. Fuente: INOCAR	20
Figura 8 Porcentajes de la actividad antioxidante	28
Figura 9 Concentraciones de auxinas totales en macroalgas	29
Figura 10 Concentraciones de fenoles en macroalgas	30
Figura 11 Concentraciones de ficobiliproteínas en macroalgas	31
Figura 12 Concentraciones de clorofila en macroalgas	31
Figura 13 Concentración de carotenoides en macroalgas	32

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ASTM	American Society for Testing and Materials
NACE	National Association of Corrosion Engineer
SSC	Electrodo de Plata Cloruro de Plata
CSE	Electrodo de Cobre Sulfato de Cobre
HWL	High Water Level
LWL	Low Water Level
CIS	Inspección pasó a paso, medición de potenciales de encendido
MPY	Milésimas de pulgadas por año

SIMBOLOGÍA

mil	Milésima de pulgada
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
m	Metro
mV	Milivoltio
Cu	Cobre
Ni	Níquel
C	Carbono
Mn	Manganeso
P	Fósforo

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en los últimos años se ha consolidado como el sector de mayor peso en la producción de alimentos provenientes del mar, superando a la pesca en el año 2016 en un 56% (FAO,2018) y alcanzando 62.2 % en el 2020 (FAO, 2022). Ante el evidente descenso de las pesquerías producto de la sobreexplotación, se reporta para el 2020 un 2.71% menos con respecto a años anteriores y para el mismo periodo un incremento en acuicultura de 2.7% (Figura 1.1), es evidente que esto responde al déficit dejado por la pesca, dejando en evidencia el papel esencial que juega la acuicultura en producir alimentos en especial para suplir que dejaran otros rubros en el futuro (ganadería y agricultura), en especial de cara al 2050 cuando se estima que la población alcanzara una población de 10 billones de personas. La acuicultura es considerada es el sector de producción de alimentos, según la FAO que tiene la posibilidad de desarrollarse limitando su impacto en el medio, alcanzando mayores niveles de sustentabilidad en la producción de alimentos. Cuando se analiza la producción mundial por acuicultura es indiscutible el peso que tienen las macroalgas en este aporte, con el segundo lugar en producción de biomasa a nivel mundial con 36 millones de toneladas reportadas para el 2020 (FAO, 2022).

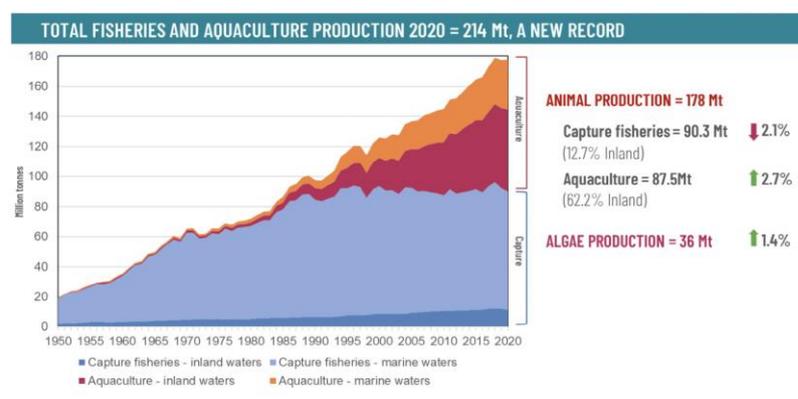


Figura 1 Estado mundial de la pesca y la acuicultura. (SOFIA,2022)

Esta biomasa de macroalgas posee diferentes aplicaciones, la mayoría dedicadas a la alimentación humana, pero también existen sectores industriales de extracción de compuestos de alto valor (alginatos, agares, cartageninos, pigmentos y biofertilizantes)

(Kadam et al., 2015; Kim et al., 2017), sin embargo en los últimos 5 años la producción de macroalgas ha presentado un auge en el estudio de sus propiedades como control del impacto de bacterias que causan mortalidad en acuicultura con resultados alentadores, en especial en cuando a la mejora del sistema inmune de los organismos en cultivo y control del crecimiento de bacterias (Chen and Jian, 2010).

Ecuador es uno de los mayores productores de camarón a nivel mundial, siendo esta actividad el principal rubro de producción de divisas después del petróleo. Por lo cual explorar alternativas sobre el manejo de uno de los mayores riesgos para la producción de camarón a nivel mundial, que es la aparición de enfermedades emergentes, las cuales en su mayoría son causadas por bacterias del género *Vibrio*. En la actualidad la mayoría de los tratamientos convencionales se enfocan en el uso de antibióticos que a largo plazo generan contaminación y resistencia bacteriana, causando que cada vez sea más difícil tratarlas (FAO,2017). Es por esto por lo que el presente trabajo tiene como objetivo identificar el potencial biotecnológico en el control de bacterias patógenas de camarón a partir de extractos de diferentes especies de macroalgas como alternativa para el control de enfermedades, siendo desarrollado estos análisis en complemento al Proyecto Bioeconomía de Macroalgas Marinas financiado bajo el permiso de investigación científica 010-18 IC-FAU-DPSE-MA

1.1 Descripción del problema

El principal reto que enfrenta la acuicultura en Ecuador son las enfermedades causadas por bacterias (FAO,2017), las cuales han ocasionado pérdidas millonarias en la producción de camarón a nivel mundial y causan un impacto severo en la sostenibilidad de la industria acuícola. Los impactos asociados a los principales tratamientos (Antibióticos) representan un riesgo potencial por el aumento de la resistencia bacteriana, la cual ha incrementado en los últimos años y además por su residualita ambiental. Recientemente debido a esta realidad se están explorando fuentes alternativas de quimio tratamientos de bajo impacto ambiental, entre los cuales se han explorado recientemente las macroalgas como una alternativa para combatir enfermedades, basado en sus propiedades 1: antimicrobiana 2 anti-virulencia e inmunoestimulante (Magallanes, et.al 2003) en diferentes especies de organismos de

cultivo. Por lo cual explorar cuáles macroalgas con potencial para el cultivo podrían tener adicionalmente valor funcional terapéutico, podría ser una excelente alternativa en el proceso de optimizar la producción de camarones y diversificar la canasta productiva Nacional mediante la incorporación de macroalgas.

1.2 Justificación del problema

Las enfermedades bacterianas han causado pérdidas millonarias a partir de la aparición de enfermedades emergentes y reemergentes en el sector acuícola, alcanzando hasta las 2017 pérdidas económicas de 13900 millones de dólares en el mundo (Sánchez, 2022). Recientemente en Asia, el síndrome hepatopancreático ha causado más de 1 billón de dólares en pérdidas del camarón hasta el 2018 (Jee Eun Han, 2017), afectando a la economía de distintos países y dejando un riesgo de latencia que genera desconfianza en el sector de producción de camarón e incertidumbre en los países que los padecen, afectando los precios a nivel mundial y el volumen de producción.

Ecuador históricamente ha sufrido diferentes crisis a lo largo del tiempo por la aparición de enfermedades emergentes como: el síndrome de la Gaviota y el síndrome de Taura (enfermedades de origen bacteriano) produjeron pérdidas hasta de 1.3 millones de dólares (Sánchez, 2022), mientras la enfermedad de larvas luminiscentes ha sido responsable de mortalidades de hasta un 80% de las siembras en los laboratorios del Ecuador en diferentes momentos de la historia de la producción (Eric, 2006) y la cantidad de hectareas de producción disminuyeron de 180000 ha a 50000 ha (Romero, 2014) . Las repercusiones en todos los niveles de la economía nacional debido a la importancia y la gran cantidad de empleos directos que genera esta industria en Ecuador.

En la actualidad la mayor parte de los métodos terapéuticos y profilácticos son a base de antibióticos, siendo su uso peligroso tanto para el ambiente como para el camarón, causando resistencia bacteriana y haciendo que combatirlas sea cada vez más complicada (Agurto, 2011). Por lo que el uso de compuestos quimioterapéuticos de

bajo impacto son una necesidad en este sentido tomando en cuenta estudios previos de control y disminución del impacto de enfermedades en camarones a partir del uso de macroalgas, como por ejemplo: *Sargassum sp* y *Aspargopsis armata* han demostrado una amplia gama de actividad antimicrobiana contra patógenos de impacto para la acuicultura (Vatsos and Rebours, 2014), también se han realizado uso de extractos de macroalgas en dietas para peces las cuales mejoraron la resistencia a enfermedades en peces (Mustafa et al., 1995) y los compuestos bioactivos de la alga marina *Ulva Clathrata* ha demostrado ser efectivo contra el *Vibrio anguillarum* (Tomás et.al, 2014). Sin embargo, en Ecuador aun cuando recientemente se han comenzado a desarrollar esfuerzos por desarrollar cultivos de macroalgas se desconoce el potencial de las especies locales y las introducidas que actualmente producen como *Kappaphycus alvarezzi* bajo las condiciones de cultivo locales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar la efectividad antimicrobiana de diferentes especies de macroalgas en el control de bacterias patógenas para el camarón (*Penaeus vannamei*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar el contenido bioquímico de diferentes macroalgas (actividad antioxidante, contenido de fenoles totales, auxinas totales y pigmentos).
- Medir la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes tipos de extractos acuosos y alcohólicos en bacterias con impacto en la camaronicultura

1.4 Marco teórico

1.4.1 Macroalgas

Las macroalgas son organismos fotoautótrofos cuyo cuerpo no es vascularizado, en su mayoría son bentónicas y viven adheridas a un sustrato. Sus efectos beneficiosos se atribuyen a sus macro y micronutrientes, componentes de bajo peso molecular (betaínas, poliaminas y brasinoesteroides) y reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico). Existen aproximadamente 10000 especies,

las cuales se subdividen de acuerdo con sus pigmentos en tres grupos (*phyla*): algas verdes (*phylum Chlorophyta*), algas pardas (*phylum Phaeophyta*) y algas rojas (*phylum Rhodophyta*). Las macroalgas aun cuando cubren el 2% de la superficie del mar son las responsables del secuestro de carbón de más del 70% del total de absorción mundial. Lo que nos permite identificar una oportunidad para desarrollar alimentos sanos y de muy bajo impacto mediante acuicultura.

Las especies de macroalgas seleccionadas forman parte de un estudio preliminar para determinar el potencial bioactivo de especies que han sido identificadas con potencial uso en cultivo, resultan ser comestibles (no tóxicas) y algunas ya están en producción a escala comercial como *K. alvarezzi* y a escala de producción piloto experimental *Acanthophora spicifera*.

2. Especies de macroalgas seleccionadas

- ***Acanthophora spicifera***



Figura 2 *Acanthophora spicifera*. Fuente: World Register of Marine Species

Pertenece a las algas rojas, esta especie se caracterizan porque pueden alcanzar hasta 25 cm de largo, sus ramas cilíndricas hasta 3 mm de diámetro, ramificadas generalmente en la parte superior. Son dioicos y están ampliamente distribuidas en los

climas tropicales. Son algas de crecimiento rápido y se pueden encontrar en zonas intermareales por su tolerancia a la desecación hasta zonas donde la luz penetre hasta el fondo. (Lewis, 2000)

Esta alga es usada en la gastronomía, también se ha probado los componentes bioactivos (flavonoides-terpenoides) en ratones como efecto antitumoral y antioxidante resultando un efecto significativo al reducir el peso y volumen del tumor (V. Lavakumar, 2012). Esta alga se encuentra de manera abundante en las costas del Ecuador, presenta un rápido crecimiento por lo que podría ser una candidata para desarrollos tecnológicos

- ***Aspargopsis taxiformis***



Figura 3 *Aspargopsis taxiformis*

Fuente: CDF Archive

Pertenece a las algas rojas, se encuentran ubicadas en zonas eulitorales a lo largo de las costas tropicales y templadas cálidas. Presenta una reproducción sexual y asexual, puede alcanzar hasta 30 cm de altura la cual tiene una ramificación irregular con ramas de 5-10 mm de longitud. Es una de las algas usadas como condimento más popular de Hawai. (Darwin, s.n)

Se han realizado estudios en Italia (estrecho de Messina) sobre las evaluaciones in vitro de la actividad antibacteriana de extractos de etanol de *A. taxiformis* en diferentes

meses del año a una concentración de 2 ml contra patógenos que afectan la acuicultura. En donde se demuestra que hubo una mayor actividad antibacteriana contra *V. alginolyticus*-*V. vulnificus*-*A. salmonocida* y una actividad moderada contra *Aeromonas*-*P. damsela*-*P. piscicida*-*V. harveyi*-*V. parahaemolyticus*- *Salmonella sp*; en una época del año. Mientras que otra extracción en un diferente mes del año fue altamente activo en 9/15 cepas de bacterianas y tuvo una actividad moderada contra *V. alginolyticus*-*A. salmonocida*-*Aeromonas* -*V. harveyi*-*V. cholerae*. (Genovese G, 2012). También, los estudios de la Universidad de California, sobre la adicción del 2% de las macroalgas *Asparagopsis taxiformis* en los piensos para los animales vacunos, redujo en un 82% las emisiones de metano debido a los compuestos fenólicos (pirogalol y floroglucinol) presente en el sistema digestivo vacuno, no alterando ni el sabor ni el peso a comparado de los terneros con alimentación normal. (Ministerio de agricultura, 2021)

- ***Kappaphycus alvarezii***



Figura 4 *Kappaphycus alvarezii*

Fuente: El Diario Ecuador

Pertenece a las algas rojas, conocidas comercialmente como “Cottoni”, ha sido introducida en diversos países con clima tropical para fines acuícolas. En estudios sobre la dispersión de la macroalga mediante el monitoreo con el método de cuadratas en la playa del sector Bahía de las Conchas (Ecuador), se observó una escasa que la misma no presenta estructura de flotación ni capacidad de fijación, si se llega a escapar fragmentos de esta alga no son capaces de mantenerse y tampoco compite con especies nativas locales (Sepúlveda, 2014). Es la principal fuente mundial de

carragenina semirrefinada, la cual es un estabilizante en la industria de alimentos, cosméticos y medicamentos. Tiene el potencial de regenerarse y gran tasa de crecimiento (Mauricio, 2010).

- ***Gelidium sclerophyllum***



Figura 5 *Gelidium sclerophyllum*

Fuente: iNaturalist

La macroalga *Gelidium sclerophyllum* pertenece a las algas rojas. Se encuentra distribuida especialmente en la costa del pacífico, se caracteriza por sus ápices anchos y redondeados de forma de corazón en ejes erectos maduros esbeltos y elongados (Rodríguez & Rivas-Lechuga 1997). Su reproducción es por propagación vegetativa o esporogénesis mitótica

3. CONTENIDO BIOQUÍMICO DE LAS MACROALGAS

- **Componentes nutritivos**

Las macroalgas presentan una alta concentración de proteínas, fibra dietética, minerales y vitaminas. Generalmente sus proteínas son ricas en glicina, arginina, alanina y ácido glutámico; aunque sus aminoácidos limitantes son la lisina y cistina. También son una fuente de vitaminas A, B1, B12, C, D y E. El 36% de su peso en seco está formado por los minerales, los macrominerales que se encuentran presentes son: el sodio, calcio, potasio, cloro, sulfuro y fósforo; entre los microminerales presentes están: yodo, hierro, zinc, cobre, selenio, molibdeno, flúor, manganeso, boro, níquel y cobalto. El contenido de lípidos es bajo, siendo los glicolípidos y lípidos neutros los

predominantes, a comparación de las plantas terrestres esta contiene menor ácidos grasos esenciales. La proporción de la fibra dietética va desde el 36-60% de la materia seca. (Quitral Vilma, 2012)

- **Componentes bioactivos**

Las macroalgas contienen compuestos bioactivos de alta capacidad como los polifenoles y carotenoides, estas moléculas son capaces de capturar radicales libres, quelar metales, aceptar y donar electrones e inactivar especies reactivas de oxígeno. En los pigmentos naturales principalmente se han encontrado propiedades antioxidantes, antiinflamatoria. Sus polifenoles tienen una alta capacidad antioxidante, antivirales, antibacteriano y vasodilatadores, los compuestos fenólicos tienen un rol primario como componente de la pared celular y también un rol secundario en defensa o respuestas al estrés ambiental. Las algas pardas han reportado poseer mayor contenido de antioxidantes que las verdes y rojas (Doménica, 2014). Las mayores actividades antimicrobianas en algas verdes se presentan mayor en extractos etanólicos sobre bacterias patógenas gram positivas (Jaramillo Annie, 2020)

- **Extracción de compuestos bioactivos**

Los métodos de extracción convencionales, como: maceración, reflujo o extracción Soxhlet demandan un alto consumo energético, bajo rendimiento y un bajo costo. Aunque los métodos de extracción más modernos, como: ultrasonido, pulsos eléctricos, extrusión, microondas resultan ser más amigables con el ambiente debido a que reducen el tiempo y uso de químicos además que hay un mejor rendimiento (Perez Maria, 2017). Los disolventes más usados para extracción de componentes bioactivos son metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y agua (Rubio, 2015).

4. BACTERIAS DEL GÉNERO VIBRIO QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL CAMARÓN

Las bacterias del género vibrio son patógenos oportunistas cuando el sistema inmunológico está deprimido, son bacterias gram negativas-móviles-anaerobias facultativas, 12 de las 48 especies son reconocidas como riesgos para los humanos.

Han sido causantes de pérdidas globales de hasta \$3000 millones de dólares y ha producido hasta el 100 % de mortalidades en la producción (BIOMIN, s.n).

- *Vibrio harveyi*

Es una cepa luminiscente gram negativa, tiene forma de bastón flagelada, su crecimiento es óptimo a temperaturas de 30- 35 °C. Están presentes en todas las etapas del ciclo de producción del camarón, pero es más nocivo causando mortalidades masivas en laboratorios de larva (BIOMIN, s.n). En Tailandia, este patógeno causo mortalidad entre el 70-100% de las larvas del camarón.

- *Vibrio vulnificus*

Es un bacilo lactosa positivo y anaerobia facultativa, para su desarrollo requiere temperaturas superiores a 20°C, no forma esporas y soporta alcalinidades elevadas (hasta ph 9). Es capaz de reducir nitratos a nitrito por poseer la enzima nitrato reductasa (Beatriz, 2020). Este vibrio apareció en el Ecuador alrededor de 1988 en hatcheries, presentando signos clínicos de branquias marrones- caparazón negro y necrosis hepatopancreática

- *Vibrio parahaemolyticus*

Es una bacteria aerobia facultativo, halófilico, fermentador de glucosa, pero no de sacarosa, el agua dulce inactiva al organismo. encuentran distribuidas en aguas tropicales de todo el mundo. Los síntomas clínicos principales son: letargia, cromatóforos extendidos, intestinos vacíos. Ciertas cepas pueden causar en los humanos gastroenteritis por mariscos contaminados (BIOMIN, s.n). La enfermedad necrosis hepatopancreática (AHPND o EMS) es causadas por estas cepas y ha ocasionado en el 2009 en Asia perdidas económicas que alcanzaron los 13300 millones de dólares (FAO, 2013).

- *Vibrio campbelli*

El vibrio *Campbellii* se considera un patógeno acuícola emergente, es una bacteria gram negativa con una forma de un bastón curvo. Provoca la enfermedad de vibriosis luminiscente en larvas de camarón, sus signos clínicos son: expansión de cromatóforos, músculo opaco y necrosis (Hameed et.al1996).

CAPÍTULO 2

5. METODOLOGÍA

5.1.1 Recolección de muestras



Figura 6 Zona de muestreo de macroalgas. Fuente: Google Earth

La zona del muestreo para las macroalgas silvestres *Acanthofora spicifera*, *Aspargopsis taxiformis* y *Gelidium sclerophyllum* está ubicada antes de llegar Ayangué (figura 2.1), cerca del antiguo laboratorio Aqualab. Estas macroalgas serán recolectadas en la zona intermareal profunda durante la marea más baja. Por lo que se revisó las mareas del mes de julio de la estación más cercana, en este caso la Estación Monteverde, resultando el horario de la tarde las bajamareas (figura 2.2).

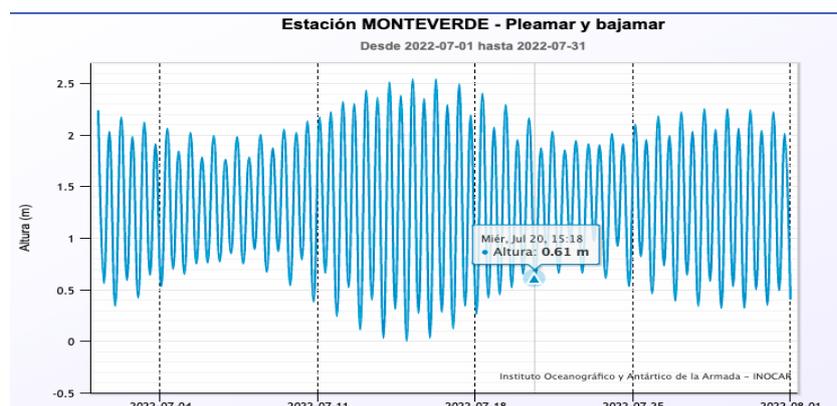


Figura 7 Gráfico de mareas de julio. Fuente: INOCAR

Para las especies de macroalgas cultivadas estas fueron colectadas directamente de las líneas de cultivo suspendido tanto de la comuna de santa rosa en Salinas (cultivo en producción de *Kappaphycus alvarezii*) como las establecidas en la comuna de palmar (cultivos experimentales de *Acanthophora spicifera*).

Para ambos casos las macroalgas serán transportada en coolers dentro de fundas herméticas a una temperatura de 8 a 10 °C. Una vez en el laboratorio las macroalgas serán lavadas con agua de mar filtrada y serán retiradas todas las especies no deseadas de macroalgas, epifitas y restos de arena.

5.1.2 Evaluación antimicrobiana

- **Actividad antibacteriana**

La actividad fue medida como la diferencia entre el crecimiento máximo de bacterias sin extractos ni antibióticos y como mínimo se utilizó el antibiótico Floranfencol a una concentración de 400ppm. Para las pruebas se utilizaron los extractos (agua y etanol en relación 1:1) contra las cepas proveniente del laboratorio de microbiología del CENAIM-ESPOL, patógena para camarones: *V. parahaemolyticus* (BA55) y *V. harveyi* las cuales eran mantenidas a -80 °C en caldo de triptona de soya suplementado con 2% (p/v) de NaCl (TSA) y 25-30% (v/v) de glicerol. Estas bacterias se reactivaron mediante incubación durante un periodo de 18-24 horas en 28 °C en caldo de triptasa de soya con 2% (p/v) de NaCl.

Para el análisis de actividad antimicrobiana se probaron 3 concentraciones de extractos (1, 5 y 10 mg/ml) los cuales fueron contrastados contra 2 especies de vibrios patógenos de camarón (*V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*), el control fue el solvente con el extracto a distintas concentraciones, el control negativo fue la bacteria con el medio, el control positivo fue el antibiótico floranfencol (400 ppm), el blanco de muestra fue el medio con el extracto y el cero fue el medio sin extracto ni bacteria. Se usaron placas

de microelisa para los análisis de 8 y 24 h mediante la revisión de la densidad óptica a 620 nm en el equipo Varioskan Lux. El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{100 \times (D0620 \text{ bac. totales} - D0620 \text{ medio}) - (D0620 \text{ muestra en prueba} - D0620 \text{ muestra en agua})}{(D0620 \text{ bac. totales} - D0620 \text{ blanco})}$$

5.1.3 Caracterización bioquímica de las macroalgas

- **Preparación de muestras para auxinas, fenoles y antioxidantes**

Para la identificación de auxinas, fenoles y antioxidantes se utilizó el método de extracción en etanol absoluto y agua en relación 1:1 (Sabeena, K.Dakota del Norte Jacobsen, C. 2009). El cual consistió:

1. Por cada muestra de macroalga se colocó 4g de muestra en un tubo Falcon
2. Se añadió 5 ml de agua miliQ, vortizó y refrigeró durante 24 horas.
3. Se descongeló y añadió 5 ml de etanol absoluto y nuevamente se refrigeró por 24 horas
4. Se centrifugó por 20 minutos a 3.5G y se recolecto el sobrenadante.
5. Se centrifuga el sobrenadante por 20 minutos a 3.5 G y se recolecta nuevamente el sobrenadante.

- **Cuantificación de Auxinas**

Para la identificación de auxinas se utilizó el método colorimétrico de Salkowski propuesto por Glickmann & Dessaux en 1995. Para la curva de calibración se utilizó como referencia el ácido indol-3-acético (TmMedia, USA). Para la preparación del blanco se utilizó el etanol absoluto para la lectura de las concentraciones se realizaron diluciones seriadas comenzando con concentraciones de 1000 µg/ml, se uso la placa microelisa y el equipo varioskanlux para la determinación de auxinas.

Concentración	Concentración Ácido indol-3-acético
Solución Madre	1000 µg

D1	0.5 µg
D2	0.25 µg
D3	0.125 µg
D4	0.0625 µg
D5	0.0312 µg
D6	0.0156 µg
D7	0.007 µg
D8	0.004 µg
D9	0.002 µg

Tabla 1 Diluciones del ácido indol-3-acético

A continuación, en una placa microelisa se vertieron 100 µl de la solución madre y de las nueve diluciones en su respectivo posillo y para la reacción colorimétrica y se añadieron 200 µl de la solución Salkowski a cada posillo y se esperan 30 min para su posterior lectura en el equipo Varioskan Lux a una longitud de onda de 530 nm, esta curva de calibración será utilizada para determinar el contenido de auxinas en base al Indol-3-acético en las muestras de macroalgas.

De las muestras de macroalgas centrifugadas se realizará la reacción directamente en las placas microelisa para esto se colocará 100 µl de cada extracto en por triplicado en cada pocillo de 300 µl de capacidad y se agregará 200 µl del reactivo de Salkowski, las cuales serán leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm. Esta relación nos permite estimar el contenido de auxinas totales en base al Indol-3-acético.

- **Cuantificación de Fenoles**

Los fenoles totales se determinaron de cada muestra de extractos en base al método espectrofotométrico basado en (Zong et,al 2020) con algunas modificaciones, el procedimiento fue el siguiente:

1. Se colocó en una placa microelisa 25 µl de la extracción de macroalgas, por cada macroalga se realizó 2 réplicas.

2. Se agregó 25 µl de solución Folin-Ciocalteu al 25% y una solución de agua y etanol con una relación 1:1
3. Después de 5 min, se añade 25 µl de la solución de carbonato de sodio al 10%.
4. Se cubrió la placa con papel aluminio y dejó reaccionar durante una hora
5. Finalmente, se coloca la placa de microelisa para ser leída espectrofotométricamente en el equipo Varioskan Lux a una longitud de onda 765nm para su lectura.

- **Cuantificación de ficocianina y ficoeritrina**

Para la identificación de ficocianina y ficoeritrina se usa el método de extracción de pigmentos hidrosolubles. Por cada macroalga a analizar se realizó el siguiente procedimiento (Hende et,al 2012).:

1. Se pesó 4 g de una muestra molida de macroalga y se coloca en un tubo falcón
2. Se Añade 10 ml de agua miliQ y se envuelve con papel aluminio.
3. Se deja reposar en el congelador a - 4°C durante 24 horas. Después se descongela y vuelve congelar y finalmente se descongela.
4. Se centrifuga la muestra a 3.5 G por 20 minutos y se colecta el sobrenadante.
5. Se centrifuga el sobrenadante a 3.5 G por 20 minutos, se lo recolecta y lee en el espectrofotómetro.

Para los análisis de cuantificación se usó el espectrofotómetro. El blanco para todas las muestras fue el agua miliQ. Se configurará al equipo de la siguiente manera:

1. Para la medición de ficocianina se configuro al equipo con las longitudes de onda 618, 645 y 592.
2. Para la medición de ficoeritrina se configuro al equipo con las longitudes de onda 564, 592 y 455.
3. Estas longitudes representan los picos de lectura de los pigmentos, utilizados dentro de la fórmula

$$\text{Concentración Ficocianina} = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) * 0.15] * 0.15$$

$$\text{Concentración Ficoeritrina} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) * 0.2] * 0.12$$

- **Cuantificación de pigmentos**

Para medir el contenido total de clorofila a (Chla), y carotenoides totales, de cada uno de los extractos de algas, el método utilizado es descrito por (Lightner et,al 2012). Para este procedimiento se usó una extracción de muestras de algas en etanol, en cual consistió:

1. Colocar 4g de macroalgas molidas en un tubo falcón.
2. Añadir 10 ml de etanol al 95% en el tubo falcón.
3. Cubrir el tubo con papel aluminio y colocarlo en la refrigeradora por 5 días
4. Después centrifugar la muestra por 20 minutos a 3.5G y trasvasar el sobrenadante.
5. Centrifugar el sobrenadante por 20 minutos a 3.5 G

Para la medición de la clorofila a se realizó espectrofotométricamente a las siguientes longitudes de onda 666nm, 667 nm, 750nm y también se realiza nuevamente mediciones a 667nm y 750 nm estas últimas con la adición 100 µl de ácido clorhídrico 1N.

Y para la medición espectrofotométrica de carotenoides se analizaron las siguientes longitudes de ondas 664.1 nm, 648.6 nm y 470 nm. Para todas las muestras tanto de clorofila a como carotenoides el blanco se preparó con etanol al 95%, mezclando 4.5 ml de etanol con 500 µl de agua miliQ.

- **Actividad antioxidante total**

Los distintos extractos de macroalgas fueron analizados para determinar la actividad antioxidante, utilizando el método de captura radical DPPH, propuesto por (Murray et,al 2004). Para preparar el DPPH al 0,004% se añadió en un vaso de precipitación 100 ml de etanol y 4mg de DPPH. El blanco fue una solución en proporción 1:1 de etanol y el control fue el reactivo DPPH. Para la detección de la actividad antioxidante de los extractos de las macroalgas se realizaron los siguientes procedimientos:

1. En un tubo de 5 ml, colocar 3,2 ml de la solución de DPPH
2. y añadir 200 µg del extracto de macroalgas.

3. Tras 15 minutos de reacción, trasvasar a una placa microelisa 200 μg de la reacción (3 réplicas por muestra), el blanco y el control.
4. Cubrir con aluminio la placa y esperar 12 min (tiempo total de reacción 30 min)
5. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm

.....

CAPÍTULO 3

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

- **Inhibición del crecimiento bacteriano**

Para la inhibición del crecimiento bacteriano se usaron los extractos con agua-etanol de las macroalgas *Aspargopsis taxiformis* (AT), *Gelidium sclerophyllum* (GS), *Acanthofora spicifera* (AS), *Acanthofora spicifera* (ASC) y *Kappaphicus alvarezzi* (KA) sobre el *V.parahemolitycus* y *V.harveyi*. Los extractos se colocaron a distintas concentraciones identificando cada muestra con los números 1-2-3, siendo la 3 la muestra más concentrada y la 1 la menos concentrada.

Se pudo evidenciar un efecto en la inhibición temprana en todas las macroalgas probadas a todas las concentraciones (Tabla 3.1), pero resulta evidente que las concentraciones más altas mostraron los mejores porcentajes de inhibición, siendo la especie con mayor inhibición *Gelidium sclerophyllum* (GS3) con una inhibición de 81%, en segundo lugar, *Aspargopsis taxiformis* (AT3) con 66%, seguido por *Acanthofora spicifera* cultivada (ASC3) con 61.3%; y sin cultivar (AS) 49,9%. *Kappaphicus alvarezzi* (KA1) con un 29,3% de inhibición a las 8 horas fue la menor observación reportada para la concentración 3 (10ml/ml). Se pudieron observar diferencias significativas entre las 3 concentraciones para las 5 macroalgas estudiadas siendo evidente la mayor inhibición de GS, ASC y AS en todos los casos para *V. parahemolitycus*. Al observar el efecto de las concentraciones de macroalgas en las diferentes especies sobre *V. harveyi* es importante destacar que se mantienen la misma tendencia en el aumento de la inhibición con la mayor concentración del extracto, con la excepción de GS en la cual se obtuvo una inhibición de 81,9% desde las concentraciones más bajas, por lo cual no presento diferencias significativas a diferencias del resto de las macroalgas. Estas observaciones dejan en evidencia la actividad antibacteriana diferenciada que tienen las concentraciones y las especies de macroalgas entre sí de manera temprana, con efectos altos entre 80-60 en las primeras 8 horas de exposición a los extractos para ambas especies de vibrios probados.

INHIBICIÓN 8 HORAS						
Macroalgas	%Inhibición <i>V.parahemolitycus</i>			%Inhibición <i>V.harveyi</i>		
	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
<i>Acanthofora specifera</i>	2.4	8.6	46.9	26	26	38
<i>Acanthofora specifera Cult</i>	8.2	14.2	61.3	38.2	44.5	66.7
<i>Aspargopsis taxiformis</i>	2.6	2.3	66.0	11.7	21.5	69.5
<i>Kappaficus alvarezzi</i>	0.6	8.4	29.3	21.3	28.4	29.3
<i>Gelidium</i>	25.7	25.3	81.0	81.9	81.9	81

Tabla 2 Inhibición bacteriana a las 8 horas de 5 diferentes extractos de macroalgas

A las 24 horas los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano fue con la macroalga *G. sclerophyllum* en sus tres concentraciones con un 82,5, 84,2 y 97,7% de inhibición respectivamente para las 3 concentraciones seguida por *A. spicifera* cultivada con 36,3, 34,2 y 76,2%. Mientras que un segundo grupo firmado por *A. taxiformis*, *A. spicifera* y *K. alvarezzi* para la concentración 1 presentaron un rango de 25,8-24%, concentración 2 de 25,8-23,9% y concentración 3 64,6-36,4% para *V. parahemolitycus*. para todas las muestras de macroalgas, en líneas generales se pudo observar diferencias significativas ($P < 0.05$), formando grupos similares en las concentraciones 1 y 2, mientras que la concentración 3 para todas las macroalgas fueron diferentes y mayores in inhibición. De este análisis solo *G. sclerophyllum* no mostro diferencias significativas entre grupos obteniendo las más altas inhibiciones desde las concentraciones mas bajas.

Para la inhibición de *V.harveyi*, *G. sclerophyllum* fue la macroalga que mostro mayor inhibición en todas las concentraciones con un rango entre el 82,9% en la concentración 1 y 98,9% en la concentración más alta y seguido de *A. spicifera cultivada* con un rango de inhibición de 66,3 hasta 71,6 en la concentración más alta, para ambas especies no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones probadas ($P > 0.05$). Para el resto de las muestras de las especies *A. taxiformis*, *A. spicifera sin cultivar* y *K. alvarezzi* el porcentaje de inhibición en la concentración 1 estuvo entre el 29-61%, concentración 2 29,9-62,3% y concentración 3 37-62,5% las cuales resultaron ser resultaron ser mayores a las observadas al mismo tiempo para *V. parahemolitycus*. *A. spicifera sin cultivar* y *K. alvarezzi* no mostraron diferencias significativas entre concentraciones ($P > 0.05$) mientras que *A. taxiformis* si

presento diferencias formándose 2 grupos uno en las concentraciones 1 y 2 con y las inhibición más altas en la concentración 3.

INHIBICIÓN 24 HORAS						
Macroalgas	%Inhibición <i>V.parahemolitycus</i>			%Inhibición <i>V.harveyi</i>		
	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
<i>Acanthofora specifera</i>	24.8	25	44.3	61	62.3	62.5
<i>Acanthofora specifera Cult</i>	36.3	34.2	76.2	66.3	66.8	71.6
<i>Aspargopsis taxiformis</i>	24.0	23.9	64.6	29	29.9	61.9
<i>Kappaficus alvarezzi</i>	25.8	25.8	36.4	31.8	35.8	37
<i>Gelidium</i>	82.5	84.2	97.7	82.9	84.8	98.9

Tabla 3 Inhibición bacteriana a las 24 horas

- **Actividad antioxidante**

La actividad Antioxidante fue medida en base a su porcentaje de inhibición cuando es medida en base al estándar de trolox. Los extractos que presentaron mayor porcentaje de actividad antioxidante fueron las macroalgas *Acanthofora spicifera* cultivada y la *Acantophora spicifera*, seguido de *A. taxiformis* y *G. sclerophyllum* y el extracto que presento menor actividad antioxidante fue la macroalga *Kappaphicus alvarezzi*.

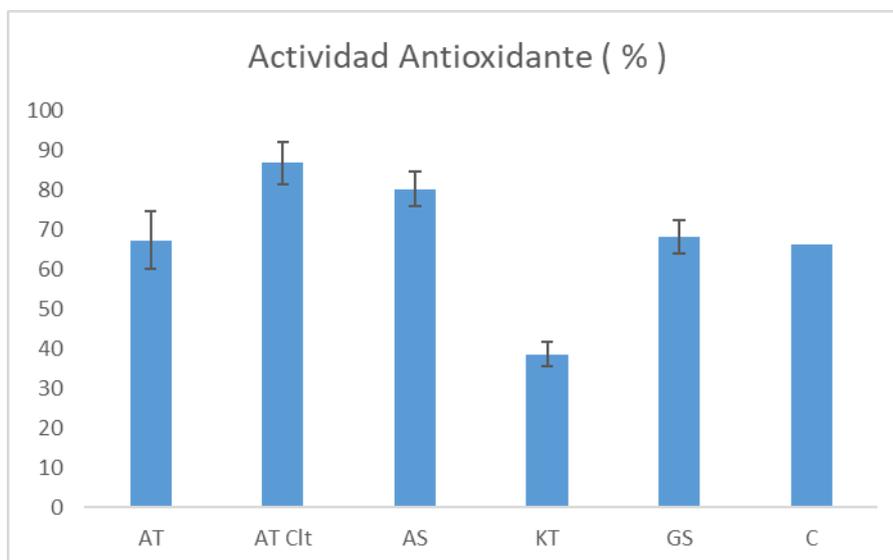


Figura 8 Porcentajes de la actividad antioxidante

- **Concentraciones de Auxinas**

La mayor concentración de auxinas se obtuvo de los extractos de la macroalga *Kappaphycus alvarezzi* con una concentración 34.41 $\mu\text{g/g}$, seguida de la macroalga *Acantophora spicifera* no cultivada con una concentración de 16.45 $\mu\text{g/g}$ y la cultivada con 2,63 $\mu\text{g/g}$. Las menores concentración de auxinas fueron la macroalga *Asparagopsis taxiformis* 0,31 $\mu\text{g/g}$ y *Gelidium sclerophyllum* con 0.15 $\mu\text{g/g}$

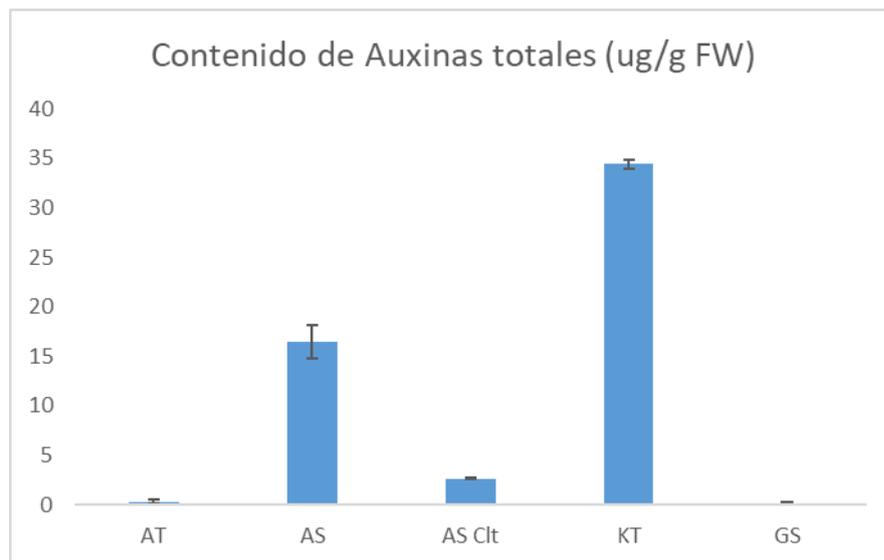


Figura 9 Concentraciones de auxinas totales en macroalgas

- **Concentraciones de Fenoles**

Se midió las concentraciones de Fenoles de las distintas macroalgas, obteniendo la mayor concentración la macroalga *Kappaphycus alvarezzi* con una concentración 20.29 $\mu\text{g/g}$, seguida por la macroalga *Acantophora spicifera* con una concentración de 15.27 $\mu\text{g/g}$. La menor concentración de fenoles obtuvo la macroalga *Asparagopsis taxiformis* con una concentración de 10.96 $\mu\text{g/g}$. La macroalga *Acanthophora specifera* cultivada contiene mayor concentración que la recolectada del medio, con una diferencia de 2.9 $\mu\text{g/g}$

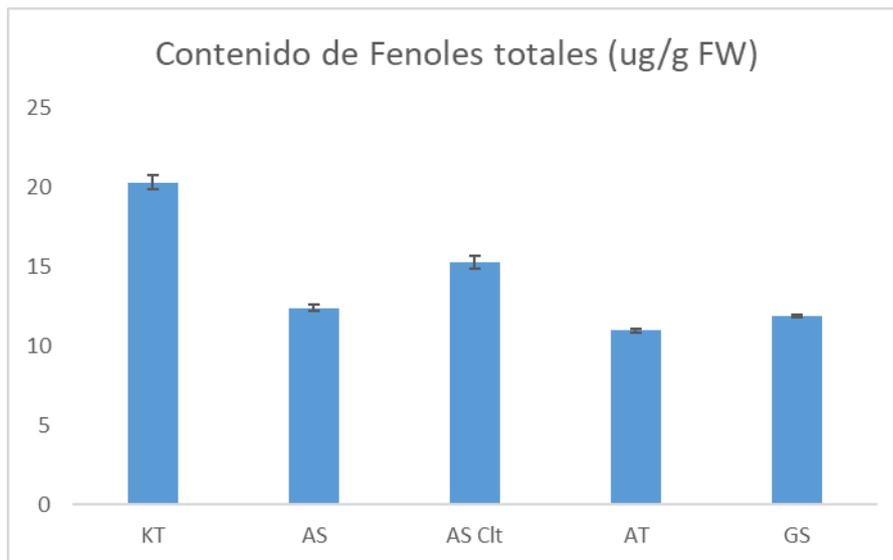


Figura 10 Concentraciones de fenoles en macroalgas

- **Concentración de ficocianina y ficoeritrina**

Se midió la concentración de ficocianina obteniendo la mayor concentración en la macroalga *Aspargopsis taxiformis* con 0.068 mg/g, seguido por la macroalga *Acantophora spicifera* con una concentración de 0.042 mg/g resultaron las concentraciones más altas siendo hasta un 82% menos en las otras 2 especies de macroalgas. Las concentraciones de ficoeritrinas fueron mayores en la macroalga *Acantophora spicifera* con una concentración de 0.071 mg/g, seguida de la macroalga *Aspargopsis taxiformis* con una concentración de 0.046 mg/g siendo *Acanthophora spicifera* y *Gelidium sclerophyllum* las menores concentraciones entre 0,019 y 0,018 mg/g

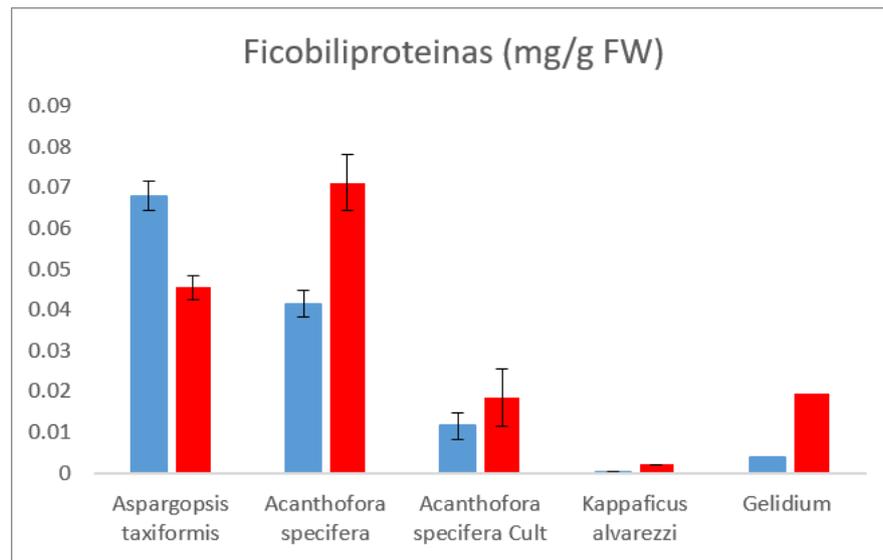


Figura 11 Concentraciones de ficobiliproteínas en macroalgas

- **Contenido de Clorofila**

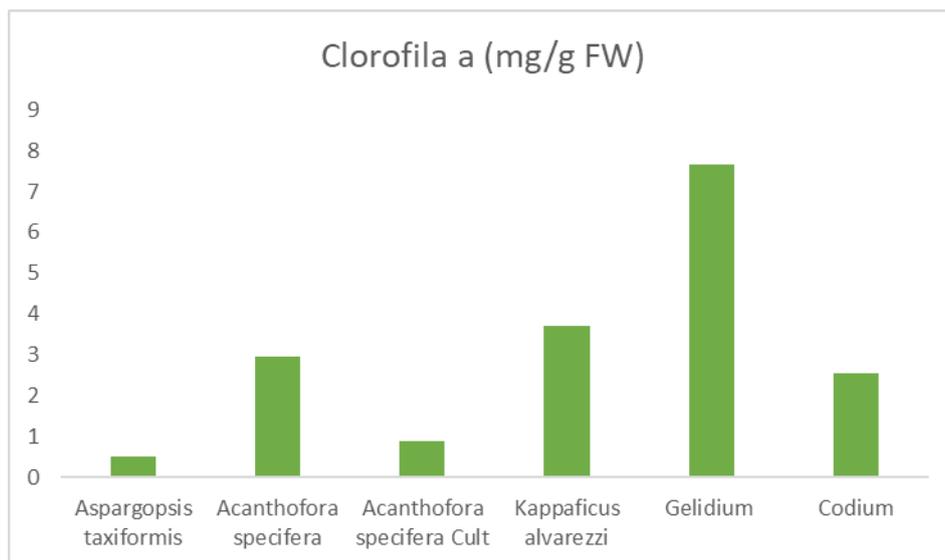


Figura 12 Concentraciones de clorofila en macroalgas

Las concentraciones de clorofila *a* fueron mayores en la macroalga *Gelidium sclerophyllum* con una concentración de 7.66 mg/g, seguida por la macroalga *Kappaphicus alvarezzi* con una concentración de 3.7 mg/g y la concentración más baja fue de 0.51 mg/g en la macroalga *Aspargopsis taxiformis*

- **Carotenoides**

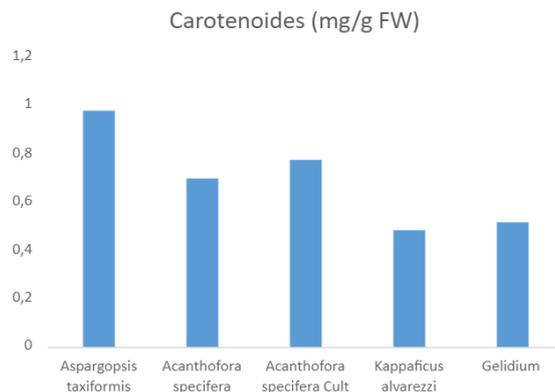


Figura 13 Concentración de carotenoides en macroalgas

La macroalga que presentó una mayor cantidad de carotenoides fue la *Aspargopsis taxiformis* con una concentración de 0.97 mg/g FW, seguido por la macroalga *Acanthophora specifera* cultivada y la *Acanthophora specifera* silvestre con concentraciones de 0.77 mg/g FW y 0.69 mg/g FW respectivamente.

- **Presupuesto del proyecto**

Para la determinación del porcentaje de inhibición antibacteriana e identificación de biocompuestos de los extractos de macroalgas se realizaron en los laboratorios de análisis químico y microbiología del CENAIM durante 2 semanas. El cual tuvo un costo total de \$1647.

PRESUPUESTO DEL ENSAYO		
Cantidad	Materiales	Costo
100	Tubos Falcon de 10 ml	\$ 50.00
100	Tubos Falcon de 45 ml	\$ 70.00
1	Cooler	\$ 10.00
4 L	Agua miliQ	\$ -
1L	Etanol al 99%	\$ 90.00
1	Reactivo de Salkowski	\$ 75.00
1	Ácido indol-3-acético	\$ 160.00
1	Micropipeta 100 ul	\$ 280.00
1	Micropipeta 1000 ul	\$ 200.00
6	Placas microelisa	\$ 300.00
1	Reactivo Folin-Ciocalteu	\$ 56.00
1	Solución Carbonato de sodio al 10 %	\$ 61.00
1	Reactivo DPPH	\$ 120.00
1	Agar LB Miller	\$ 71.00

1	Cepa de <i>V.parahemolitycus</i>	\$ -
1	Cepa de <i>V. harveyi</i>	\$ -
1	Alquiler de laboratorio	\$ 104.00
TOTAL		\$ 1,647.00

Tabla 4 Presupuesto del ensayo

CAPÍTULO 4

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Todas las macroalgas estudiadas presentaron efectos de inhibición bacteriana con diferencias en su efectividad siendo *Gelidium sclerophyllum* la que presenta mayor inhibición bacteriana tanto en el *Vibrio parahaemolyticus* como el *Vibrio harveyi*, incluso con exposiciones cortas de 8 horas es posible obtener una inhibición del 81% y alcanzar su máximo a las 24 horas con 97.7%, adicionalmente *Acantophora spicifera* también mostro altos niveles de inhibición para ambas especies de bacterias.
- Es importante resaltar que la concentración del extracto tuvo influencia en la efectividad de estos a excepción de *Gelidium sclerophyllum* donde no se observan diferencias entre las concentraciones más bajas y las más altas que sean significativas, por lo cual se pueden utilizar concentraciones de 1mg/ml y obtener altos niveles de inhibición en periodos cortos de tiempo
- Se pudo evidenciar una alta variabilidad entre los biocompuestos analizados, obteniendo concentraciones dentro de los rangos normales para algas verdes, rojas y pardas, los cuales tienen comprobada actividad antibacteriana como Fenoles y actividad antioxidante.
- Los biocompuestos analizados no muestran una relación directa con el efecto obtenido en la inhibición de actividad antibacteriana, esto puede estar principalmente asociado a la alta variabilidad observada entre los biocompuestos o que es posible que el compuesto que aporta más a la actividad bactericida no este siendo medido en este estudio.

Recomendaciones

- Variar las proporciones para las extracciones de agua-etanol para determinar si existen diferencias en el contenido general de biocompuestos y el impacto que

tiene esta relación en la actividad antimicrobiana de bacterias patógenas de interés para el camarón.

- Para que el sector con potencial de uso de macroalgas es necesario aportar con tecnología de producción de macroalgas para evitar la depredación de la biomasa del medio.
- Para efectos de este estudio se realizó un análisis basado en un mix de biocompuestos que interactúan de forma unificada en la inhibición bacteriana. Por lo tanto, sería interesante evaluar cuál es el efecto de cada uno de esos compuestos en particular para poder identificar cual es el efecto que tiene cada uno para la inhibición del crecimiento bacteriano.
- Basado en los resultados obtenidos, se recomienda realizar bioensayos para determinar la inhibición bacteriana con los distintos extractos de macroalgas en condiciones *in vivo*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adrian Espinosa-Antón, R. H.-H.-G. (30 de noviembre de 2020). *Potencial de las macroalgas marinas como bioestimulantes en la producción agrícola en Cuba*. Obtenido de Scielo: <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v48n3/0253-5785-cag-48-03-81.pdf>
- Alejandro, R. (2021). *Las macroalgas: tus mayores aliadas contra los nitratos y fosfatos en acuarios marinos*.
- Beatriz, L. (2020). *Vibrio vulnificus: características, morfología, enfermedades, tratamientos*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/vibrio-vulnificus/>
- BIOMIN. (s.n). *Vibrio en la acuicultura del camarón*. Obtenido de <https://www.biomin.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/#:~:text=La%20vibriosis%20es%20una%20enfermedad,crust%C3%A1ceos%20marinos%2C%20incluido%20el%20camar%C3%B3n.>
- Daniela, S. M. (2022). *Enfermedades que afectaron la producción de camarón y análisis de las exportaciones de camarón en el Ecuador*. Obtenido de UPSE: <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8084/4/UPSE-TBI-2022-0024.pdf>
- Darwin, F. C. (s.n). *Listas de Especies de Galápagos*. Obtenido de <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=1318>
- Doménica, C. (2014). *Universidad de Chile*. Obtenido de Extracción de Antioxidantes Polifenólicos desde macroalgas *Macrocystis Pyrifera* y *Ulva Rigida*: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132021/Extraccion-de-antioxidantes-polifenolicos-desde-macroalgas.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Eric, N. (2006). *Ecuador después de la Mancha Blanca*. Guayaquil: Industria Acuicola.
- FAO. (2020). *Estado mundial de la pesca y acuicultura*. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ca9229es/online/ca9229es.html#tab7>
- Genovese G, F. C. (Febrero de 2012). *ScienceDirect*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113611001358>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 793-796.
- Hende, V. D. (2012). Microalgal Bacterial Floc Properties Are Improved by a Balanced Inorganic/Organic Carbon Ratio. *Biotechnology and Bioengineering*, 550-558.

- Jaramillo Annie, Y. S. (2020). *Revisión de metodologías de extracción para búsqueda de un potencial cosmeceútico de macroalgas: búsqueda de propiedades antioxidantes y antimicrobianas.* Obtenido de <https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/5627/Trabajo%20de%20grado.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Jaramillo Annie, Y. S. (s.n). *Revisión de metodologías de extracción para la búsqueda de un potencial cosmocéutico de macroalgas: Búsqueda de propiedades antioxidantes y antimicrobiana.* Obtenido de <https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/5627/Trabajo%20de%20grado.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Joana, R. (2015). *“Extracción de compuestos bioactivos mediante pretratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas.* Obtenido de <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/32083/TFG-G3026.pdf?sequence=1>
- Lewis, J. (junio de 2000). *CABI.* Obtenido de Compendio de especies invasoras: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107763#toplantType>
- Marjorie, C. (2021). *Repositorio ESPE.* Obtenido de Estudio de la producción de carragenina y su demanda a nivel mundial y nacional: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/25022>
- Mauricio, M. (2010). *Potencial Farmacológico de Algas Marinas de Baja California Sur.* Obtenido de <https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14075/1/munozo2.pdf>
- Méndez, D. S. (2022). *Enfermedades que afectaron la producción de camarón y análisis de las exportaciones de camarón en el Ecuador.* Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8084/4/UPSE-TBI-2022-0024.pdf>
- Ministerio de agricultura, p. y. (9 de Abril de 2021). *Algas y GEI en la producción animal.* Obtenido de Noticias del Exterior: https://www.mapa.gob.es/images/es/bne46819eeuuagp-ga-conyres_tcm30-560703.pdf
- Perez Maria, H. L. (2017). *Scielo.* Obtenido de Extracción de compuestos bioactivos de Pitahaya Roja, aplicando pretratamientos con microondas, ultra sonido y

enzimáticos: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000200135

Primicias. (2021). *Camarón y minería impulsan las exportaciones no petroleras en 2021*. Obtenido de <https://www.primicias.ec/noticias/economia/camaron-mineria-exportaciones-no-petroleras/>

Quiral Vilma, M. C. (2012). *Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional*. Obtenido de [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000400014#:~:text=El%20contenido%20en%20minerales%20en,queso%20\(21%2C%2022\)](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000400014#:~:text=El%20contenido%20en%20minerales%20en,queso%20(21%2C%2022).).

Sepúlveda, M. (2014). *Academia Edu*. Obtenido de https://www.academia.edu/14894750/FICHA_AMBIENTAL_MINISTERIO_AMBIENTE_MARICULTURA_MACROALGAS_EN_ECUADOR

V. Lavakumar, K. N. (febrero de 2012). *Efecto antioxidante y anticancerígeno de la Acanthofoora spicifera*. Obtenido de https://www.academia.edu/21278560/Anti_cancer_and_Antioxidant_Effect_of_Acanthophora_spicifera_against_EAC_induced_carcinoma_in_mice