

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Factibilidad del uso de extractos crudos de microalgas para controlar la
virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*

VIDA-375

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Roxana Mayerly López Solórzano

Matías Alejandro Ocaña Ramírez

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

A mi gonita y a mi padrecito, por su amor incondicional y todo su cariño; a mi miñimiñi, por ser el mejor hermano y siempre estar a mi lado para guiarme; a mis amigos, Kenneth y Joan, por llenar mis días de risas, momentos inolvidables y una amistad sincera; y a mi Matu, el mejor compañero de tesis, por compartir conmigo cada desvelo.

Los quiero mucho.

- **Roxana López**

A mis padres y hermanos, por haber sido mi motivación para estudiar esta carrera y por siempre haberme guiado y ser mi compañía en toda esta travesía; y a Roxy, no solo la mejor compañera de tesis, sino la mejor compañera de vida que Dios me pudo dar.

Este y mis futuros logros van por ustedes, lo quiero mucho.

- **Matías Ocaña**

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento a nuestra tutora Bonny Bayot, por sus consejos, apoyo y confianza durante todo este trabajo. Al departamento de Microbiología de CENAIM, con quienes compartimos grandes momentos y experiencias, especialmente a Ramiro Solórzano, Juan Muñoz, Rosa Malavé, Martha Borbor, Karina Reyes, Doris Reyes. Su apoyo incondicional y sus enseñanzas son algo que llevaremos en nuestros corazones.

Declaración Expresa

Nosotros Roxana Mayerly López Solórzano y Matías Alejandro Ocaña Ramírez acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 10 de febrero del 2025.

Roxana Mayerly López
Solórzano

Matías Alejandro Ocaña
Ramírez

Evaluadores

Wilfrido Ernesto Arguello Guevara

Profesor de Materia

Bonny Narcisa Bayot Arroyo

Tutor de proyecto

Resumen

La larvicultura de camarón *Penaeus vannamei* enfrenta importantes desafíos debido a las infecciones con Vibrios patógenos, especialmente por la especie *Vibrio parahaemolyticus*, lo que puede generar hasta un 100 % de mortalidad y provocar pérdidas económicas. Este estudio evaluó el efecto de extractos crudos de microalgas sobre dos factores de virulencia: motilidad de enjambre y formación de biopelículas, con el fin de identificar una alternativa biotecnológica al uso de antibióticos. Se realizaron ensayos con extractos crudos de diez especies de microalgas a tres concentraciones (0.1, 1 y 10 ppm), evaluando su impacto sobre la motilidad de enjambre, la formación de biopelículas y el crecimiento bacteriano. Los extractos de las diez especies redujeron la motilidad de *V. parahaemolyticus* por lo que podrían a futuro ser útiles para tratamientos preventivos (infecciones agudas) de infecciones con *V. parahaemolyticus*. En tanto que, cinco de las diez especies estudiadas mostraron una inhibición significativa de las biopelículas a la concentración más baja (0.1 ppm), posicionándolas como candidatas con mayor potencialidad para el control del patógeno dada su capacidad para disminuir ambos factores de virulencia (motilidad de enjambre y biopelículas), destacando particularmente una de las cinco especies por inhibir las biopelículas a todas las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: Larvicultura, *Vibrio parahaemolyticus*, extractos de microalgas, antibióticos, antivirulencia.

Abstract

Penaeus vannamei shrimp larviculture faces significant challenges due to infections with *Vibrio* pathogens, especially *Vibrio parahaemolyticus* species, which can cause up to 100% mortality and economic losses. This study evaluated the effect of crude microalgal extracts on two virulence factors: swarming motility and biofilm formation, in order to identify a biotechnological alternative to the use of antibiotics. Crude extracts of ten microalgal species were tested at three concentrations (0.1, 1 and 10 ppm) to evaluate their effect on swarming motility, biofilm formation and bacterial growth. The extracts of the ten species reduced the motility of *V. parahaemolyticus* and could therefore be useful in the future for the preventive treatment (acute infections) of *V. parahaemolyticus* infections. Meanwhile, five of the ten species studied showed significant inhibition of biofilms at the lowest concentration (0.1 ppm), positioning them as candidates with greater potential for pathogen control given their ability to reduce both virulence factors (swarm motility and biofilms), with one of the five species standing out for inhibiting biofilms at all concentrations evaluated.

Keywords: *Larviculture, Vibrio parahaemolyticus, microalgal extracts, antibiotics, antivirulence.*

Índice general

Resumen.....	6
<i>Abstract</i>	7
Índice general.....	8
Abreviaturas	10
Simbología	11
Índice de figuras.....	12
Índice de tablas.....	16
Capítulo 1	18
1.1 Introducción	19
1.2 Descripción del Problema.....	20
1.3 Justificación del Problema	20
1.4 Objetivos	21
1.4.1 Objetivo general	21
1.4.2 Objetivos específicos.....	21
1.5 Marco teórico	21
1.5.1 Impacto de la intensificación acuícola en la sostenibilidad.....	21
1.5.2 Factores de virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22
1.5.3 El uso de microalgas para combatir la resistencia antimicrobiana.....	23
1.5.4 Terapias antivirulentas.....	23
Capítulo 2	25
2. Metodología	26
2.1 Producción de Microalgas.....	26
2.2 Obtención de extractos crudos de microalgas.....	26
2.3 Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	27
Capítulo 3	31

3. Resultados y análisis	32
3.1 Efecto de los extractos crudos de microalgas sobre el crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
3.1.1 Curvas de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i>	32
3.1.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana a los extractos crudos de microalgas.....	32
3.2 Efecto de los extractos crudos de microalgas sobre factores de virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i>	33
3.2.1 Motilidad de enjambre.....	33
3.2.2 Formación de biopelículas.....	33
3.3 Flujograma	64
Capítulo 4	66
4.1 Conclusiones y recomendaciones	67
4.1.1 Conclusiones	67
4.1.2 Recomendaciones	70
Referencias.....	73

Abreviaturas

AHPND: Enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (siglas en inglés).

EPA: Ácido eicosapentaenoico.

EPS: Exopolisacáridos.

MH: Agar Mueller Hinton.

OD: Densidad óptica (siglas en inglés).

PL: Postlarva.

Simbología

%: Porcentaje.

°C: Temperatura en grados centígrados.

h: Horas.

min: Minutos.

L: Litro.

mL: Mililitro.

mg: Miligramo.

mm: Milímetro.

μL: Microlitro.

μ: Micro.

ppm: Partes por millón.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

HCl: Ácido clorhídrico.

KCl: Cloruro de potasio.

NaCl: Cloruro de sodio.

Índice de figuras

Figura 1. Producción de microalgas.....	26
Figura 2. Obtención de extractos crudos de microalgas.....	26
Figura 3. Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	27
Figura 4. Curvas de crecimiento.....	27
Figura 5. Antibiograma.....	28
Figura 6. Producción de biopelículas.	29
Figura 7. Motilidad de enjambre.	29
Figura 8. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	35
Figura 9. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	35
Figura 10. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	36
Figura 11. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	36
Figura 12. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	38
Figura 13. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 2, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	38
Figura 14. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	39
Figura 15. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin	

extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	39
Figura 16. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	41
Figura 17. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 3, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	41
Figura 18. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	42
Figura 19. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	42
Figura 20. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	44
Figura 21. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 4, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	44
Figura 22. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	45
Figura 23. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	45
Figura 24. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	47
Figura 25. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 5, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	47

Figura 26. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	48
Figura 27. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	48
Figura 28. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	50
Figura 29. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 6, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	50
Figura 30. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	51
Figura 31. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	51
Figura 32. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	53
Figura 33. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	53
Figura 34. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	54
Figura 35. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	54

Figura 36. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 2 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	56
Figura 37. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 2, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	56
Figura 38. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Diatomea 2 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	57
Figura 39. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 2 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	57
Figura 40. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 3 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	59
Figura 41. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 3, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	59
Figura 42. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Diatomea 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	60
Figura 43. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	60
Figura 44. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).....	62
Figura 45. Prueba de sensibilidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Haptofita 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.	62

Figura 46. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.....	63
Figura 47. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.	63
Figura 48. Flujograma	65

Índice de tablas

Tabla 1. Crecimiento de la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	34
Tabla 2. Crecimiento de la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	37
Tabla 3. Crecimiento de la bacteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	40
Tabla 4. Crecimiento bacteriano (OD_{600} nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 4 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	43
Tabla 5. Crecimiento bacteriano (OD_{600} nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 5 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	46

Tabla 6. Crecimiento bacteriano (<i>OD</i> 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 6 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	49
Tabla 7. Crecimiento bacteriano (<i>OD</i> 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Diatomea 1 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	52
Tabla 8. Crecimiento bacteriano (<i>OD</i> 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Diatomea 2 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	55
Tabla 9. Crecimiento bacteriano (<i>OD</i> 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Diatomea 3 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	58
Tabla 10. Crecimiento bacteriano (<i>OD</i> 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Haptofita 1 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	61
Tabla 11. Costo de producción de 5 gramos de extracto crudo de microalgas.....	70
Tabla 12. Proyección financiera de un ciclo de producción en un laboratorio de larvas.	70

Capítulo 1

1.1 Introducción

El camarón de cultivo *Penaeus vannamei* es el primer producto de exportación no petrolero del Ecuador (BCE, 2023). En el 2023, la industria camaronesa generó 1.2 millones de toneladas métricas lo que representó un ingreso en exportación de \$ 6.288.727, ratificándose como uno de los pilares económicos del país (CNA, 2023).

Sin embargo, la intensificación del cultivo de camarón conlleva a problemas sanitarios que ocasionan importantes pérdidas económicas (Yu et al., 2020). Aproximadamente, el 20% de las pérdidas estimadas en la acuicultura de camarón son ocasionadas principalmente por infecciones bacterianas, predominantemente por *Vibrio* spp (Flegel, 2012). En particular, las enfermedades conocidas genéricamente como vibriosis, causadas por bacterias del género *Vibrio*, son consideradas una amenaza global para la industria del camarón (Abdel-Latif et al., 2022). Una de las vibriosis más emergentes en camarones *P. vannamei* es la necrosis hepatopancreática aguda – AHPND causada principalmente por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (Kumar et al. 2021). La enfermedad provoca mortalidades masivas en etapas tempranas en los estanques de camarón, alcanzando una pérdida total de la producción luego de pocos días después de la infección (Yu et al., 2020). AHPND también afecta a los estadios postlarvarios de camarón, siendo denominada provisionalmente como enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda postlarvaria - PL-AHPND (Intriago et al., 2023).

Los antibióticos es el tratamiento tradicional para tratar las enfermedades bacterianas en acuicultura (Zhou et al., 2022). Sin embargo, el uso inapropiado de antibióticos en los sistemas de cultivo puede provocar el desarrollo de resistencia antimicrobiana, contribuyendo a un problema de salud pública a nivel mundial. En particular, *V. parahaemolyticus* muestra un aumento en la resistencia a los antimicrobianos (Mok et al., 2021), lo que puede tener efectos negativos en los organismos acuáticos, consumidores y medio ambiente (Rahman et al., 2017).

En consecuencia, es importante implementar métodos naturales para tratar a las enfermedades bacterianas de camarón. En tal sentido, los fitoquímicos, tales como extractos de microalgas marinas, han ganado una considerable atención en la última década para la prevención y manejo de enfermedades en la industria acuícola por las propiedades nutricionales, antibacterianas, antivirales e inmunoestimulantes (Jusidin et al., 2022).

1.2 Descripción del Problema

La aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos está provocando que los antibióticos pierdan su efectividad a tasas alarmantes ocasionando una "crisis de resistencia a los antibióticos" a nivel mundial (Alsenani et al., 2020). Como consecuencia de este problema, los organismos reguladores como la U.S. Food and Drug Administration - FDA limitan el uso de antibióticos en animales destinados a la alimentación. A la vez que los mercados internacionales son cada vez más exigentes y prohíben el uso de antibióticos en organismos acuáticos destinados al consumo humano, como peces y camarones (Abdel-Latif et al., 2022). Dado que las enfermedades bacterianas como AHPND afecta principalmente a la larvicultura de camarón (Cuéllar-Anjel, 2013), y siendo esta la etapa productiva base de la industria acuícola, es importante desarrollar estrategias innovadoras y naturales para controlar las enfermedades bacterianas en la acuicultura.

Algunas especies de microalgas son reconocidas por sus propiedades antibacterianas (Kuo et al., 2015). No obstante, el potencial antivirulento de las microalgas, es decir, su capacidad para inhibir los factores de virulencia de los patógenos ha sido poco explorado como estrategia para combatir enfermedades bacterianas en el cultivo de camarones. La identificación y selección de microalgas con capacidad para inhibir los factores de virulencia de bacterias emergentes en camarones representa una estrategia sostenible y ambientalmente segura, ya que su uso no promueve la resistencia bacteriana derivada de la presión de selección asociada al uso de antibióticos.

1.3 Justificación del Problema

El uso de antibióticos bactericidas puede ejercer presión selectiva favoreciendo la resistencia antimicrobiana, lo que dificulta el control de enfermedades en la larvicultura de camarón y puede provocar daños irreparables a la salud humana y el medio ambiente. Por su parte, las microalgas poseen amplias propiedades bioactivas y se consideran una fuente comercial significativa de compuestos de alto valor económico. En particular, la identificación de compuestos directamente responsables del potencial antimicrobiano de las microalgas es un campo de investigación prometedor, principalmente debido a la gran variedad de compuestos descubiertos en los últimos años (Vahdati et al., 2022; Alsenani et al., 2020).

Las microalgas también contienen y metabolizan compuestos bioactivos antivirulentos que controlan la expresión de factores de virulencia de bacterias patógenas para camarón de cultivo (Pozo et al. 2024). Sin embargo, la información del potencial antivirulento de las microalgas

contra patógenos bacterianos es escasa. Dada la importancia de la industria camaronera y la potencialidad de las microalgas para disminuir la virulencia de patógenos bacterianos de camarón de cultivo, es importante identificar especies de microalgas con capacidad para disminuir la virulencia de los patógenos bacterianos emergentes que afectan al cultivo de camarones. La presente investigación busca evaluar la capacidad de diversas especies de microalgas para controlar la virulencia de *V. parahaemolyticus*, mediante la obtención de extractos crudos y su aplicación en cepas virulentas de este patógeno del camarón *P. vannamei*.

Se busca determinar si estas microalgas puedan ser utilizadas en el futuro como productos capaces de interferir en la interacción entre el patógeno y su huésped, contribuyendo así al desarrollo de terapias antivirulentas. Esta estrategia reduciría el daño al huésped y limitaría la capacidad del patógeno para causar enfermedades, sin generar presión selectiva ni afectar la supervivencia de las bacterias comensales asociadas al camarón. Además, los resultados obtenidos contribuirían a optimizar el uso de recursos y, garantizar la inocuidad de los alimentos destinados al consumo humano.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad del uso de extractos crudos de microalgas para el control de la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* mediante ensayos *in vitro*.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de los extractos crudos de microalgas sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* a través de pruebas *in vitro* de producción de biopelículas y motilidad de enjambre.
2. Elaborar un flujograma que describa el procedimiento de evaluación del uso de extractos crudos para controlar la virulencia de *V. parahaemolyticus*.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Impacto de la intensificación acuícola en la sostenibilidad

El creciente mercado y la intensificación de la producción de camarón han contribuido a la aparición de enfermedades y al deterioro de las condiciones ambientales. De tal forma que, los brotes de enfermedades son obstáculos generalizados que han limitado la producción acuícola en

los últimos 10 años (El-Saadony et al., 2022). A pesar de esto, el cultivo superintensivo de *Penaeus vannamei* y las prácticas de alta inversión se han vuelto más comunes, impulsadas por el avance de tecnologías y sistemas de vanguardia diseñados para producir camarones en sistemas de alta densidad. Sin duda, la intensificación sostenible es un enfoque prometedor para aumentar la producción de camarones, especialmente frente a la creciente competencia por el uso de recursos finitos (como tierra y agua), y cuando se requiere un ambiente más "controlado y bioseguro" (Emerenciano et al., 2022). Sin embargo, la creciente intensificación del cultivo plantea una nueva perspectiva para abordar, de manera específica, los problemas sanitarios mediante la búsqueda de soluciones innovadoras fundamentadas en el conocimiento.

1.5.2 Factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es una de las especies bacterianas más abundantes en ambientes marinos y se han detectado en agua y sedimentos de estanques de camarón, lo que sugiere que ingresa al sistema de cultivo desde el entorno. La bacteria puede atravesar el epitelio del camarón y colonizar los tejidos del huésped a través de diversas rutas de transmisión como la oral (agua y alimento) o por superficies corporales (branquias y boca) facilitadas por la presencia de lesiones. Las infecciones con *V. parahaemolyticus* generan enfermedades cuando las alteraciones desregulan el sistema inmunológico del camarón o cuando hay altas densidades de bacterias patógenas.

Las cepas de *V. parahaemolyticus* poseen diversos factores de virulencia, incluidos adhesinas, hemolisina directa termoestable (*TDH*), hemolisina relacionada con TDH (*TRH*) y dos sistemas de secreción tipo III: T3SS1 y T3SS2. El sistema de secreción T3SS1 contribuye tanto a la supervivencia en el ambiente como a la patogénesis en el huésped promoviendo la lisis de las células infectadas y la liberación de nutrientes esenciales. Por otro lado, el sistema de secreción T3SS2 está estrechamente relacionado con infecciones humanas, ya que facilita la inyección de efectores bacterianos directamente en las células epiteliales del huésped, lo que desencadena respuestas inflamatorias severas y daño tisular. Algunas cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas para humanos adquieren el T3SS2 junto con los genes *TDH* y *TRH*, lo que incrementa su patogenicidad. La bacteria *V. parahaemolyticus* presenta dos tipos de flagelos con funciones específicas: un flagelo polar para la natación en medios líquidos y flagelos laterales para el desplazamiento en grupo (motilidad de enjambre, o *swarming* por sus siglas en inglés) sobre superficies semisólidas. Esta capacidad le ayuda a moverse hacia entornos adecuados para establecerse y continuar la infección en el huésped. Los mecanismos de motilidad están relacionados con su capacidad para formar biopelículas (biofilms por sus siglas en inglés),

estructuras multicelulares que facilitan su adherencia a superficies bióticas y abióticas, incrementando su resistencia a condiciones ambientales adversas y favoreciendo su persistencia y transmisión en ambientes acuáticos. Además, algunas cepas poseen cápsulas, una característica que puede variar según el entorno y la cepa (Letchumanan et al., 2014).

En camarones de cultivo, ciertas cepas de *V. parahaemolyticus* son responsables de la enfermedad de AHPND (Hoa et al., 2023). Estas cepas contienen plásmidos que alberga una región codificante para los genes de las toxinas binarias *PirA* y *PirB*, las cuales son homólogas a las toxinas relacionadas con insectos (*Photorhabdus insect-related, Pir*). La cepa bacteriana causante de esta enfermedad ingresa al estómago del camarón y produce las toxinas *PirA* y *PirB*, que atraviesan las barreras epiteliales del estómago y luego se dirigen hacia el hepatopáncreas del camarón. En el hepatopáncreas, estas toxinas generan un desprendimiento masivo y agudo de las células del epitelio tubular, lo que conduce a la necrosis del tejido e invasión de bacterias oportunistas (Zheng et al., 2021), desencadenando la muerte de los camarones infectados.

1.5.3 El uso de microalgas para combatir la resistencia antimicrobiana

El uso descontrolado de antibióticos y el hacinamiento de camarones en estanques de acuicultura deterioran la calidad del agua, lo que genera inmunosupresión inducida por el estrés y ocasiona mortalidades masivas. Además, los genes responsables de la resistencia a los antibióticos en muchas bacterias resistentes pueden transferirse a bacterias patógenas humanas a través de productos alimenticios de acuicultura contaminados, representando una amenaza crítica para la salud pública (El-Saadony et al., 2022).

La creciente resistencia a los antibióticos ha generado una demanda constante por descubrir nuevas estructuras químicas y compuestos antimicrobianos con mecanismos de acción novedosos. Entre los componentes bioactivos más relevantes de las microalgas con potencial antimicrobiano se encuentran: polisacáridos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), antioxidantes como polifenoles, carotenoides y flavonoides, así como aminoácidos (Vahdati et al., 2022).

1.5.4 Terapias antivirulentas

El *quorum sensing* es un mecanismo de regulación genética mediante el cual las bacterias coordinan la expresión de ciertos genes en respuesta a la presencia o concentración de pequeñas moléculas señalizadoras (Defoirdt et al., 2008). Este proceso desempeña un papel clave en la producción de factores de virulencia, formación de biopelículas y otros comportamientos colectivos en bacterias patógenas.

Una estrategia novedosa para desarmar a los patógenos es la terapia antivirulencia, que se basa en bloquear los factores de virulencia o la patogenicidad bacteriana (Dehbanipour & Ghalavand, 2022). A diferencia de los antibióticos tradicionales, esta técnica no busca eliminar ni inhibir el crecimiento bacteriano, sino en interferir en su capacidad para causar infecciones al interrumpir la comunicación bacteriana, conocida como *quorum quenching* (Clatworthy et al., 2007).

En los últimos años se han identificado diversos agentes capaces de interferir con el quorum sensing, incluidos compuestos naturales, sintéticos, enzimas y anticuerpos, los cuales han demostrado su capacidad para atenuar las enfermedades bacterianas en modelos animales y vegetales (Defoirdt, 2018).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar a través de ensayos *in vitro* la factibilidad del uso de extractos crudos de microalgas para el control de la virulencia de *V. parahaemolyticus*, bacteria patógena para camarones *P. vannamei*. Para ello se utilizó 10 especies de microalgas, obteniendo los extractos crudos, y se evaluó si la exposición de la bacteria patógena a los extractos de microalgas disminuía dos de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*: motilidad de enjambre y formación de biopelículas. Una vez comprobada la efectividad de los extractos para disminuir los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* se elaboró un flujograma que describe el procedimiento de evaluación del uso de extractos crudos para controlar la virulencia de *V. parahaemolyticus*. Los resultados obtenidos sugieren que los extractos de las microalgas son un potencial producto antivirulento contra *V. parahaemolyticus* causante de AHPND.

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Producción de Microalgas

Se realizó la producción de diez especies de microalgas: clorofita 1, clorofita 2, clorofita 3, clorofita 4, clorofita 5, clorofita 6, diatomea 1, diatomea 2, diatomea 3 y haptofita 1, provenientes del cepario del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM, Santa Elena, Ecuador). Se utilizó el protocolo de Guillard (1975) en agua de mar. Los cultivos se desarrollaron hasta llegar a la producción en tanque masivo, posteriormente se cosecharon, se centrifugaron (obtención de pasta) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 1).



Figura 1. Producción de microalgas.

2.2 Obtención de extractos crudos de microalgas

Los extractos crudos se obtuvieron mediante el método descrito por Pozo (2024). Las pastas de microalgas se maceraron en etanol, se filtraron, se evaporaron y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, de cada extracto crudo se prepararon tres concentraciones: 0.1 ppm, 1 ppm y 10 ppm (Figura 2).

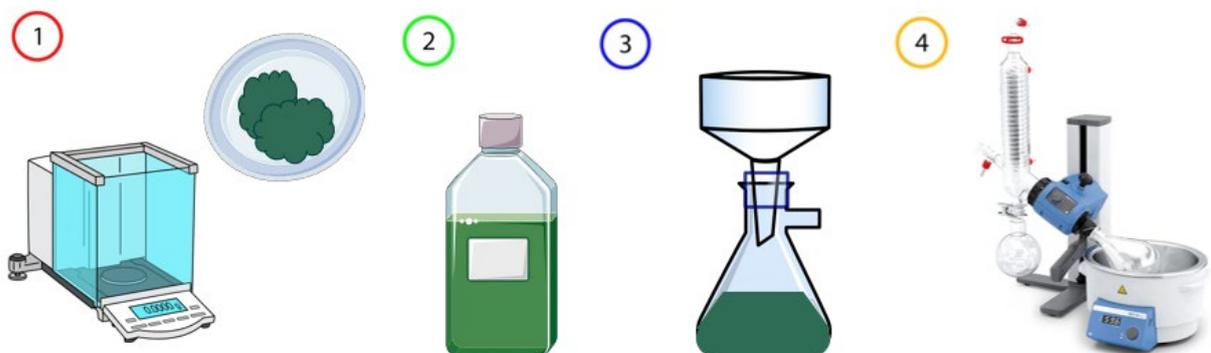


Figura 2. Obtención de extractos crudos de microalgas.

2.3 Activación de la cepa patógena *V. parahaemolyticus*

La cepa *V. parahaemolyticus* Ba94C2 fue la cepa patógena de *P. vannamei* utilizada en este estudio. La cepa fue activada en agar tríptico de soya (TSA) al 2% de Bacto agar y 2% de NaCl, e incubada durante 24 h a 30 °C. Luego, la cepa fue transferida a caldo LB al 2% de NaCl e incubada por 8 h a 30 °C. La suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de $1,00 \pm 0,01$ unidades a 600 nm, equivalente a 10^9 UFC/mL (Figura 3).

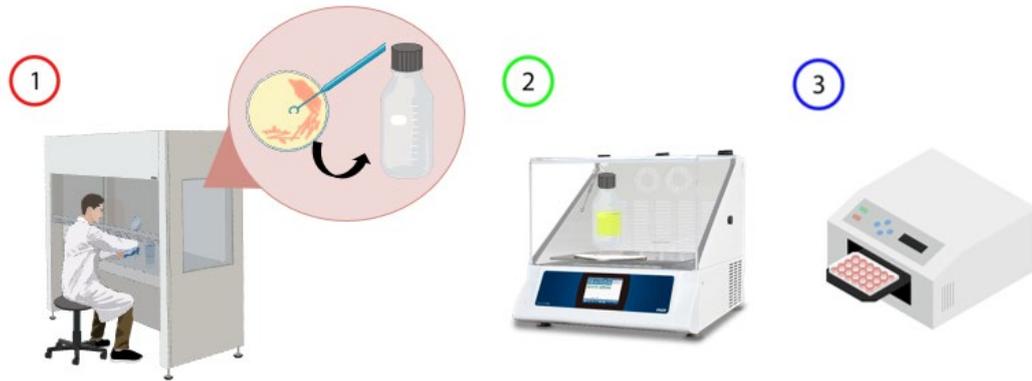


Figura 3. Activación de la cepa patógena *V. parahaemolyticus*.

2.4 Pruebas *in vitro* de crecimiento bacteriano

2.4.1 Curvas de crecimiento

Los extractos de microalgas (0.1 ppm, 1 ppm y 10 ppm) y la suspensión bacteriana fueron depositados en microplacas de 96 pocillos e incubados durante 24 h a 30 °C. El crecimiento bacteriano se registró cada 2 horas mediante lecturas de OD_{600nm} . Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin extracto) y un control negativo (solo medio de cultivo estéril). Cada tratamiento y control tuvieron seis réplicas (Figura 4).

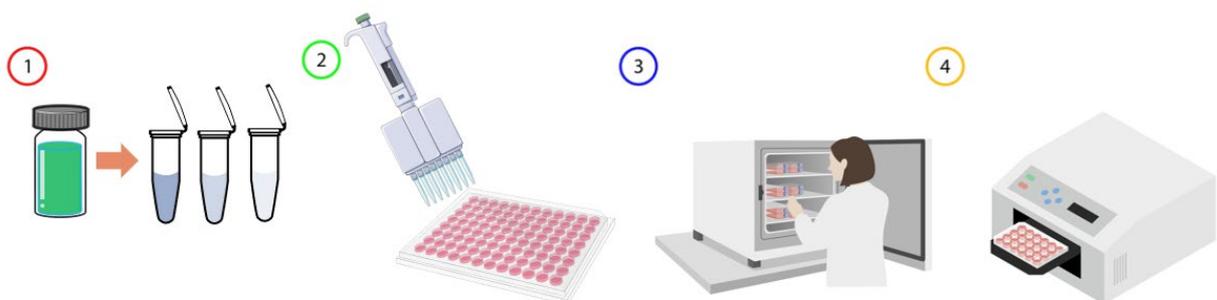


Figura 4. Curvas de crecimiento.

2.4.2 Antibiogramas

Los antibiogramas se realizaron según el protocolo del Laboratorio de Microbiología del CENAIM. Discos estériles fueron impregnados con extractos de microalgas (0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) y antibiótico florfenicol a 70 ppm (control), y colocados en placas de Mueller-Hinton, previamente inoculadas con una suspensión bacteriana a 10^6 UFC/mL. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 y 48 horas. La inhibición bacteriana se determinó mediante la presencia de halos alrededor del disco. Cada tratamiento y control tuvieron seis réplicas (Figura 5).

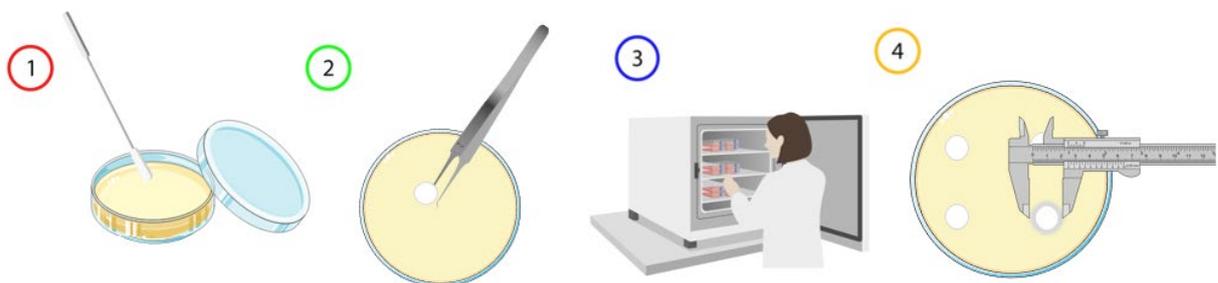


Figura 5. Antibiograma.

2.5 Pruebas *in vitro* de virulencia

2.5.1 Formación de biopelícula

Los niveles de formación de biopelículas de la cepa patógena fueron cuantificados mediante tinción con cristal violeta (Yang et al., 2017). Se cultivaron 180 μ L de cada extracto de microalga (0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) con 20 μ L de una suspensión bacteriana en microplacas de 96 pocillos a un OD final de 0.1 ($OD_{600\text{ nm}}$), e incubaron 24 horas a 30 °C. Las bacterias no adheridas se eliminaron con lavados sucesivos de PBS, y las bacterias adheridas se fijaron con metanol y tiñeron con cristal violeta a 0.4%. Posteriormente, las bacterias teñidas se resuspendieron en etanol y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Varioskan LUX) a $OD_{570\text{ nm}}$. Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin extracto) y un control negativo (solo medio estéril), con seis réplicas cada uno (Figura 6).

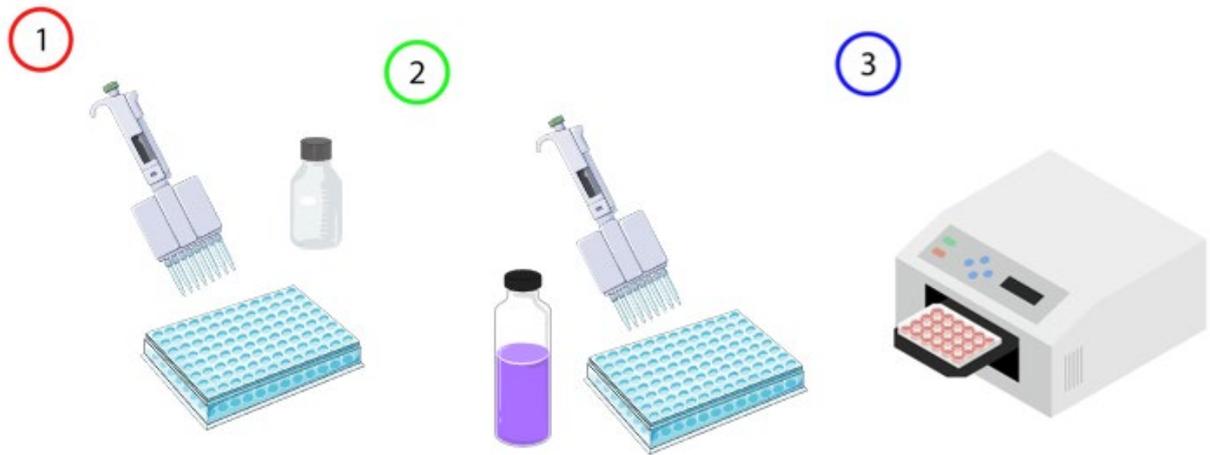


Figura 6. Producción de biopelículas.

2.5.2 Motilidad de enjambre

La motilidad de enjambre de la cepa patógena se cuantificó siguiendo el protocolo descrito por Pozo et al. (2024). El medio de cultivo se preparó con caldo LB, Lennox 2% de NaCl y 0.4% de agar Bacto, esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de enfriarlo a 40 °C, se añadieron los extractos de microalgas (0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm), y el medio se vertió en placas Petri. Se inocularon 3 μ L de suspensión bacteriana en el centro de las placas. Se invirtieron e incubaron a 30 °C por 24 horas, midiendo los diámetros de los halos del enjambre cada 2 horas. Se incluyó un control positivo (placa Petri sin extracto) y control negativo (placa Petri solo con medio estéril). Cada tratamiento tuvo seis réplicas (Figura 7).



Figura 7. Motilidad de enjambre.

2.6 Análisis de datos

El efecto de la exposición de *V. parahaemolyticus* a los extractos crudos [cuatro tratamientos: bacteria patógena tratada a 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, y control positivo (bacteria no tratada)] fue evaluado para cada una de las variables de respuesta mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía o con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las variables analizadas fueron: crecimiento de la bacteria patógena registrado cada 2 horas, pendiente de la fase exponencial del halo de motilidad observado en la caja Petri durante el movimiento de enjambre de la bacteria patógena) y niveles de formación de biopelículas. En el caso del ANOVA, se verificó previamente las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Tras el ANOVA, se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para identificar diferencias significativas entre pares de tratamientos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$. El análisis de datos se realizó utilizando el software R, versión 2024.12.0+467.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Efecto de los extractos crudos de microalgas sobre el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*

3.1.1 Curvas de crecimiento de *V. parahaemolyticus*

Se observó que el crecimiento de la bacteria patógena expuesta a los extractos crudos de Clorofita 1, Clorofita 3, Clorofita 4 y Clorofita 5 (concentraciones 0.1 ppm y 1 ppm) disminuyó significativamente con respecto al control positivo a partir de las 6h-8h de crecimiento bacteriano, así como a la concentración 10 ppm para las Clorofita 4 y Clorofita 5 (Tablas 1-10). Las curvas de crecimiento bacteriano mostraron un incremento cinético propio de las bacterias del género *Vibrio*. La fase de crecimiento exponencial ocurrió entre las 0 y 14 horas (Figuras 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 y 44). En tanto que, el periodo de muerte celular ocurrió en general a partir de las 14-16 horas. En general, no se observó disminución del crecimiento bacteriano cuando la bacteria patógena fue expuesta a los extractos crudos de las restantes especies de microalgas. Excepto para el caso de la Haptofita 1, para la cual se observó una disminución del crecimiento bacteriano solo a las 8 horas y 12 horas. Estos resultados indican que los extractos crudos de Clorofita 1, Clorofita 3, Clorofita 4 y Clorofita 5 afectaron levemente el crecimiento de la bacteria patógena. A diferencia de los extractos crudos de las Diatomeas (Diatomea 1, Diatomea 2 y Diatomea 3), Clorofita 2, Clorofita 6 y Haptofita 1 (a la mayoría de las horas observadas) que no inhibieron el crecimiento de *V. parahaemolyticus*.

3.1.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana a los extractos crudos de microalgas

Ninguno de los tratamientos evaluados mediante antibiogramas presentó halos de inhibición contra la cepa patógena *V. parahaemolyticus*, indicando que el crecimiento de la bacteria patógena no fue afectado a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figuras 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41 y 45). En contraste, el control positivo (Florfenicol) presentó halos de inhibición de 12 mm, demostrando la susceptibilidad de *V. parahaemolyticus* al antibiótico.

3.2 Efecto de los extractos crudos de microalgas sobre factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*

3.2.1 Motilidad de enjambre

Las figuras 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 y 46 muestran los resultados de la migración de la cepa patógena expuesta a los tratamientos evaluados durante el movimiento de enjambre. Todos los 10 extractos disminuyeron significativamente la motilidad de enjambre de la bacteria patógena comparada con el control positivo. Clorofita 1 mostró un efecto significativamente inhibitorio de la motilidad ($p < 0.05$) en comparación con el control positivo, destacándose como el extracto más efectivo, inhibiendo la motilidad bacteriana en todas las concentraciones probadas (0.1 ppm, 1 ppm y 10 ppm). Por su parte, Clorofita 2, Clorofita 3 y Clorofita 5, Diatomea 1 y Haptofita 1 también mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de la motilidad a todas las concentraciones evaluadas. Clorofita 4 y Diatomea 2 presentaron un efecto moderado, disminuyendo la motilidad solo a las dos concentraciones más bajas (Clorofita 4: 0.1 ppm y 1.0 ppm) y más altas (Diatomea 2: 1 ppm y 10 ppm). Finalmente, Diatomea 3 y Clorofita 6 mostraron una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0.05$) únicamente en concentraciones específicas: Diatomea 3 mostró inhibición a 1 ppm y 10 ppm, mientras que Clorofita 6 lo hizo a 0.1 ppm y 1 ppm. Estos resultados sugieren que la efectividad de estos extractos podría estar influenciada por la concentración aplicada.

3.2.2 Formación de biopelículas

Las figuras 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43 y 47 muestran los resultados de la formación de biopelícula de la cepa patógena expuesta a los tratamientos evaluados. Clorofita 1 fue la especie más efectiva en la inhibición de la formación de biopelículas, logrando una reducción altamente significativa ($p < 0.05$) en todas las concentraciones evaluadas. Este resultado resalta su potencial como un agente antibiopelícula. Por su parte, Clorofita 2, Clorofita 4, Diatomea 1 y Diatomea 2 mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la formación de biopelículas, pero únicamente a la concentración más baja (0.1 ppm). En contraste, Clorofita 3, Clorofita 5, Clorofita 6, Diatomea 3 y Haptofita 1 no mostraron disminución de la formación de biopelículas a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Tabla 1. Crecimiento de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,045 \pm 0,001a	0,087 \pm 0,004b	0,304 \pm 0,015ab	0,358 \pm 0,01a	0,454 \pm 0,004a	0,904 \pm 0,019a	1,128 \pm 0,008a	1,333 \pm 0,024a	1,333 \pm 0,013a	1,28 \pm 0,012a	1,173 \pm 0,015a	1,181 \pm 0,018a	1,205 \pm 0,045a
1 ppm	0,045 \pm 0,001a	0,087 \pm 0,004b	0,298 \pm 0,004ab	0,354 \pm 0,011a	0,454 \pm 0,009a	0,936 \pm 0,045a	1,18 \pm 0,045a	1,317 \pm 0,05a	1,298 \pm 0,058a	1,243 \pm 0,06a	1,198 \pm 0,048a	1,154 \pm 0,04a	1,195 \pm 0,047a
10 ppm	0,048 \pm 0,001b	0,089 \pm 0,007b	0,314 \pm 0,015b	0,377 \pm 0,004b	0,505 \pm 0,025b	1,045 \pm 0,024b	1,295 \pm 0,04b	1,339 \pm 0,054a	1,343 \pm 0,062a	1,285 \pm 0,019a	1,258 \pm 0,022b	1,263 \pm 0,03b	1,253 \pm 0,036ab
Control positivo	0,047 \pm 0,001b	0,078 \pm 0,004a	0,285 \pm 0,015a	0,371 \pm 0,015ab	0,523 \pm 0,025b	1,104 \pm 0,008c	1,307 \pm 0,077b	1,504 \pm 0,043b	1,475 \pm 0,021b	1,424 \pm 0,013b	1,365 \pm 0,017c	1,33 \pm 0,023c	1,308 \pm 0,015b

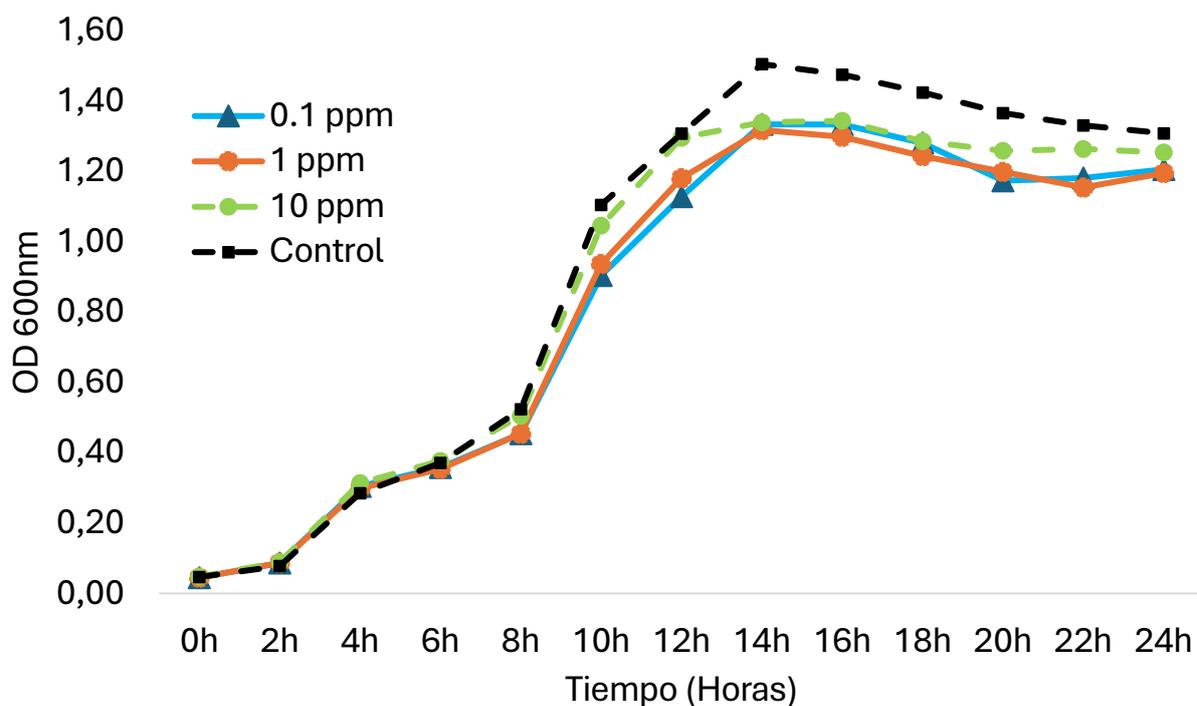


Figura 8. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).

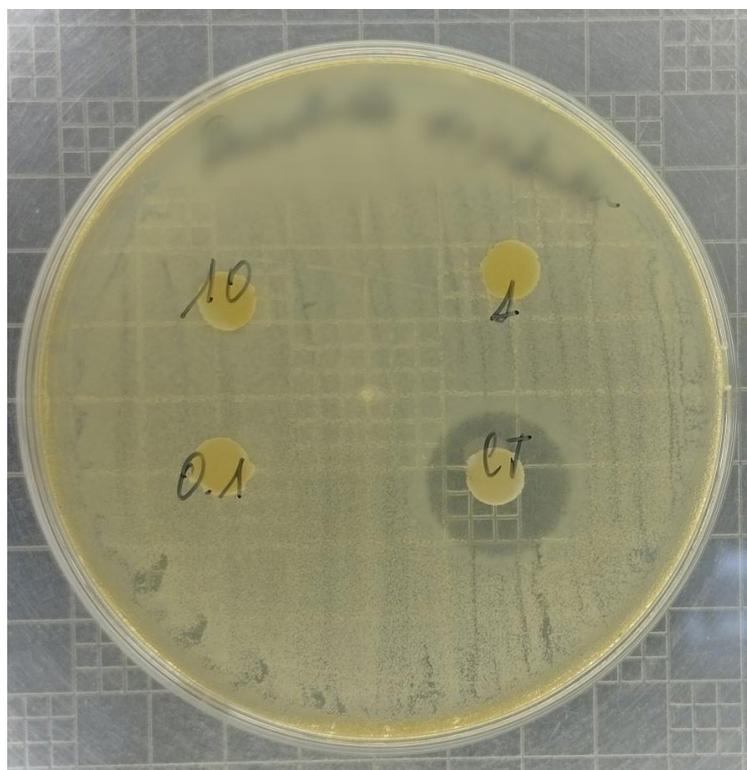


Figura 9. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

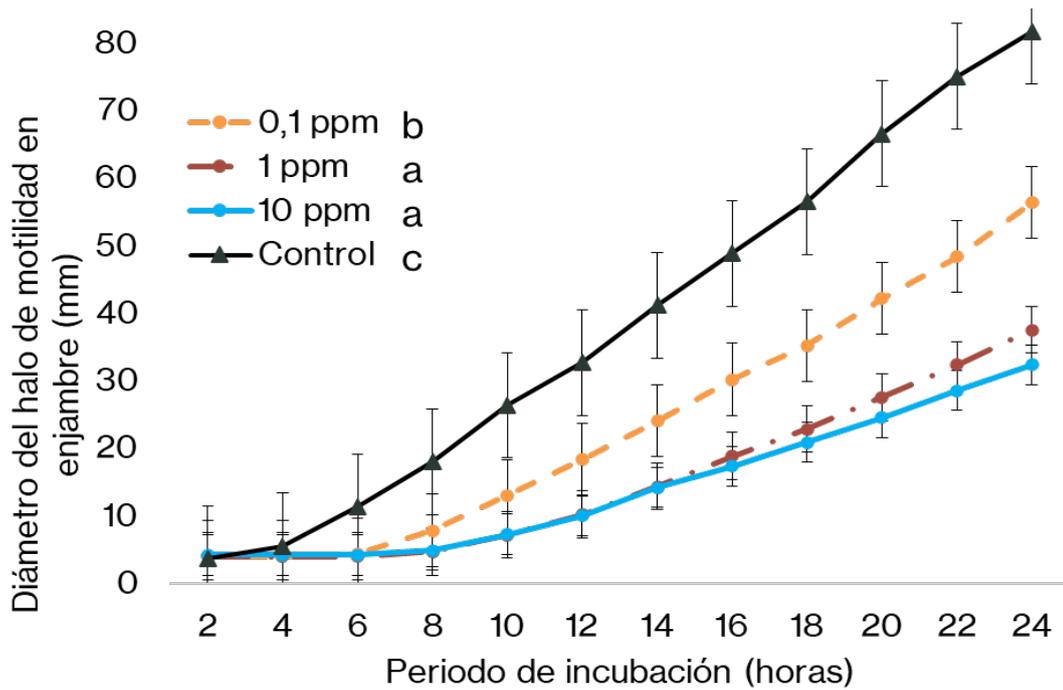


Figura 10. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

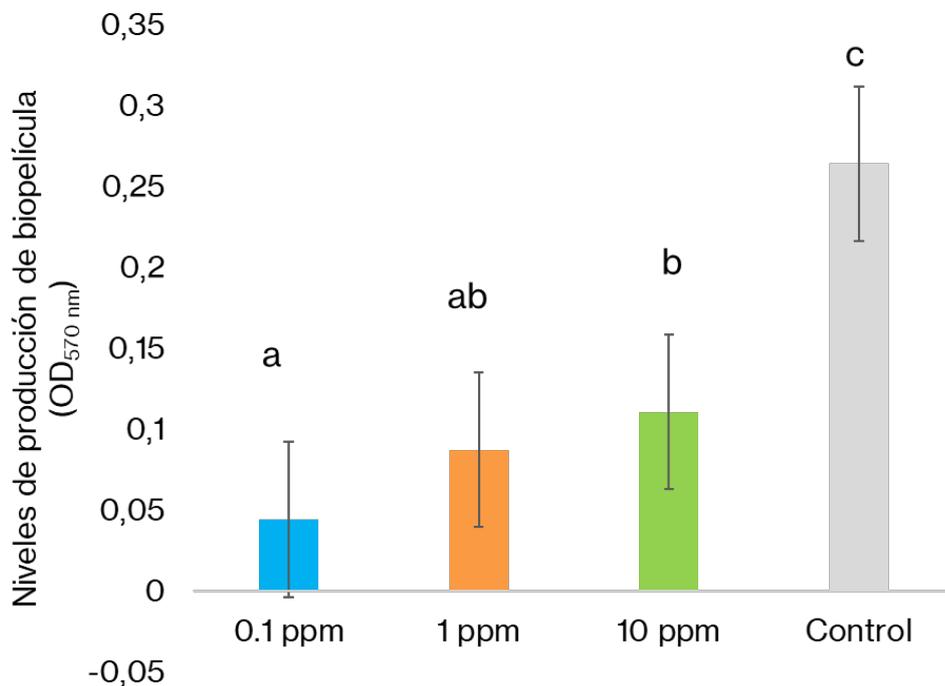


Figura 11. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 2. Crecimiento de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,049 \pm 0,001 ^a	0,097 \pm 0,007 ^a	0,248 \pm 0,010 ^a	0,327 \pm 0,017 ^a	0,418 \pm 0,045 ^a	0,853 \pm 0,011 ^a	1,047 \pm 0,023 ^a	1,098 \pm 0,019 ^a	1,017 \pm 0,025 ^{ab}	0,947 \pm 0,037 ^a	0,869 \pm 0,015 ^a	0,829 \pm 0,021 ^a	0,82 \pm 0,041 ^a
1 ppm	0,048 \pm 0,002 ^a	0,105 \pm 0,017 ^{ab}	0,268 \pm 0,026 ^a	0,356 \pm 0,028 ^{ab}	0,513 \pm 0,089 ^a	0,888 \pm 0,022 ^{bc}	1,046 \pm 0,024 ^a	1,07 \pm 0,032 ^a	0,986 \pm 0,031 ^a	0,93 \pm 0,078 ^a	0,837 \pm 0,047 ^a	0,814 \pm 0,044 ^a	0,828 \pm 0,021 ^a
10 ppm	0,054 \pm 0,001 ^b	0,117 \pm 0,008 ^b	0,306 \pm 0,015 ^b	0,368 \pm 0,008 ^b	0,491 \pm 0,036 ^a	0,897 \pm 0,006 ^c	1,051 \pm 0,01 ^a	1,085 \pm 0,027 ^a	1,158 \pm 0,008 ^c	1,045 \pm 0,03 ^b	0,949 \pm 0,014 ^b	0,917 \pm 0,01 ^b	0,932 \pm 0,011 ^b
Control positivo	0,048 \pm 0,001 ^a	0,100 \pm 0,011 ^{ab}	0,265 \pm 0,022 ^a	0,323 \pm 0,026 ^a	0,479 \pm 0,07 ^a	0,867 \pm 0,019 ^{ab}	1,033 \pm 0,023 ^a	1,061 \pm 0,028 ^a	1,031 \pm 0,034 ^b	0,905 \pm 0,018 ^a	0,863 \pm 0,006 ^a	0,821 \pm 0,015 ^a	0,818 \pm 0,021 ^a

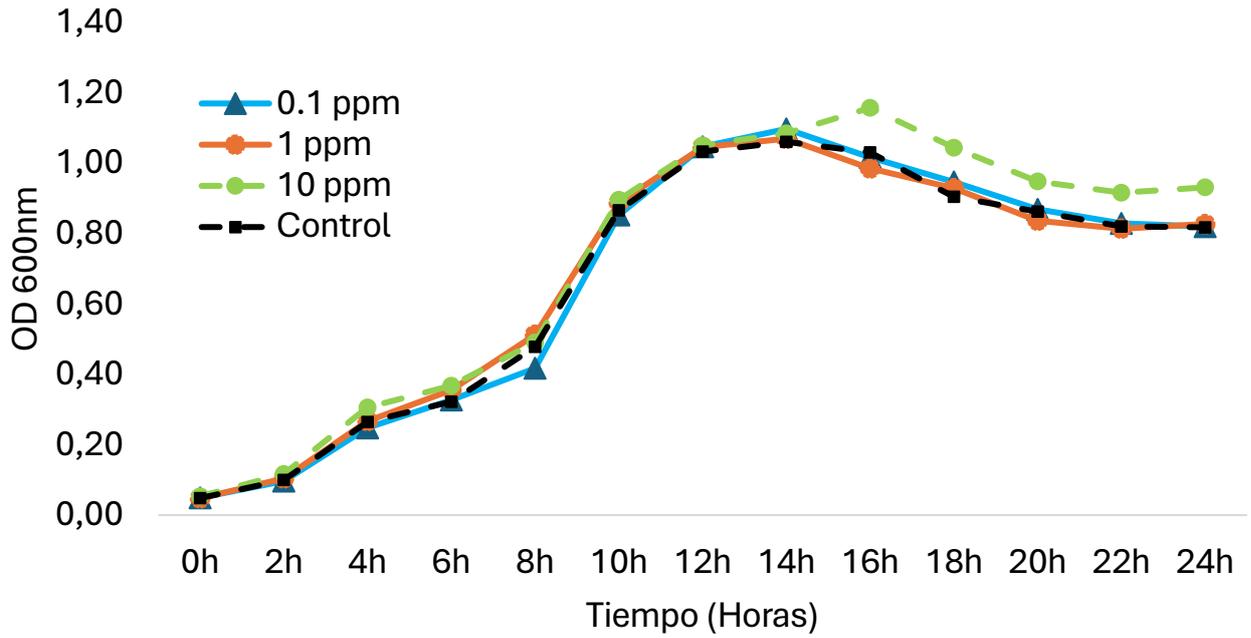


Figura 12. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin extracto).

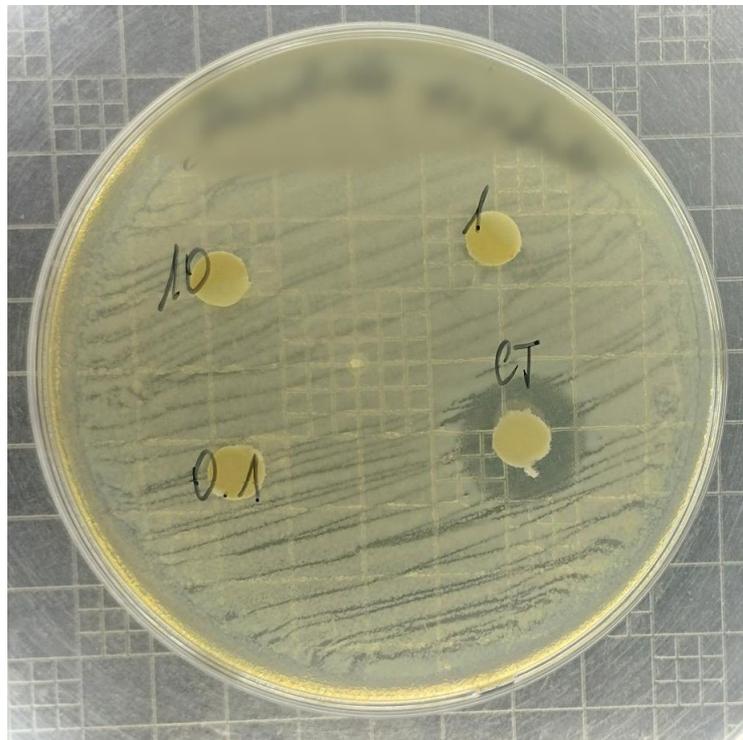


Figura 13. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 2, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

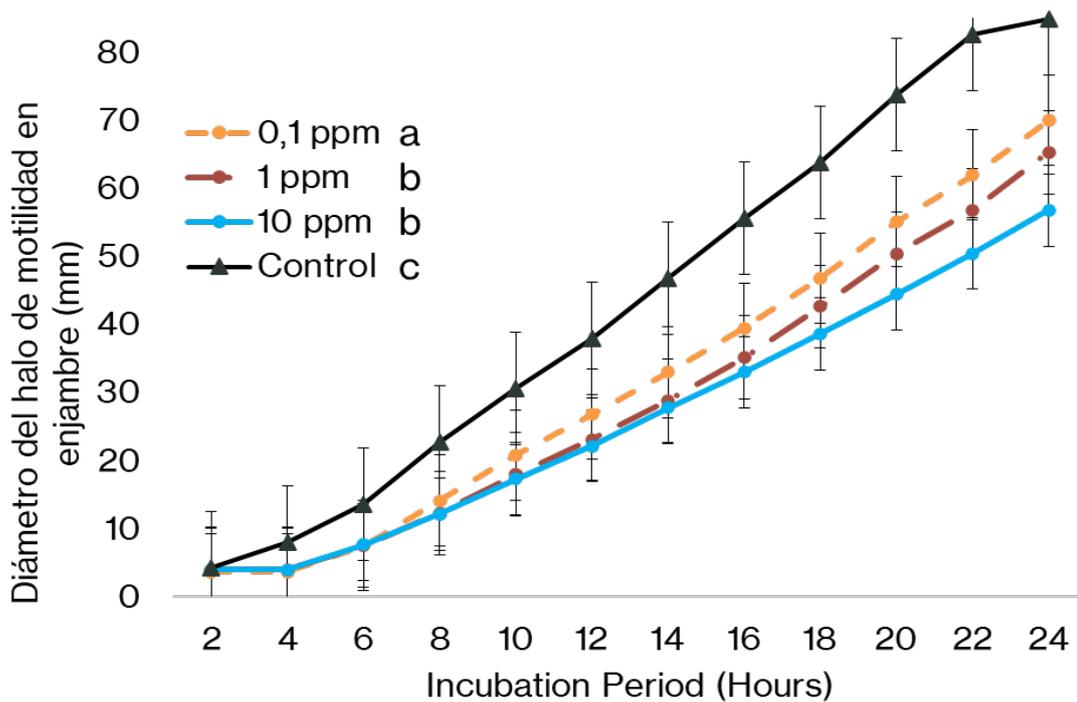


Figura 14. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

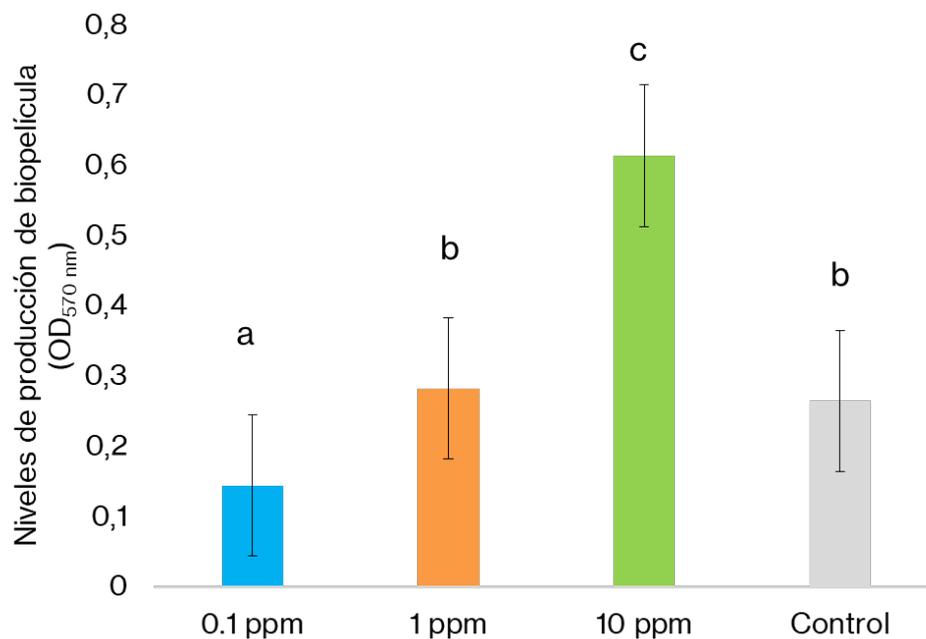


Figura 15. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 2 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 3. Crecimiento de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (media \pm error estándar) en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,048 \pm 0,004 ^a	0,071 \pm 0,009 ^a	0,287 \pm 0,021 ^a	0,339 \pm 0,008 ^a	0,447 \pm 0,01 ^a	0,896 \pm 0,024 ^a	1,181 \pm 0,075 ^a	1,259 \pm 0,022 ^a	1,316 \pm 0,014 ^a	1,255 \pm 0,037 ^{ab}	1,211 \pm 0,028 ^{ab}	1,155 \pm 0,021 ^a	1,181 \pm 0,017 ^a
1 ppm	0,049 \pm 0,004 ^a	0,071 \pm 0,005 ^a	0,277 \pm 0,016 ^a	0,336 \pm 0,013 ^a	0,455 \pm 0,038 ^a	0,95 \pm 0,067 ^a	1,26 \pm 0,042 ^b	1,293 \pm 0,034 ^a	1,309 \pm 0,102 ^a	1,217 \pm 0,078 ^a	1,176 \pm 0,053 ^a	1,166 \pm 0,064 ^a	1,21 \pm 0,085 ^a
10 ppm	0,048 \pm 0,004 ^a	0,079 \pm 0,002 ^a	0,288 \pm 0,017 ^a	0,363 \pm 0,015 ^b	0,541 \pm 0,021 ^b	1,107 \pm 0,013 ^b	1,359 \pm 0,005 ^c	1,301 \pm 0,03 ^a	1,3 \pm 0,016 ^a	1,293 \pm 0,01 ^{bc}	1,257 \pm 0,016 ^{bc}	1,241 \pm 0,02 ^b	1,234 \pm 0,034 ^a
Control positivo	0,045 \pm 0,001 ^a	0,071 \pm 0,004 ^a	0,275 \pm 0,065 ^a	0,373 \pm 0,011 ^b	0,552 \pm 0,04 ^b	1,111 \pm 0,023 ^b	1,417 \pm 0,045 ^c	1,464 \pm 0,07 ^b	1,428 \pm 0,063 ^b	1,349 \pm 0,037 ^c	1,3 \pm 0,043 ^c	1,262 \pm 0,03 ^b	1,253 \pm 0,016 ^a

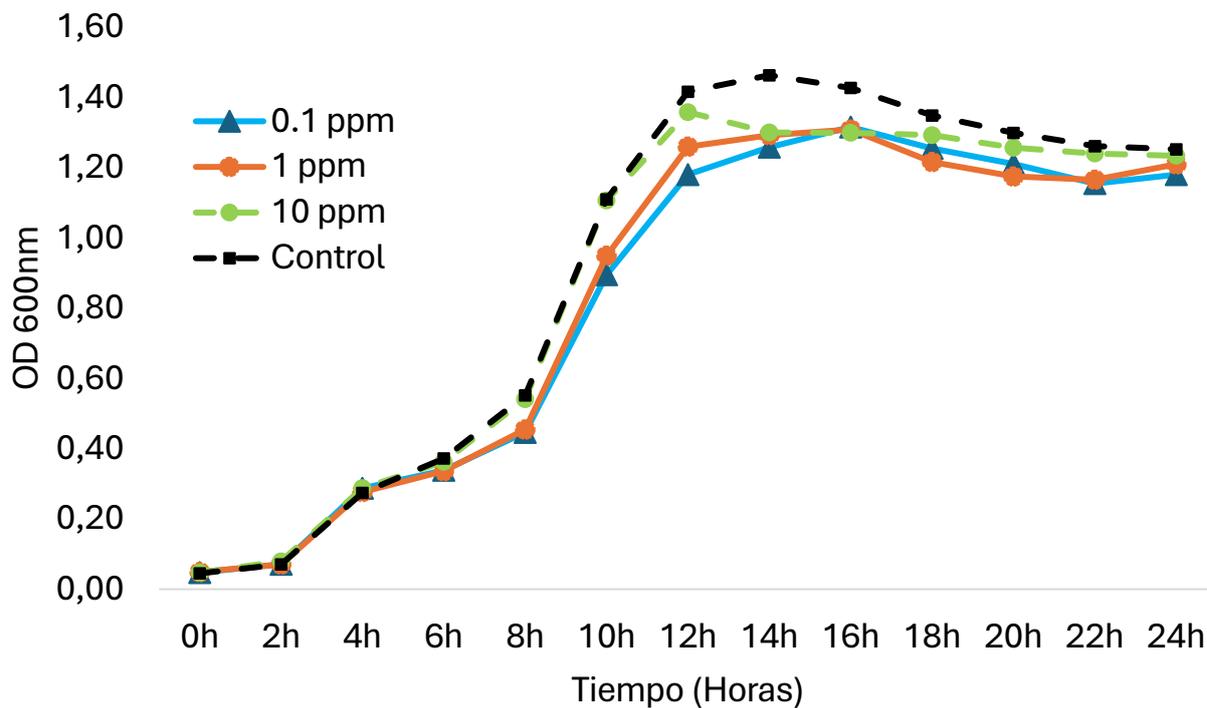


Figura 16. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto).

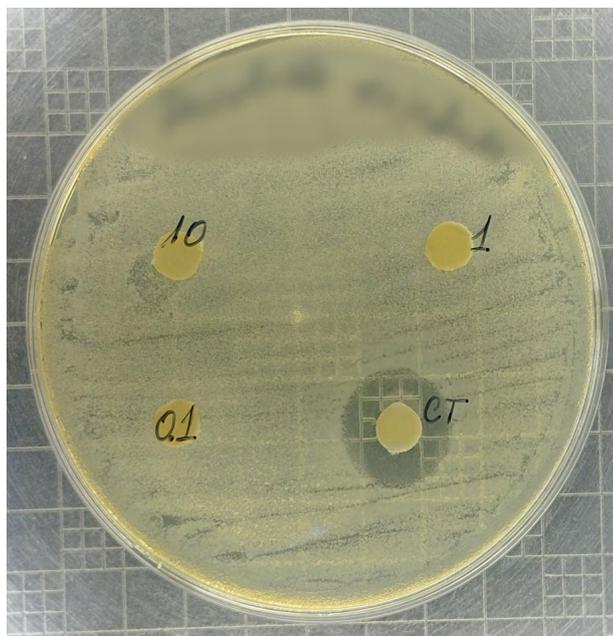


Figura 17. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 3, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

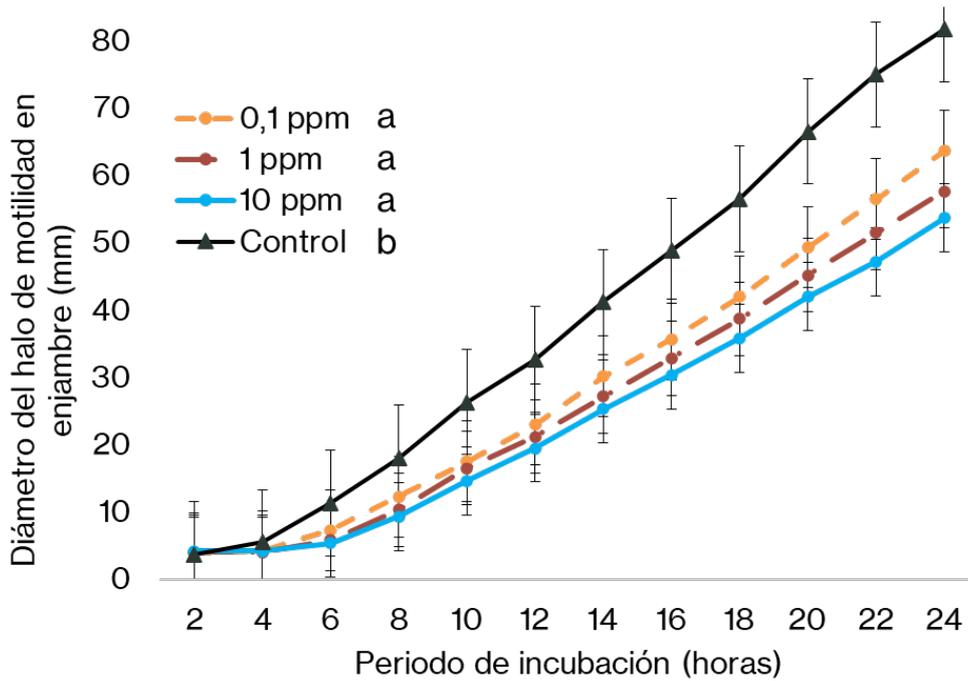


Figura 18. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

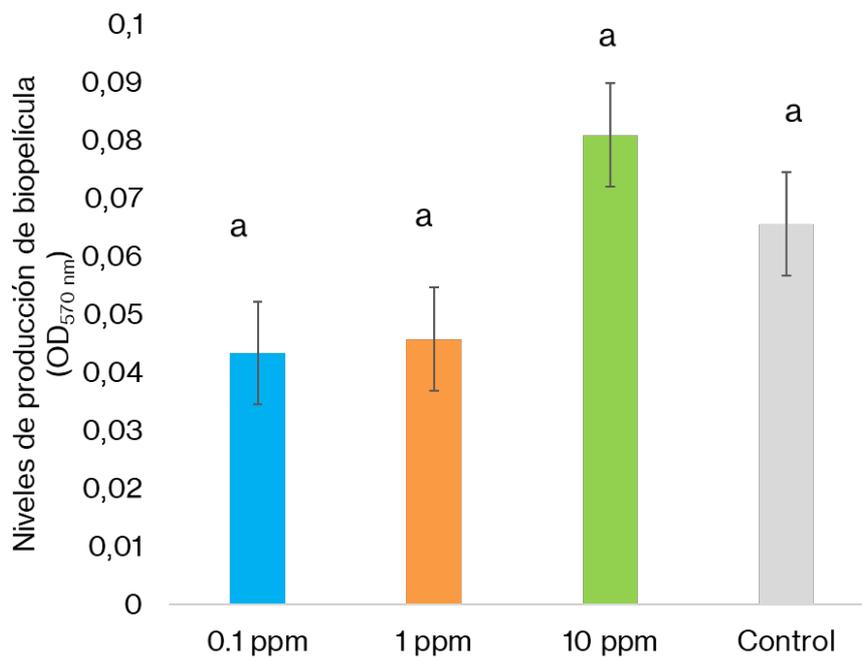


Figura 19. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 3 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 4. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 4 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,049 \pm 0,003 ^a	0,065 \pm 0,004 ^a	0,273 \pm 0,009 ^a	0,315 \pm 0,007 ^a	0,436 \pm 0,007 ^a	0,9 \pm 0,024 ^a	1,199 \pm 0,053 ^a	1,298 \pm 0,039 ^a	1,298 \pm 0,035 ^a	1,244 \pm 0,03 ^a	1,159 \pm 0,028 ^a	1,166 \pm 0,037 ^a	1,162 \pm 0,022 ^a
1 ppm	0,048 \pm 0,003 ^a	0,066 \pm 0,003 ^a	0,261 \pm 0,043 ^a	0,326 \pm 0,005 ^a	0,42 \pm 0,021 ^a	0,951 \pm 0,058 ^a	1,216 \pm 0,064 ^a	1,291 \pm 0,044 ^a	1,292 \pm 0,029 ^a	1,236 \pm 0,028 ^a	1,175 \pm 0,004 ^a	1,166 \pm 0,016 ^a	1,14 \pm 0,039 ^a
10 ppm	0,05 \pm 0,003 ^a	0,073 \pm 0,003 ^b	0,282 \pm 0,007 ^a	0,353 \pm 0,017 ^b	0,414 \pm 0,025 ^a	0,893 \pm 0,047 ^a	1,239 \pm 0,016 ^a	1,329 \pm 0,082 ^a	1,328 \pm 0,036 ^a	1,305 \pm 0,036 ^b	1,243 \pm 0,039 ^b	1,209 \pm 0,027 ^a	1,211 \pm 0,031 ^a
Control positivo	0,045 \pm 0,001 ^a	0,071 \pm 0,004 ^{ab}	0,275 \pm 0,065 ^a	0,373 \pm 0,011 ^c	0,552 \pm 0,04 ^b	1,111 \pm 0,023 ^b	1,417 \pm 0,045 ^b	1,464 \pm 0,07 ^b	1,428 \pm 0,063 ^b	1,349 \pm 0,037 ^b	1,3 \pm 0,043 ^c	1,262 \pm 0,03 ^b	1,253 \pm 0,016 ^b

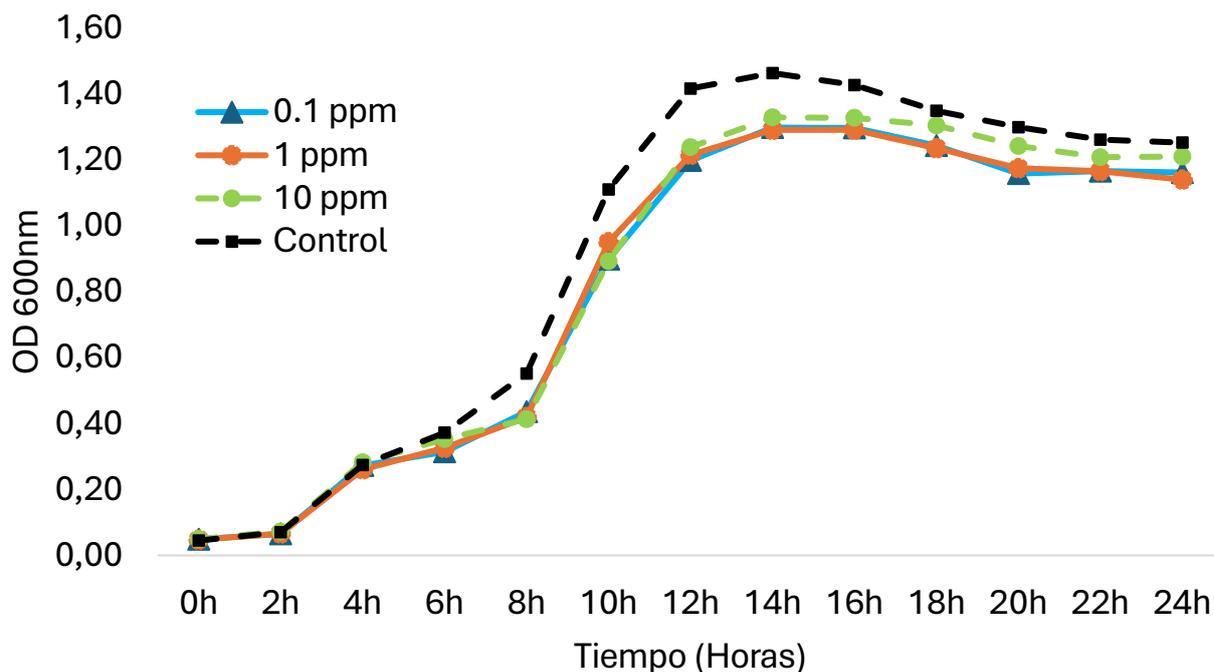


Figura 20. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto).

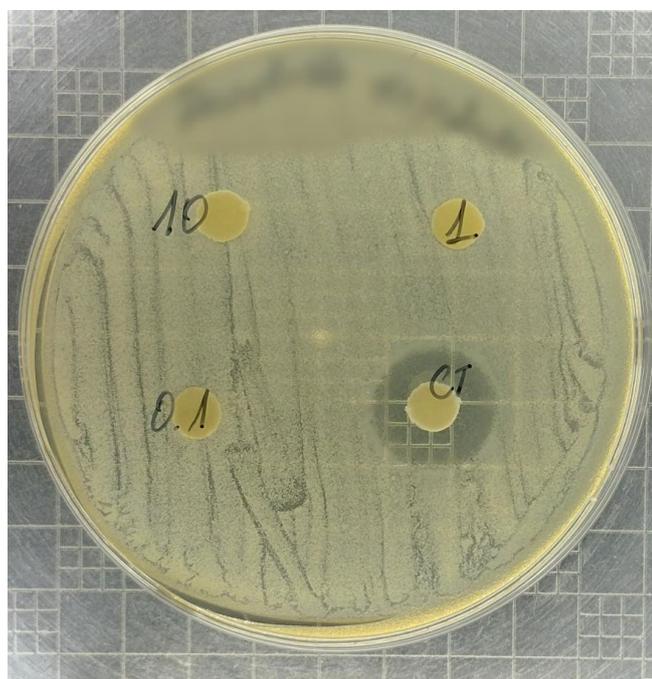


Figura 21. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 4, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

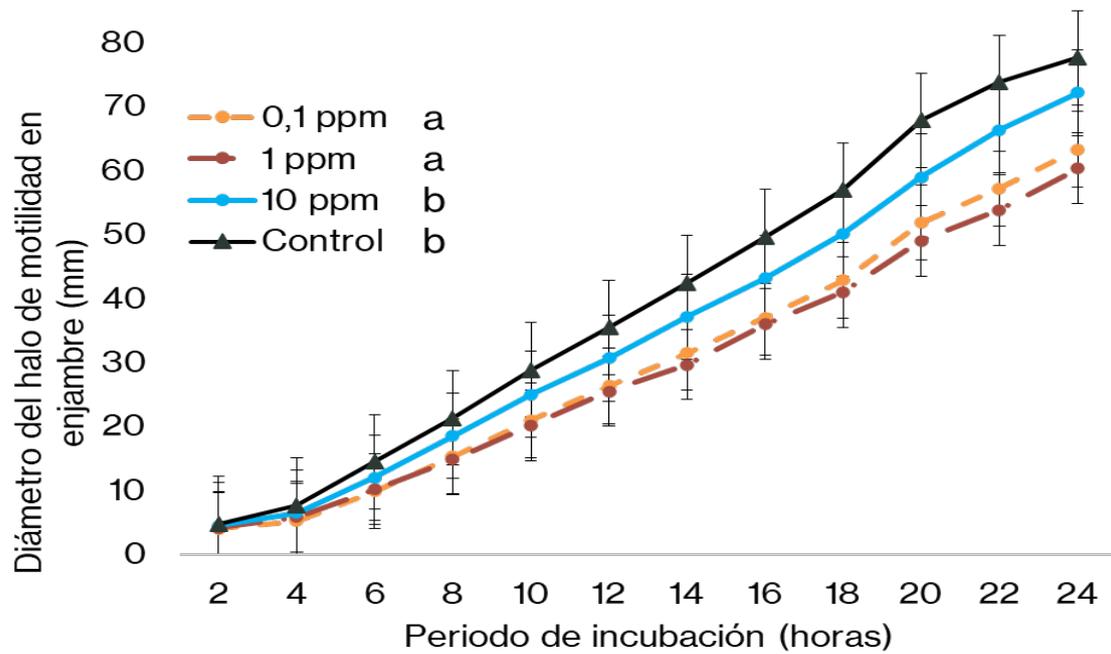


Figura 22. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

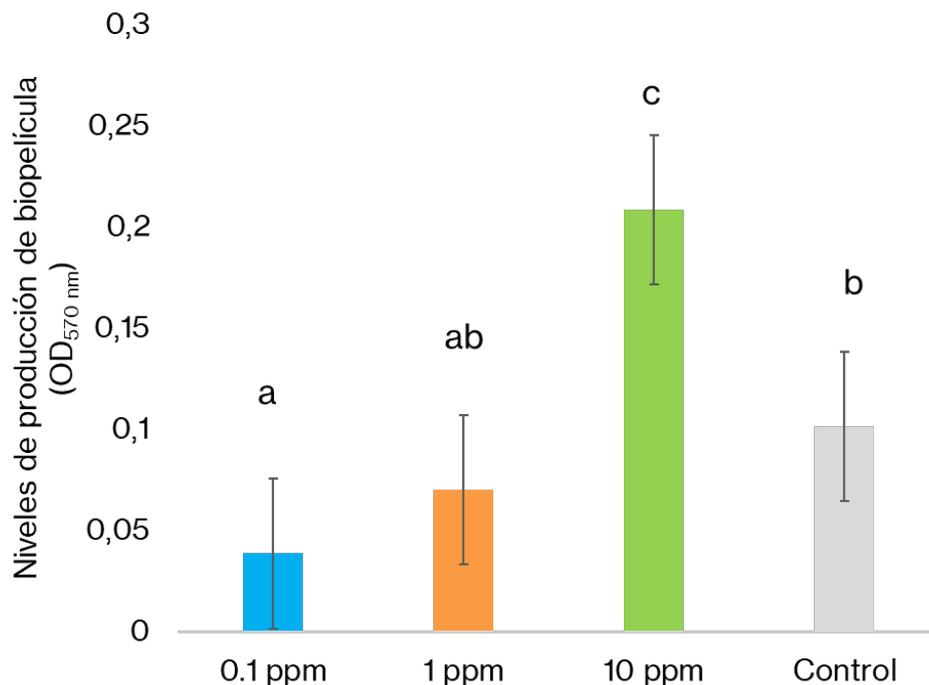


Figura 23. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 4 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 5. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 5 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,048 \pm 0,003 ^a	0,075 \pm 0,005 ^a	0,259 \pm 0,008 ^a	0,321 \pm 0,01 ^a	0,443 \pm 0,016 ^{ab}	1,006 \pm 0,036 ^a	1,144 \pm 0,03 ^a	1,319 \pm 0,019 ^{ab}	1,282 \pm 0,032 ^{ab}	1,209 \pm 0,021 ^a	1,174 \pm 0,014 ^a	1,171 \pm 0,013 ^a	1,125 \pm 0,02 ^a
1 ppm	0,049 \pm 0,003 ^a	0,077 \pm 0,002 ^{ab}	0,275 \pm 0,012 ^{ab}	0,333 \pm 0,01 ^{ab}	0,477 \pm 0,01 ^b	1,049 \pm 0,029 ^b	1,18 \pm 0,085 ^a	1,313 \pm 0,027 ^{ab}	1,309 \pm 0,046 ^{ab}	1,235 \pm 0,011 ^a	1,2 \pm 0,007 ^b	1,191 \pm 0,011 ^a	1,151 \pm 0,024 ^{ab}
10 ppm	0,048 \pm 0,003 ^a	0,082 \pm 0,004 ^b	0,294 \pm 0,007 ^b	0,347 \pm 0,01 ^b	0,433 \pm 0,021 ^a	1,081 \pm 0,014 ^{bc}	1,326 \pm 0,004 ^b	1,3 \pm 0,043 ^a	1,272 \pm 0,01 ^a	1,237 \pm 0,01 ^a	1,204 \pm 0,007 ^b	1,145 \pm 0,051 ^a	1,137 \pm 0,021 ^a
Control positivo	0,049 \pm 0,003 ^a	0,073 \pm 0,002 ^a	0,244 \pm 0,045 ^a	0,333 \pm 0,01 ^{ab}	0,579 \pm 0,043 ^c	1,094 \pm 0,015 ^c	1,337 \pm 0,08 ^b	1,365 \pm 0,049 ^b	1,321 \pm 0,018 ^b	1,275 \pm 0,027 ^b	1,24 \pm 0,021 ^c	1,178 \pm 0,028 ^a	1,181 \pm 0,014 ^b

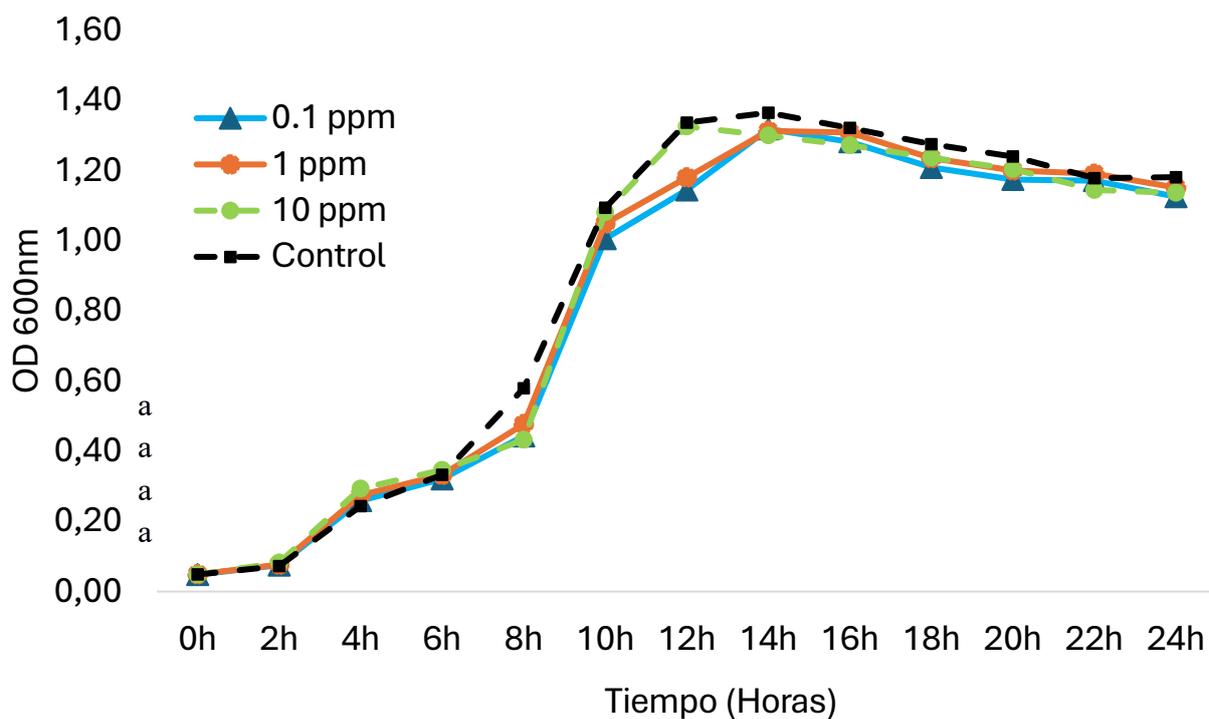


Figura 24. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto).

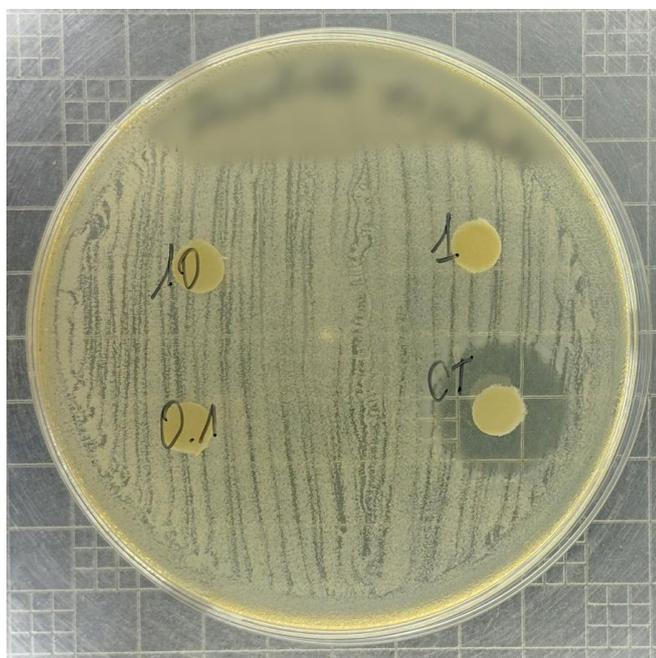


Figura 25. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 5, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

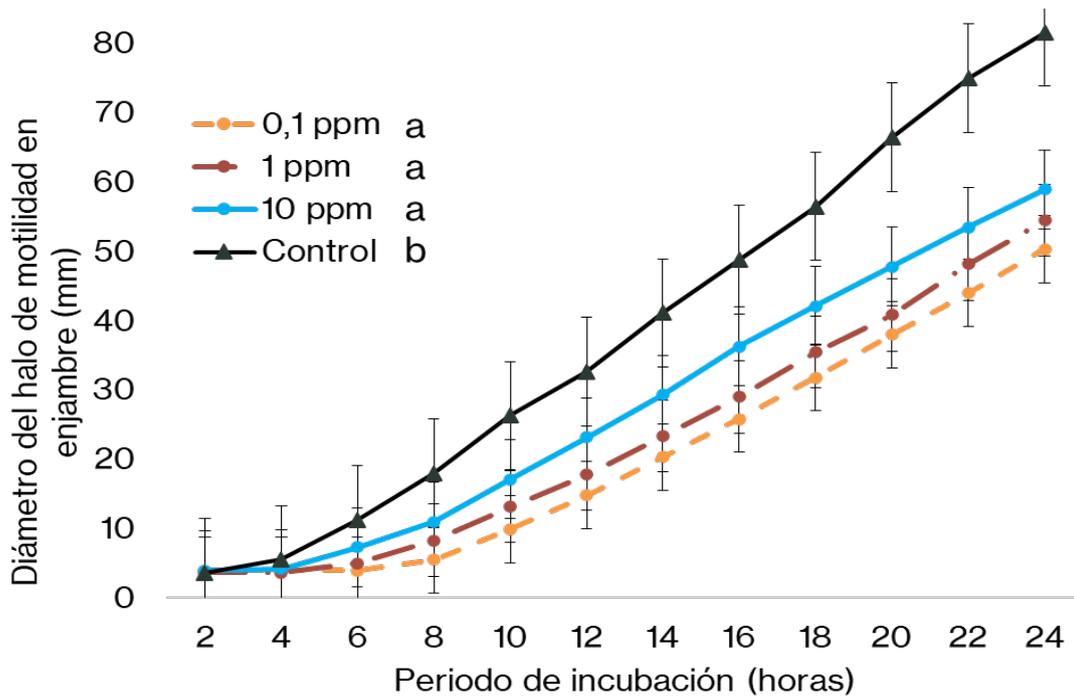


Figura 26. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

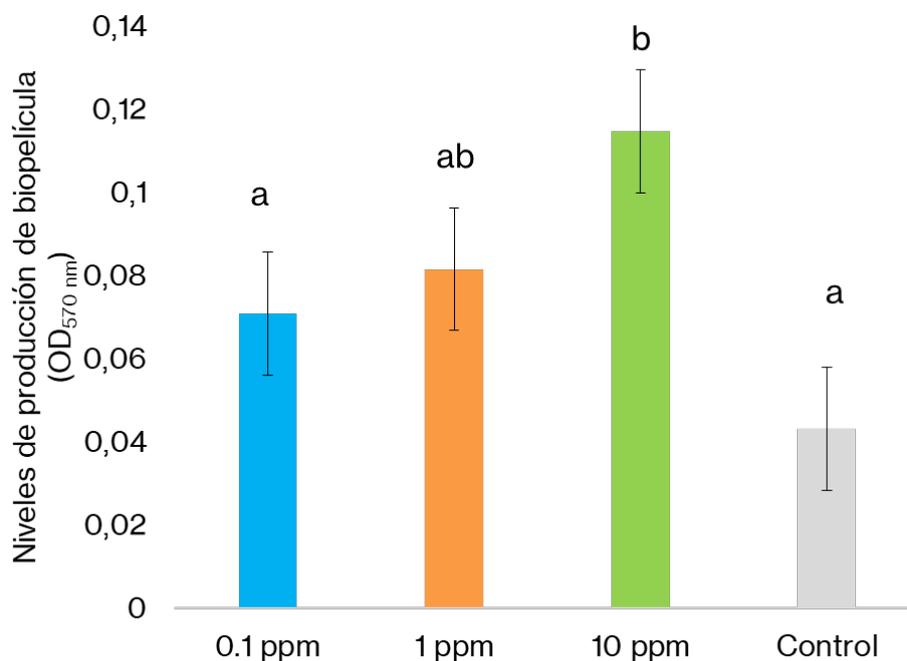


Figura 27. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 5 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 6. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Clorofita 6 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,048 \pm 0,002 ^a	0,096 \pm 0,007 ^a	0,269 \pm 0,017 ^a	0,327 \pm 0,014 ^a	0,431 \pm 0,052 ^a	0,864 \pm 0,017 ^a	1,036 \pm 0,022 ^a	1,081 \pm 0,05 ^a	1,027 \pm 0,041 ^{ab}	0,933 \pm 0,027 ^{ab}	0,878 \pm 0,025 ^{ab}	0,84 \pm 0,027 ^{ab}	0,836 \pm 0,032 ^{ab}
1 ppm	0,048 \pm 0,001 ^a	0,094 \pm 0,003 ^a	0,247 \pm 0,008 ^a	0,31 \pm 0,007 ^a	0,498 \pm 0,065 ^a	0,863 \pm 0,01 ^a	1,019 \pm 0,02 ^a	1,08 \pm 0,017 ^a	1,016 \pm 0,021 ^a	0,953 \pm 0,031 ^a	0,869 \pm 0,019 ^a	0,827 \pm 0,019 ^{ab}	0,825 \pm 0,026 ^{ab}
10 ppm	0,048 \pm 0,001 ^a	0,102 \pm 0,015 ^a	0,277 \pm 0,031 ^a	0,34 \pm 0,028 ^a	0,48 \pm 0,039 ^a	0,903 \pm 0,034 ^b	1,043 \pm 0,036 ^a	1,121 \pm 0,071 ^a	1,073 \pm 0,031 ^b	0,956 \pm 0,041 ^b	0,913 \pm 0,044 ^b	0,877 \pm 0,05 ^b	0,88 \pm 0,061 ^b
Control positivo	0,048 \pm 0,001 ^a	0,1 \pm 0,011 ^a	0,265 \pm 0,022 ^a	0,323 \pm 0,026 ^a	0,479 \pm 0,07 ^a	0,867 \pm 0,019 ^a	1,033 \pm 0,023 ^a	1,061 \pm 0,028 ^a	1,031 \pm 0,034 ^{ab}	0,905 \pm 0,018 ^{ab}	0,863 \pm 0,006 ^a	0,821 \pm 0,015 ^a	0,818 \pm 0,021 ^a

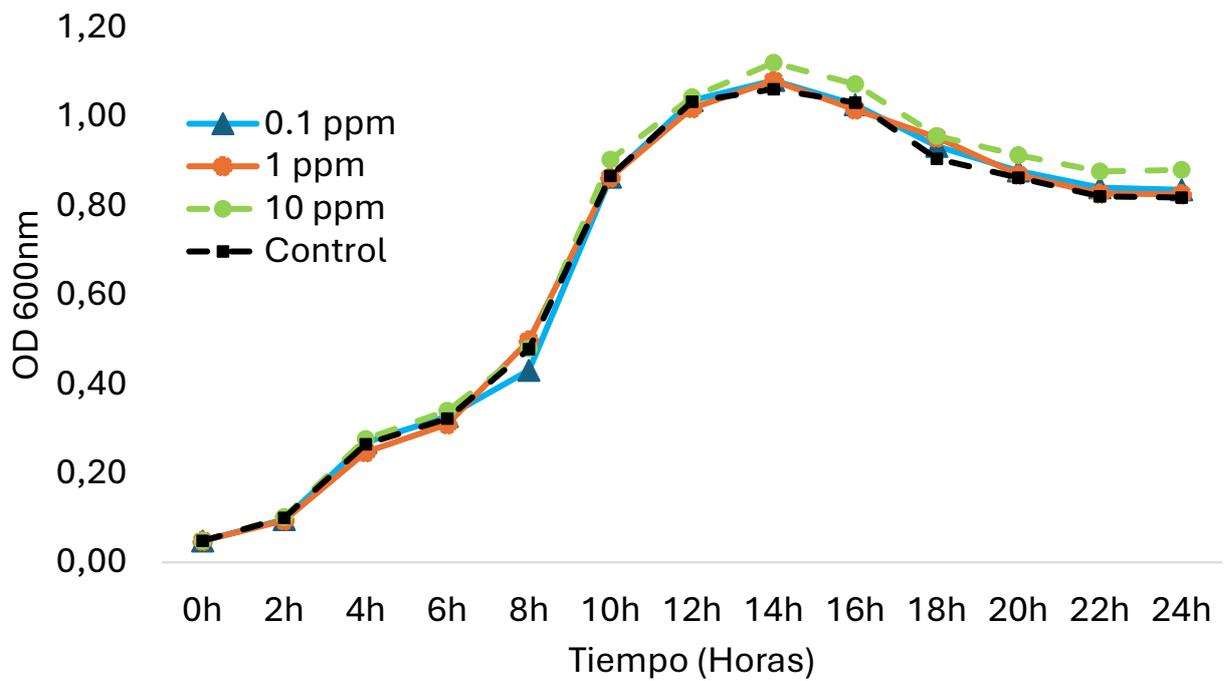


Figura 28. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto).

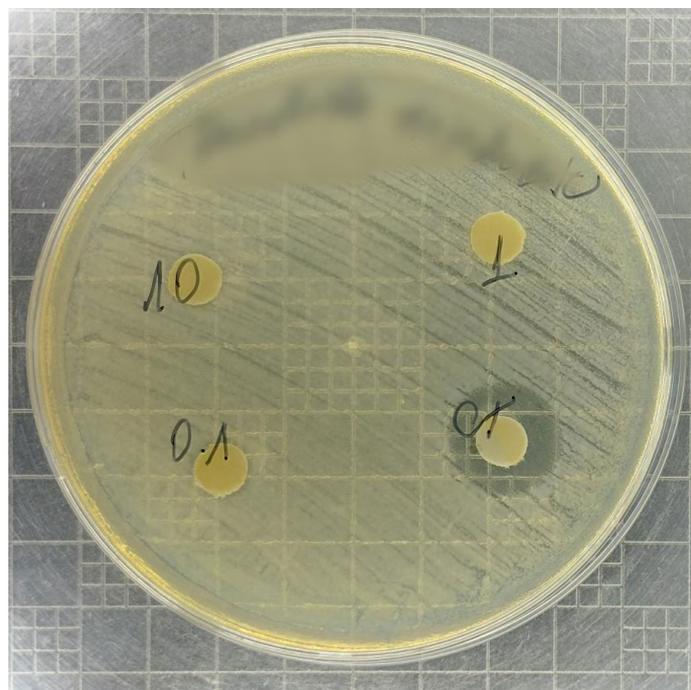


Figura 29. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Clorofita 6, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

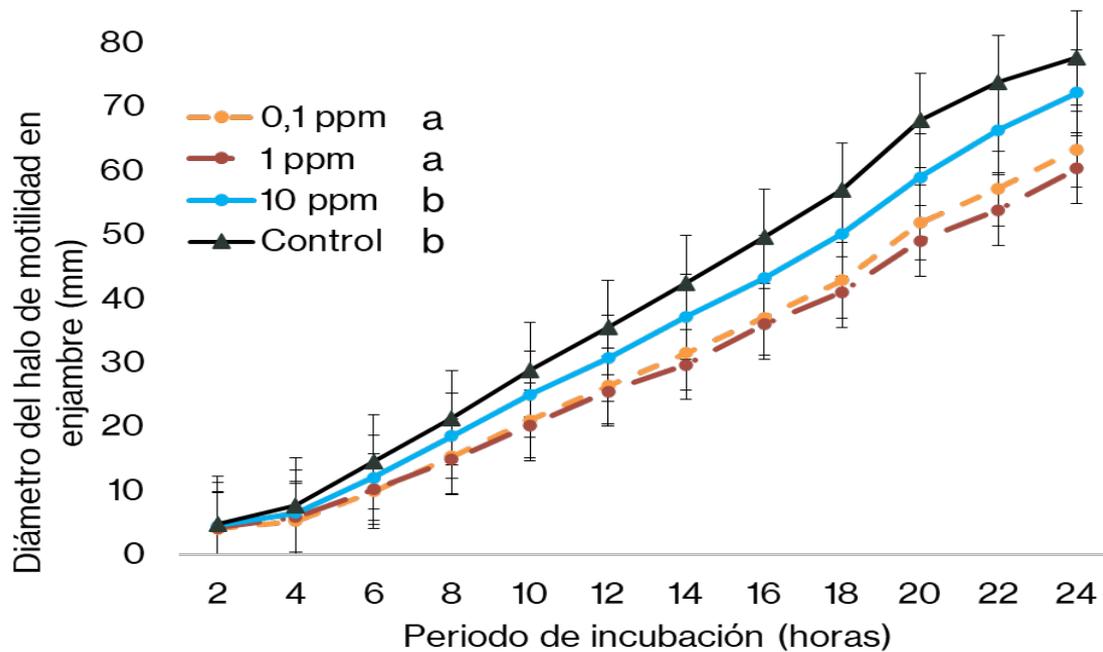


Figura 30. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

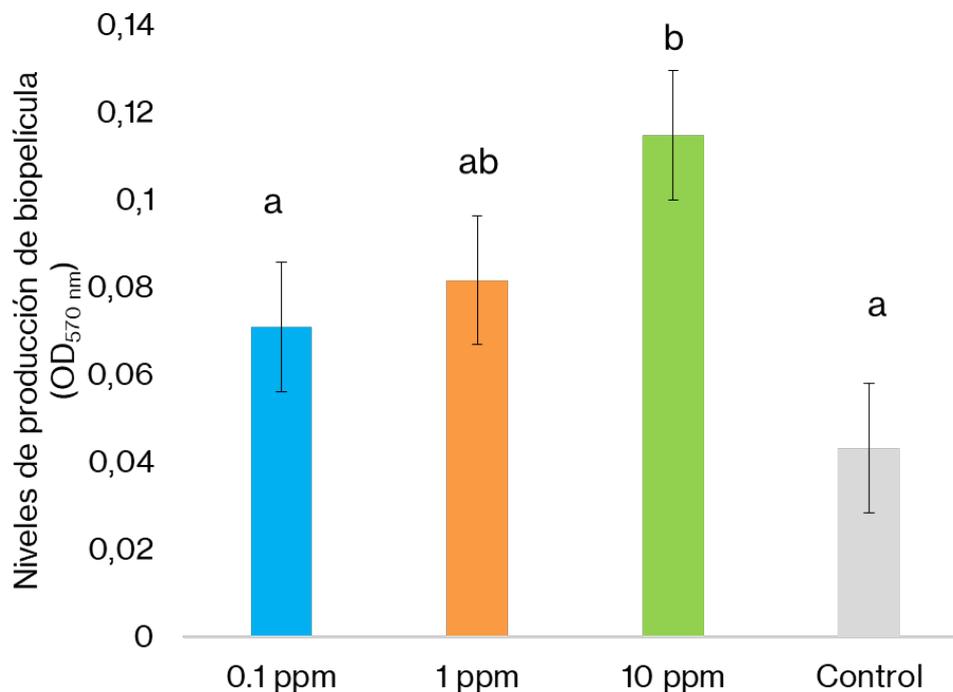


Figura 31. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Clorofita 6 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 7. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de *Diatomea* 1 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,048 \pm 0,004 ^a	0,078 \pm 0,008 ^{ab}	0,303 \pm 0,02 ^b	0,357 \pm 0,009 ^b	0,482 \pm 0,016 ^a	1,077 \pm 0,012 ^b	1,285 \pm 0,006 ^{ab}	1,28 \pm 0,051 ^a	1,315 \pm 0,017 ^{ab}	1,241 \pm 0,019 ^{ab}	1,206 \pm 0,009 ^a	1,192 \pm 0,008 ^{ab}	1,153 \pm 0,047 ^a
1 ppm	0,047 \pm 0,002 ^a	0,09 \pm 0,003 ^c	0,293 \pm 0,016 ^b	0,355 \pm 0,008 ^b	0,487 \pm 0,017 ^a	1,084 \pm 0,01 ^b	1,286 \pm 0,013 ^{ab}	1,246 \pm 0,014 ^a	1,287 \pm 0,022 ^a	1,228 \pm 0,025 ^a	1,198 \pm 0,019 ^a	1,191 \pm 0,018 ^{ab}	1,137 \pm 0,027 ^a
10 ppm	0,047 \pm 0,004 ^a	0,084 \pm 0,007 ^{bc}	0,306 \pm 0,008 ^b	0,4 \pm 0,01 ^c	0,508 \pm 0,024 ^a	0,962 \pm 0,027 ^a	1,235 \pm 0,042 ^a	1,288 \pm 0,039 ^a	1,337 \pm 0,043 ^b	1,307 \pm 0,013 ^c	1,257 \pm 0,005 ^b	1,224 \pm 0,043 ^b	1,248 \pm 0,022 ^b
Control positivo	0,049 \pm 0,003 ^a	0,073 \pm 0,002 ^a	0,244 \pm 0,045 ^a	0,333 \pm 0,01 ^a	0,579 \pm 0,043 ^b	1,094 \pm 0,015 ^b	1,337 \pm 0,08 ^b	1,365 \pm 0,049 ^b	1,321 \pm 0,018 ^{ab}	1,275 \pm 0,027 ^{bc}	1,24 \pm 0,021 ^b	1,178 \pm 0,028 ^a	1,181 \pm 0,014 ^a

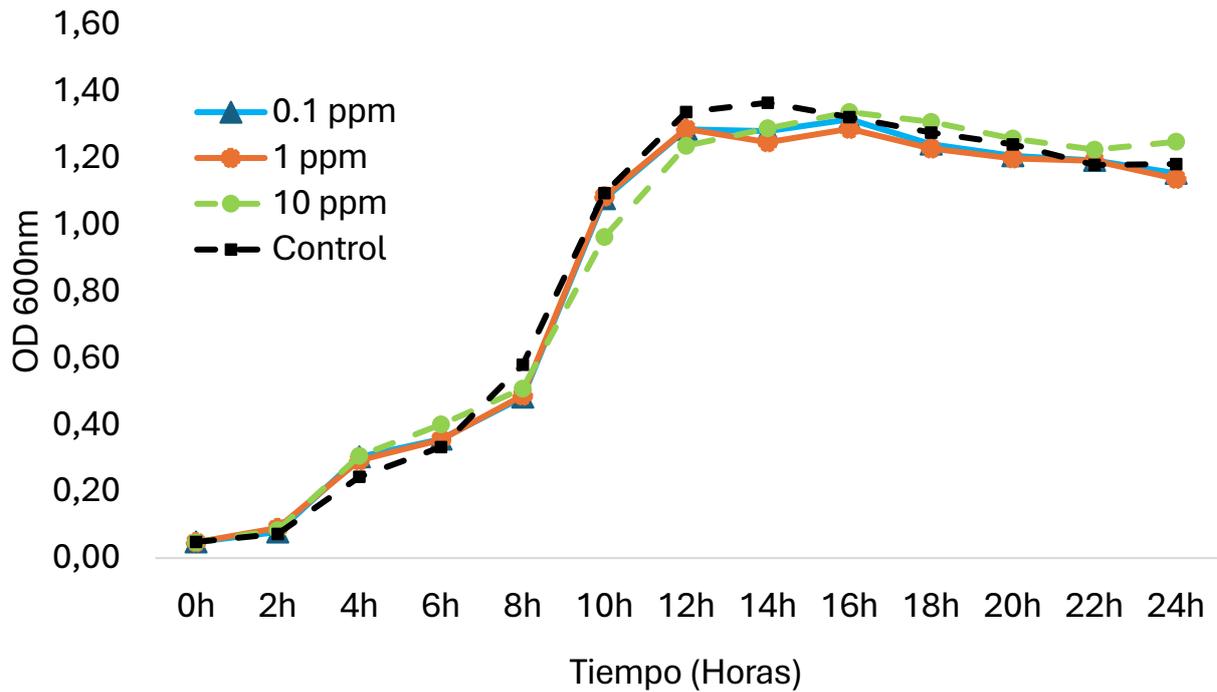


Figura 32. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).

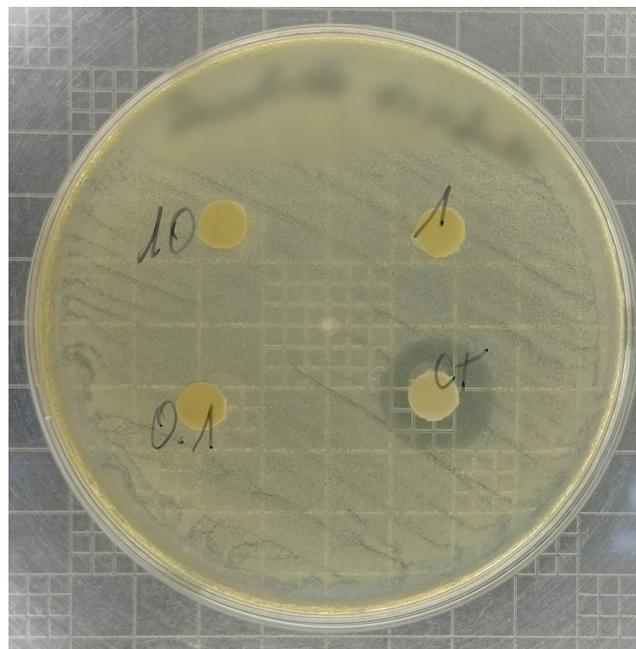


Figura 33. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

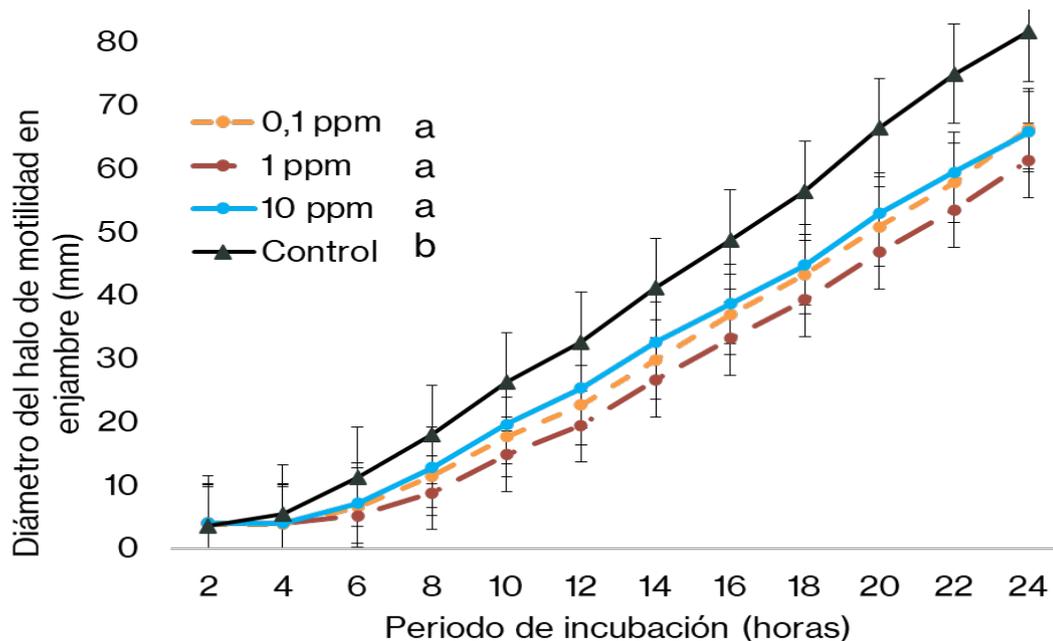


Figura 34. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

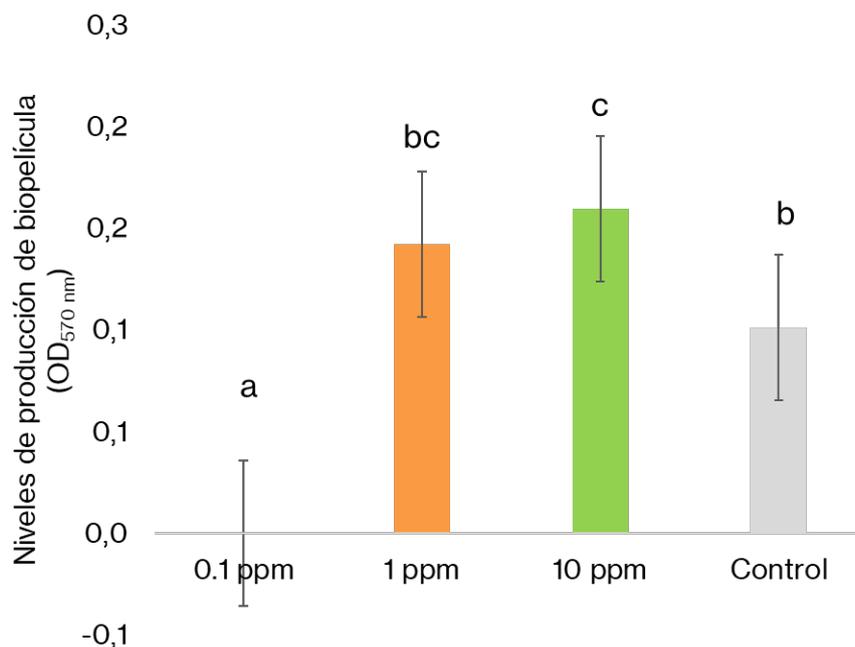


Figura 35. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 8. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de *Diatomea 2* y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,044 \pm 0,001 ^a	0,079 \pm 0,012 ^a	0,29 \pm 0,028 ^{ab}	0,336 \pm 0,025 ^{ab}	0,475 \pm 0,055 ^a	0,795 \pm 0,130 ^a	0,941 \pm 0,117 ^a	0,874 \pm 0,086 ^a	0,861 \pm 0,075 ^a	0,835 \pm 0,052 ^a	0,79 \pm 0,019 ^a	0,792 \pm 0,015 ^a	0,8 \pm 0,02 ^a
1 ppm	0,045 \pm 0,001 ^{ab}	0,09 \pm 0,007 ^a	0,286 \pm 0,017 ^{ab}	0,344 \pm 0,012 ^b	0,528 \pm 0,041 ^a	0,878 \pm 0,014 ^a	1,027 \pm 0,025 ^{ab}	0,984 \pm 0,049 ^b	0,929 \pm 0,018 ^b	0,932 \pm 0,012 ^b	0,836 \pm 0,024 ^b	0,805 \pm 0,018 ^a	0,799 \pm 0,019 ^a
10 ppm	0,047 \pm 0,001 ^b	0,091 \pm 0,006 ^a	0,314 \pm 0,012 ^b	0,359 \pm 0,007 ^b	0,487 \pm 0,059 ^a	0,885 \pm 0,011 ^a	1,03 \pm 0,029 ^{ab}	1,066 \pm 0,029 ^b	1 \pm 0,015 ^c	0,961 \pm 0,036 ^b	0,877 \pm 0,015 ^c	0,86 \pm 0,006 ^b	0,852 \pm 0,007 ^b
Control positivo	0,046 \pm 0,002 ^b	0,082 \pm 0,005 ^a	0,266 \pm 0,016 ^a	0,311 \pm 0,02 ^a	0,459 \pm 0,058 ^a	0,882 \pm 0,034 ^a	1,044 \pm 0,022 ^b	0,974 \pm 0,052 ^b	0,938 \pm 0,021 ^{bc}	0,903 \pm 0,054 ^{ab}	0,82 \pm 0,021 ^{ab}	0,806 \pm 0,021 ^a	0,804 \pm 0,022 ^a

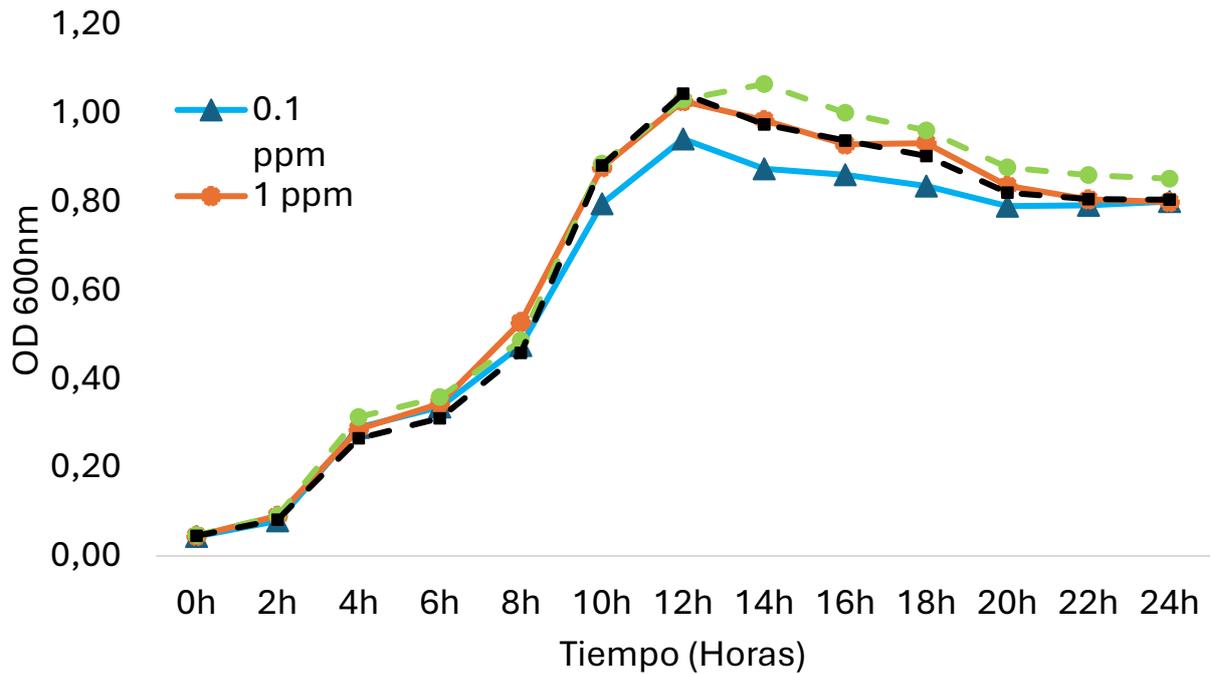


Figura 36. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 2 y un control positivo (cultivo sin extracto).

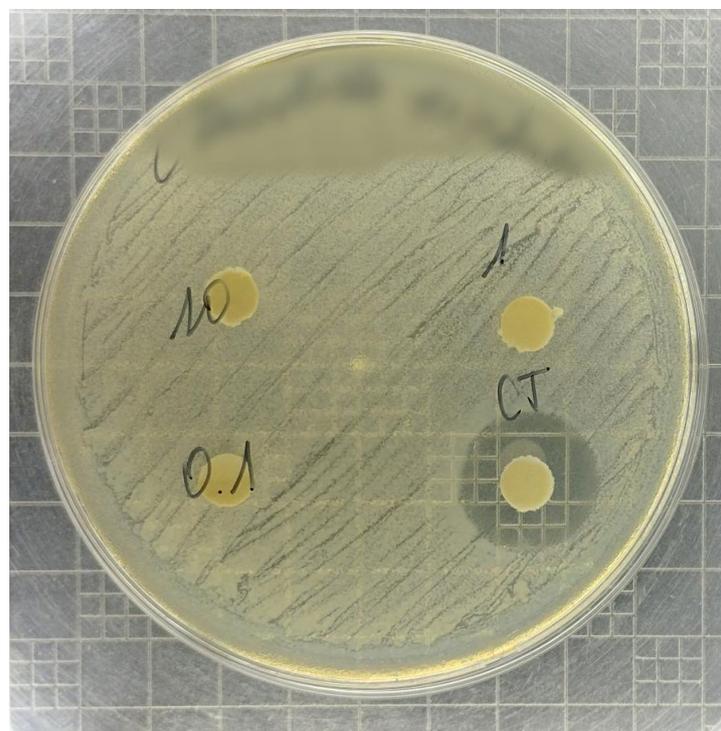


Figura 37. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0,1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 2, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

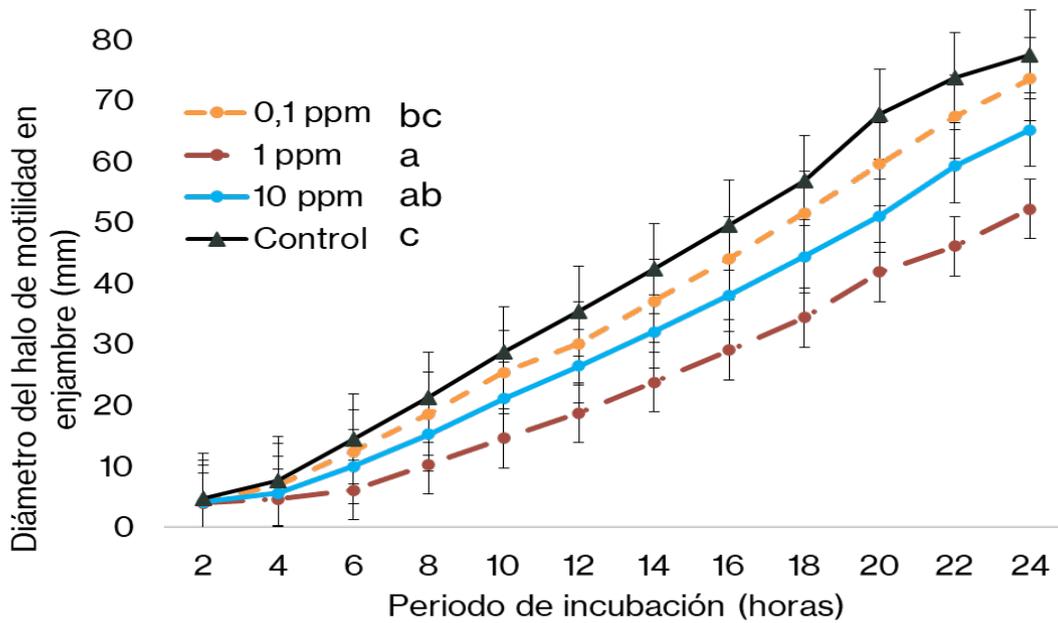


Figura 38. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de *Diatomea 2* y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

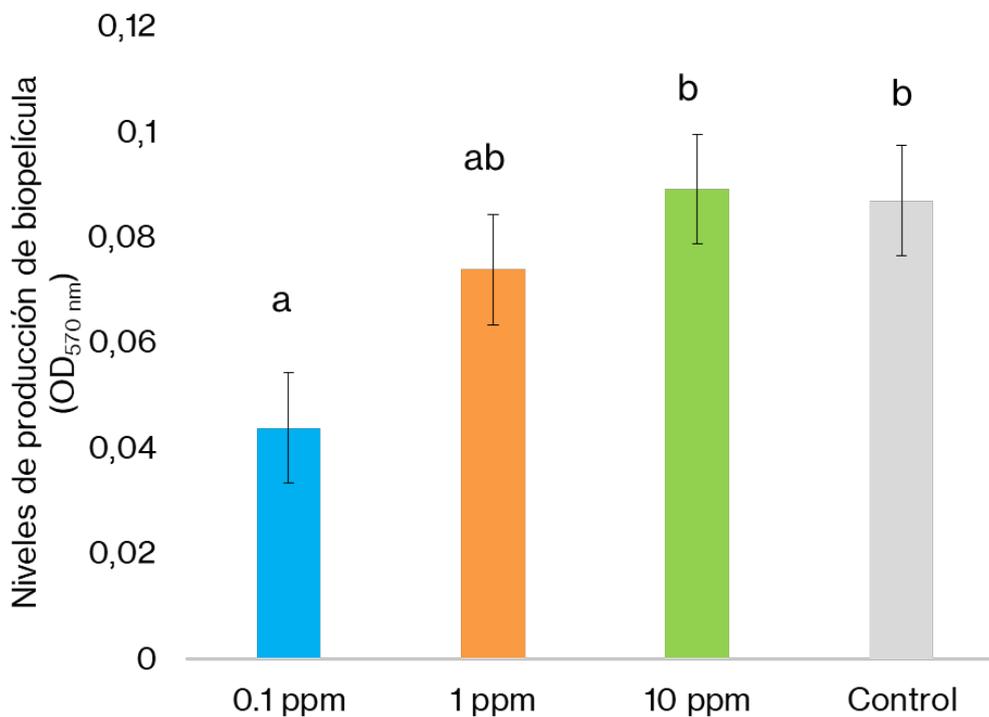


Figura 39. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de *Diatomea 2* y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 9. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de *Diatomea* 3 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,045 \pm 0,001 ^a	0,087 \pm 0,009 ^a	0,314 \pm 0,016 ^b	0,374 \pm 0,017 ^b	0,522 \pm 0,035 ^a	0,853 \pm 0,09 ^a	1,027 \pm 0,065 ^a	0,954 \pm 0,059 ^a	0,917 \pm 0,049 ^a	0,87 \pm 0,052 ^a	0,814 \pm 0,023 ^a	0,801 \pm 0,012 ^a	0,819 \pm 0,019 ^a
1 ppm	0,045 \pm 0,001 ^a	0,087 \pm 0,008 ^a	0,301 \pm 0,037 ^{ab}	0,342 \pm 0,029 ^{ab}	0,473 \pm 0,063 ^a	0,854 \pm 0,044 ^a	1,012 \pm 0,088 ^a	0,957 \pm 0,059 ^a	0,92 \pm 0,052 ^a	0,887 \pm 0,067 ^a	0,827 \pm 0,042 ^a	0,808 \pm 0,018 ^a	0,82 \pm 0,015 ^a
10 ppm	0,048 \pm 0,001 ^b	0,089 \pm 0,007 ^a	0,281 \pm 0,014 ^{ab}	0,353 \pm 0,015 ^b	0,487 \pm 0,063 ^a	0,825 \pm 0,067 ^a	1,095 \pm 0,022 ^a	1,034 \pm 0,067 ^a	0,956 \pm 0,062 ^a	0,96 \pm 0,07 ^a	0,915 \pm 0,057 ^a	0,89 \pm 0,03 ^b	0,908 \pm 0,033 ^b
Control positivo	0,046 \pm 0,002 ^a	0,082 \pm 0,005 ^a	0,266 \pm 0,016 ^a	0,311 \pm 0,02 ^a	0,459 \pm 0,058 ^a	0,882 \pm 0,034 ^a	1,044 \pm 0,022 ^a	0,974 \pm 0,052 ^a	0,938 \pm 0,021 ^a	0,903 \pm 0,054 ^a	0,82 \pm 0,021 ^a	0,806 \pm 0,021 ^a	0,804 \pm 0,022 ^a

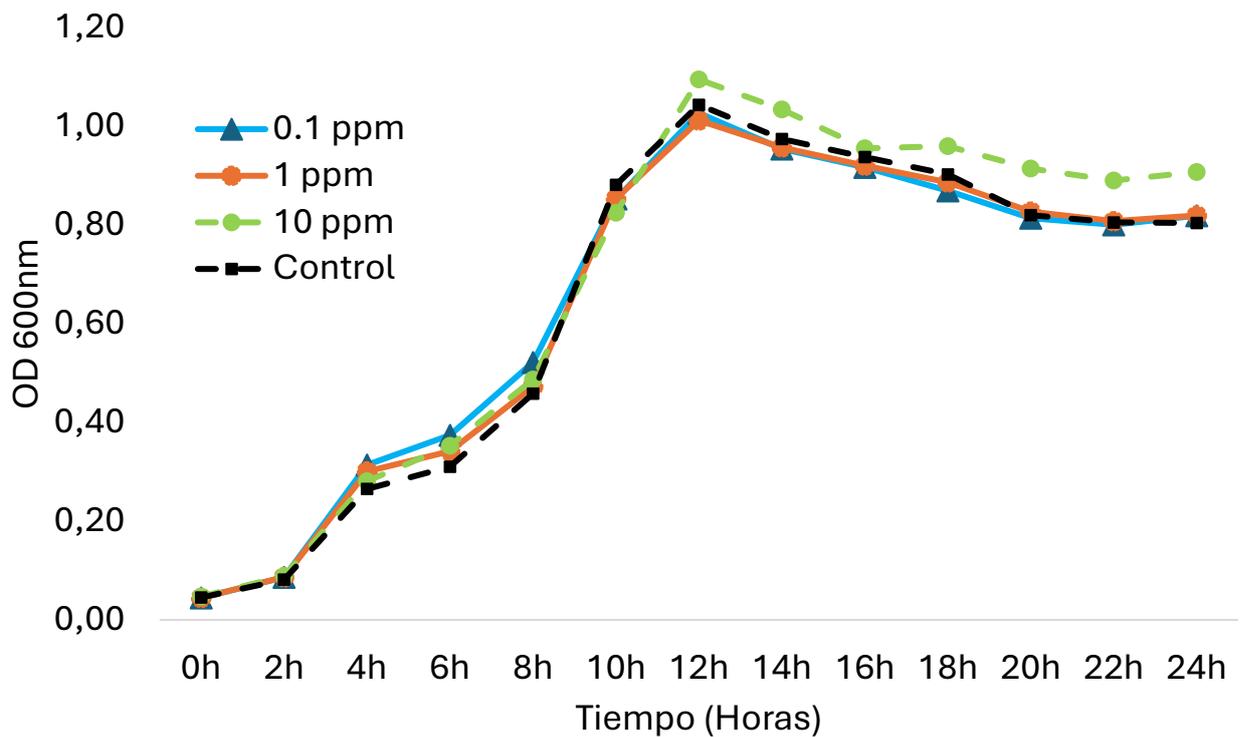


Figura 40. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Diatomea 3 y un control positivo (cultivo sin extracto).

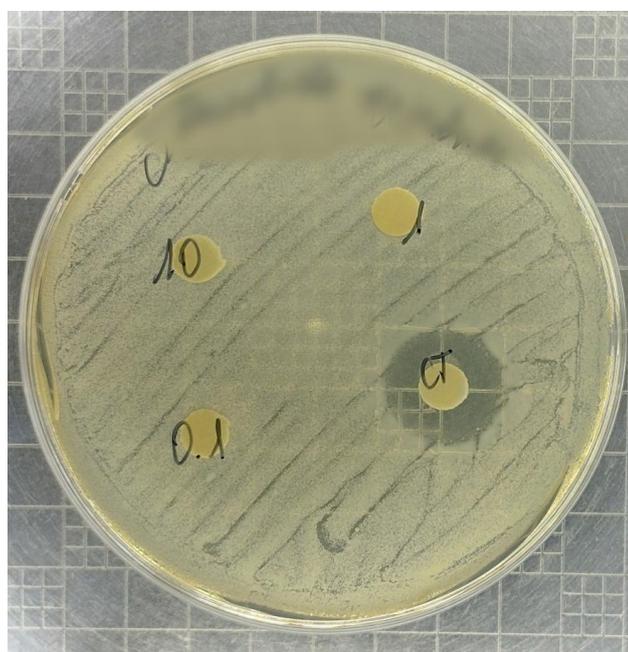


Figura 41. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Diatomea 3, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

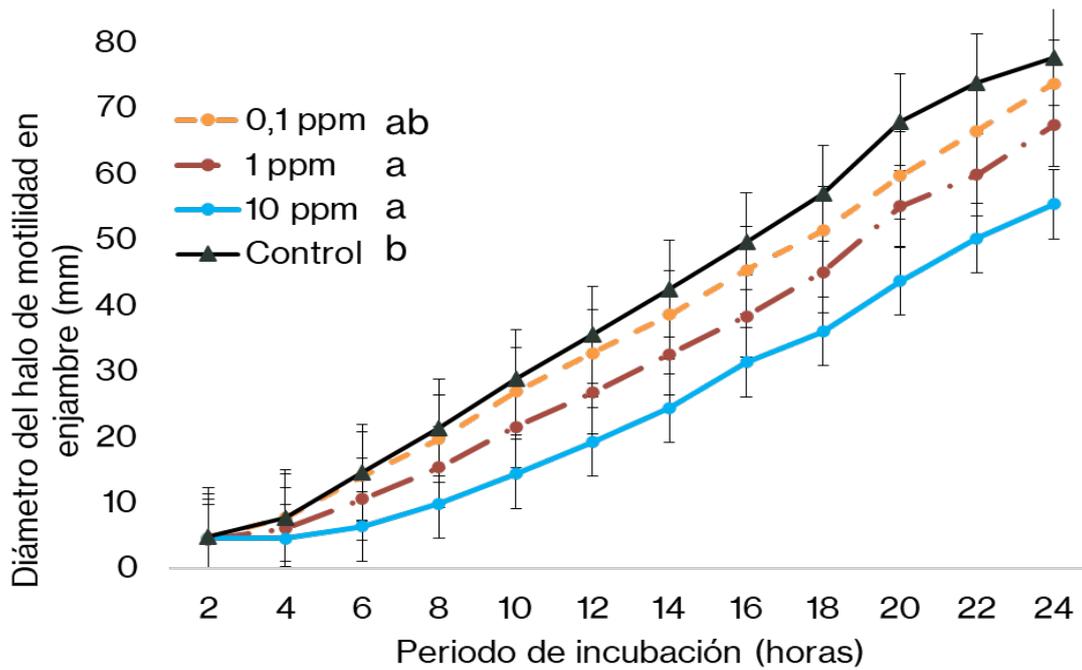


Figura 42. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de *Diatomea 3* y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

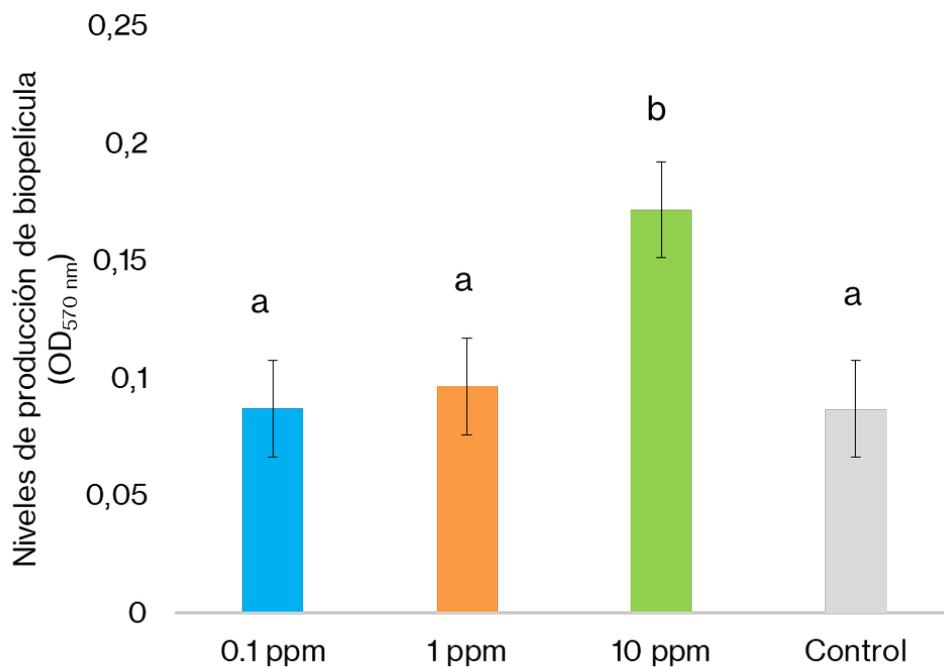


Figura 43. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de *Diatomea 3* y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tabla 10. Crecimiento bacteriano (*OD* 600 nm, media \pm error estándar) de la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a cuatro concentraciones de tres extractos crudos de Haptofita 1 y a un control positivo (cultivo sin extracto). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) conforme al análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
0.1 ppm	0,048 \pm 0,001 ^a	0,102 \pm 0,007 ^a	0,266 \pm 0,022 ^a	0,322 \pm 0,018 ^a	0,497 \pm 0,045 ^{ab}	0,873 \pm 0,012 ^a	1,038 \pm 0,014 ^a	1,037 \pm 0,038 ^a	0,994 \pm 0,028 ^a	0,889 \pm 0,02 ^a	0,853 \pm 0,022 ^a	0,819 \pm 0,028 ^a	0,852 \pm 0,037 ^a
1 ppm	0,048 \pm 0,001 ^a	0,109 \pm 0,006 ^a	0,285 \pm 0,034 ^{ab}	0,337 \pm 0,02 ^a	0,445 \pm 0,038 ^a	0,886 \pm 0,013 ^a	1,034 \pm 0,027 ^a	1,049 \pm 0,024 ^a	0,996 \pm 0,027 ^a	0,911 \pm 0,032 ^a	0,861 \pm 0,024 ^a	0,82 \pm 0,03 ^a	0,85 \pm 0,04 ^a
10 ppm	0,053 \pm 0,003 ^b	0,123 \pm 0,007 ^b	0,323 \pm 0,022 ^b	0,376 \pm 0,018 ^b	0,449 \pm 0,044 ^a	0,907 \pm 0,011 ^b	1,05 \pm 0,02 ^a	1,145 \pm 0,012 ^b	1,057 \pm 0,017 ^b	0,963 \pm 0,004 ^b	0,932 \pm 0,012 ^b	0,921 \pm 0,01 ^b	0,973 \pm 0,026 ^b
Control positivo	0,048 \pm 0,002 ^a	0,104 \pm 0,009 ^a	0,269 \pm 0,015 ^a	0,317 \pm 0,018 ^a	0,534 \pm 0,058 ^b	0,873 \pm 0,015 ^a	1,089 \pm 0,016 ^b	1,039 \pm 0,034 ^a	0,966 \pm 0,021 ^a	0,902 \pm 0,011 ^a	0,871 \pm 0,01 ^a	0,836 \pm 0,017 ^a	0,859 \pm 0,03 ^a

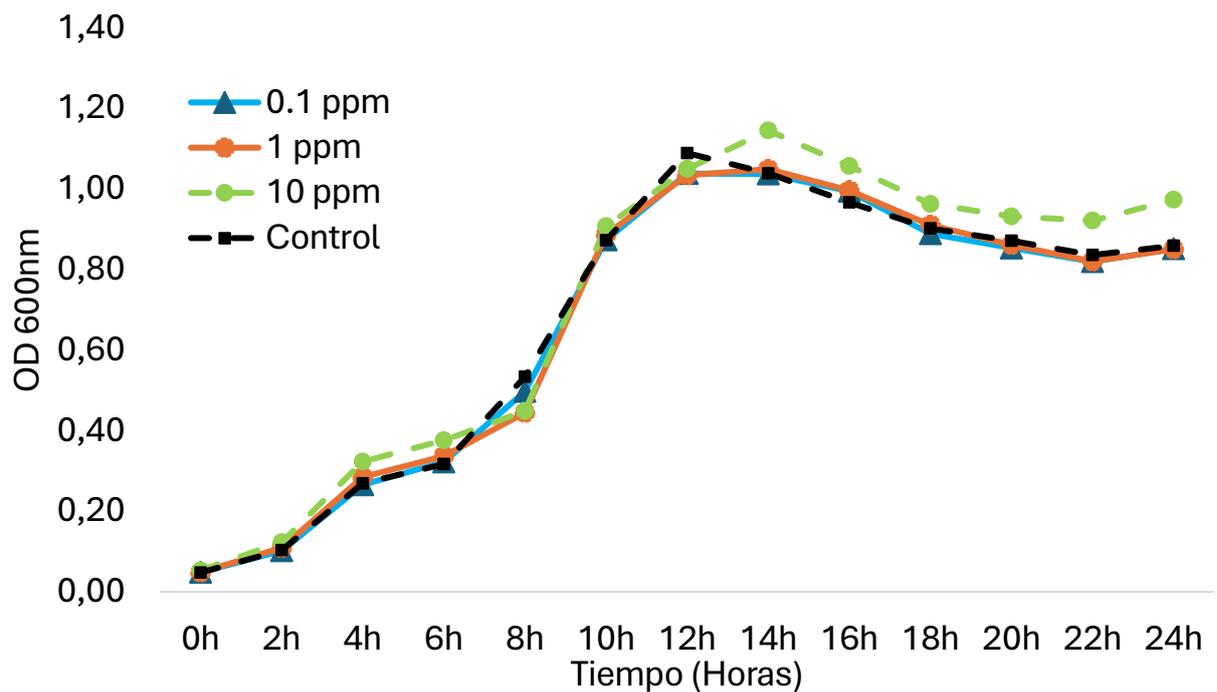


Figura 44. Curvas de crecimiento bacteriano (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto).

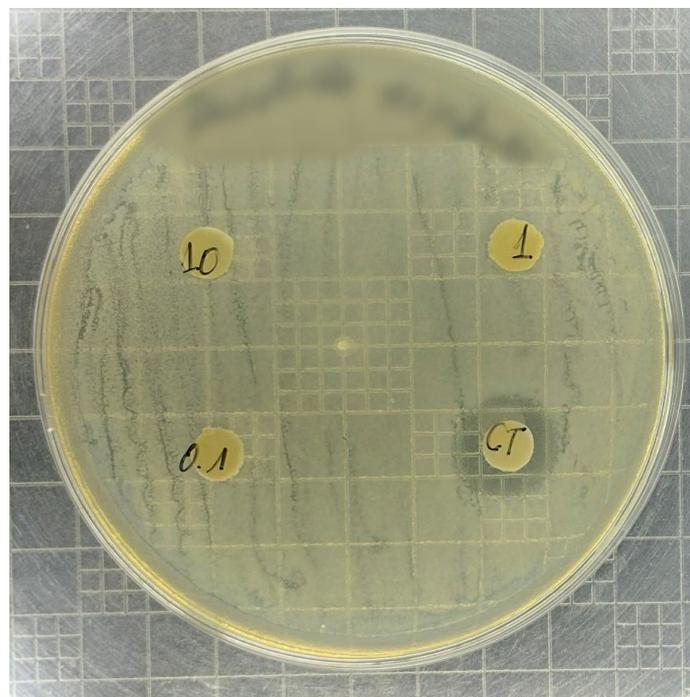


Figura 45. Prueba de sensibilidad de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el método de difusión en disco sobre agar utilizando concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm del extracto de Haptofita 1, con florfenicol a 70 ppm como control positivo.

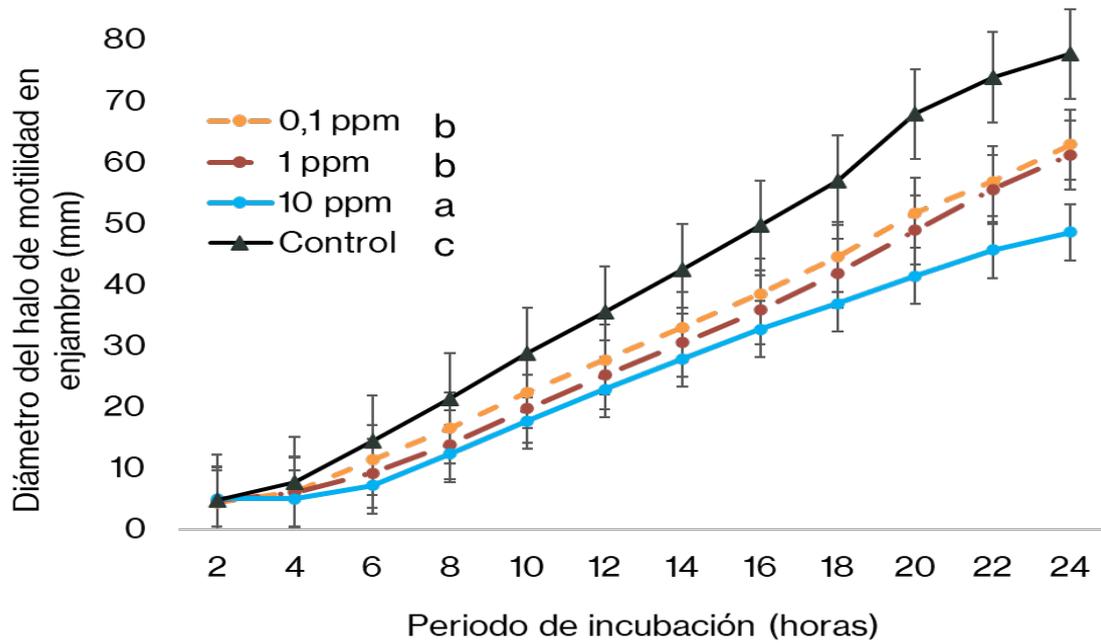


Figura 46. Motilidad en enjambre (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

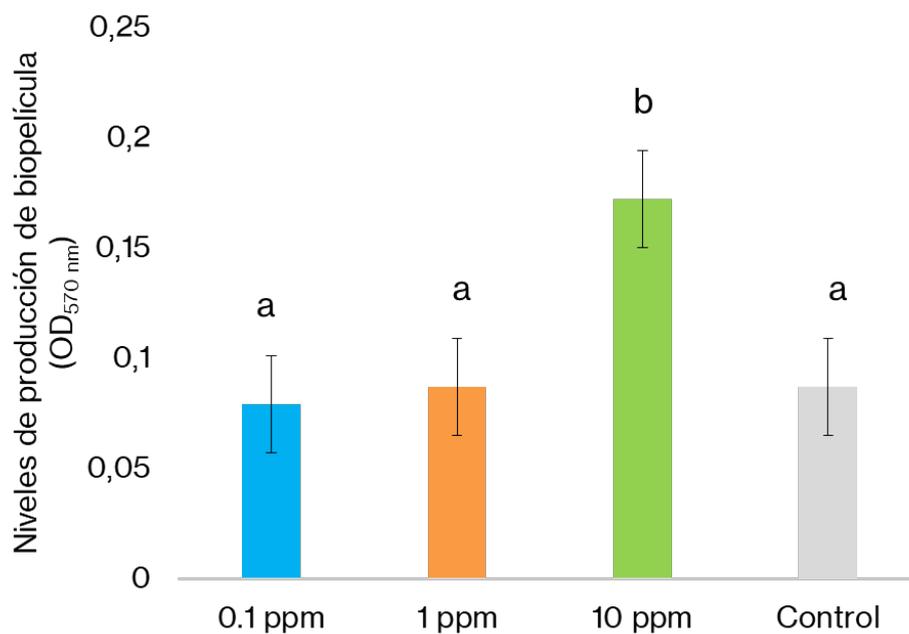


Figura 47. Formación de biopelícula (media \pm error estándar) de *Vibrio parahaemolyticus* en respuesta a la exposición con los extractos crudos de Haptofita 1 y un control positivo (cultivo sin extracto). Letras diferentes señalan diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

3.3 Flujograma

La metodología utilizada en el estudio fue la adecuada para verificar la actividad antivirulenta (inhibición de la biopelícula y/o motilidad de enjambre) de los extractos crudos de las 10 especies de microalgas, así como también para permitir evaluar el efecto de los extractos crudos sobre el crecimiento de la bacteria patógena (Figura 48). La evaluación inicia con la producción y cosecha de biomasa microalgal, seguida de la extracción total con etanol de los compuestos de las microalgas. Paralelamente, se reactiva la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en medios específicos. Para determinar si los extractos afectan el crecimiento de la bacteria patógena se realizan pruebas de sensibilidad antimicrobiana a los extractos (antibiogramas), así como curvas de crecimiento. Para evaluar si ocurre una disminución de los factores de virulencia, se ejecutan pruebas *in vitro*, específicamente para determinar si la exposición de la bacteria patógena a los extractos disminuye la motilidad en enjambre y la formación de biopelícula (Figura 48). Dado que estos dos factores de virulencia son fundamentales para la expresión de la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*; los resultados obtenidos son útiles para evaluar la factibilidad de utilizar los productos como antivirulentos contra la bacteria patógena. La utilización de controles positivos (bacteria patógena sin exposición a los extractos) es fundamental para concluir la evidencia de un potencial uso de los extractos como terapia antivirulenta.

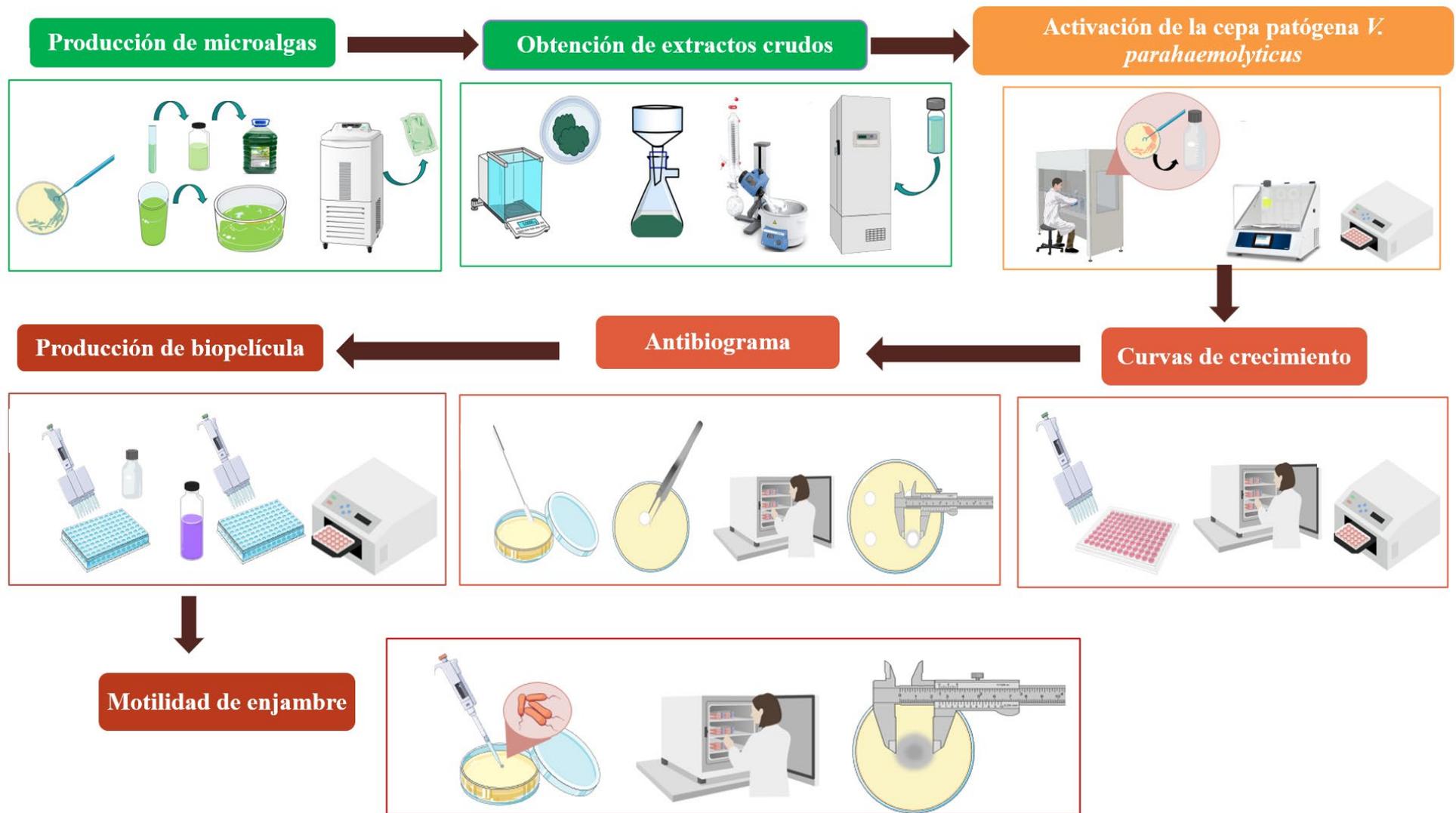


Figura 48. Flujograma

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

Dentro de las biopelículas las bacterias se adhieren en forma coordinada y sésil para protegerse colectivamente de los mecanismos de defensa del huésped y producir toxinas que dañan a los tejidos del huésped. Una vez que se asienta la biopelícula, algunas bacterias realizan el movimiento de enjambre activando los flagelos laterales con los que se mueven, también en forma coordinada, para colonizar y expandirse sobre superficies semisólidas del huésped (por ejemplo, el tracto gastrointestinal del camarón) y empezar el proceso de formación de biopelículas en otras áreas. El movimiento de enjambre es clave para las etapas iniciales de colonización (infecciones agudas). En tanto que, las biopelículas están asociadas a infecciones crónicas dada su capacidad para resistir frente a condiciones adversas y persistir en el huésped. En tal sentido los productos que sean más eficientes para disminuir la motilidad de enjambre serán más adecuados para tratar infecciones agudas, mientras que los productos que muestran un mejor desempeño para disminuir la formación de biopelículas serán adecuados para tratar las infecciones crónicas. Productos que muestren un buen desempeño para disminuir ambos factores de virulencia serán más efectivos dada su versatilidad.

En el estudio, los resultados de las pruebas de motilidad de enjambre mostraron que los extractos crudos de todas las especies de microalgas evaluadas presentaron un efecto inhibitorio sobre la motilidad de *Vibrio parahaemolyticus*, interfiriendo así con uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria. Por consiguiente, todas las especies de microalgas podrían a futuro ser útiles para tratamientos preventivos de infecciones agudas con *V. parahaemolyticus* ya que disminuyeron la motilidad de enjambre a al menos a dos de las concentraciones evaluadas. En cuanto a la formación de biopelículas, cinco de las diez especies estudiadas mostraron una inhibición significativa a la concentración más baja, posicionándolas como candidatas con mayor

potencialidad para el control del patógeno dada su capacidad para disminuir ambos factores de virulencia (motilidad de enjambre y biopelículas), destacando una de esas cinco especies que inhibió las biopelículas a todas las concentraciones evaluadas (Clorofita 1). Estas cinco especies, particularmente Clorofita 1, se perfilan como las especies de mayor versatilidad por la potencialidad para el tratamiento de infecciones agudas y crónicas con *V. parahaemolyticus*. Es destacable el hecho de que los extractos funcionaron a la más baja concentración (0.1 ppm, resultado de la prueba de biopelículas), característica de los productos antivirulentos que funcionan a concentraciones subletales, lo que además facilitaría su aplicación práctica ya que no se necesitará de tanta biomasa del producto para lograr la efectividad deseada.

Los extractos crudos de cuatro especies disminuyeron levemente el crecimiento de la bacteria patógena (cuatro de las seis clorofitas: Clorofita 1, Clorofita 3, Clorofita 4 y Clorofita 5). No obstante, en las pruebas de antibiogramas, ninguna de estas especies presentó halos de inhibición contra la cepa patógena *V. parahaemolyticus* indicando que el crecimiento de la bacteria patógena no fue afectado a ninguna de las concentraciones evaluadas. Es posible que Clorofita 1 posea tanto propiedades antivirulentas como antimicrobianas; se necesitará posteriores estudios para confirmar estos resultados. Los extractos crudos de las restantes seis especies no inhibieron el crecimiento bacteriano, lo que señala que pueden ser usadas como productos potencialmente antivirulentos y no antimicrobianos reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana.

El flujograma elaborado describe el procedimiento experimental desde la producción de microalgas, la extracción de los compuestos bioactivos, hasta las pruebas de sensibilidad, motilidad y biopelículas. Las microalgas demostraron un potencial terapéutico destacable para el

control de la virulencia bacteriana abriendo nuevas perspectivas en la búsqueda de soluciones ecológicas y sostenibles para el control de patógenos en larvicultura de camarón.

Cabe destacar que el costo de producción del extracto crudo, considerando la producción de pasta de microalga, materiales, reactivos, equipos, personal y gastos indirectos, asciende a \$115,26 por la producción de 5 gramos de producto obtenido (Tabla 11). Al escalar la producción de extracto crudo a 20 gramos (cantidad necesaria para aplicar 0.1 ppm de extracto crudo a un tanque de 20 ton por 10 días), el precio de venta con margen de ganancia (30%) es de \$600,00. Este costo debe evaluarse en función de su impacto en la rentabilidad de la producción de larvas, donde el uso del extracto puede aumentar la tasa de supervivencia al 90% (Vera, 2022). Considerando que el costo de producción de larva es de \$1,20/millar de larvas, y que el precio de venta de larva es de \$2,20/millar de larvas, el costo total de producción es de \$72.000,00 (Tabla 12). En condiciones normales, la supervivencia promedio es de alrededor del 70%, lo que genera ganancias proyectadas de \$20.400,00 (Tabla 12). En el caso de un brote infeccioso por *V. parahaemolyticus*, la supervivencia puede disminuir hasta un 14% (Vera, 2022), lo que generaría pérdidas en un ciclo de producción de hasta -\$53.520,00 (Tabla 12). Sin embargo, al aplicar los extractos crudos de microalgas, inclusive en condiciones de infección, la supervivencia puede ser de hasta un 90% (Vera, 2022), lo que generaría una ganancia por ciclo de producción de \$34.800,00 (Tabla 12). Invertir en extractos de microalgas mejora la rentabilidad y actúa como estrategia de mitigación de riesgos al reducir las pérdidas por infecciones. Aunque el costo inicial es elevado, su implementación se justifica por el aumento de ingresos y la reducción de pérdidas, convirtiéndolo en una alternativa económicamente viable para optimizar la producción y sostenibilidad del cultivo de larvas.

Tabla 11. Costo de producción de 5 gramos de extracto crudo de microalgas.

Item	Costo (\$) por 5 g de extracto crudo
Producción de pasta de microalga	\$11,75
Materiales descartables	\$11,87
Reactivos	\$43,66
Material de vidrio	\$0,11
Equipos	\$21,17
Personal	\$17,29
Subtotal	\$94,10
Gastos indirectos (10%)	\$9,41
Costo + Gastos indirectos	\$115,26

Tabla 12. Proyección financiera de un ciclo de producción en un laboratorio de larvas.

Datos de producción	Detalle
Toneladas de 1 tanque de larvicultura	20 ton
No. de tanques promedio en un laboratorio de baja escala	20 tanques
Densidad de siembra promedio en un tanque de larvicultura	150 nauplios/L
Peso de extracto crudo necesario para aplicar (0.1 ppm/día) a un tanque de 20 toneladas durante 10 días de cultivo (2 g/día)	20 g
Costo de 20 g de extracto	\$600/por tanque
Costo de producción de larvas	\$1,20/millar de larvas
Precio de venta de larvas	\$2,20/millar de larvas
Costo total de producción de larvas por ciclo de producción	\$72.000,00
Ganancia considerando 70% de supervivencia (condiciones normales)	\$20.400,00
Pérdida considerando 14% de supervivencia (brote infeccioso)	-\$53.520,00
Ganancia considerando 90% de supervivencia (usando los extractos crudos)	\$34.800,00

4.1.2 Recomendaciones

Tras culminar lo planificado en la propuesta de esta investigación, se obtienen las siguientes recomendaciones primordiales que pueden guiar futuros estudios y ampliar el conocimiento sobre el uso de microalgas para el control de la virulencia de *V. parahaemolyticus*. Aunque los resultados obtenidos fueron prometedores, existen aspectos que no fueron abordados debido a limitaciones de tiempo y recursos, pero que deben ser considerados en investigaciones posteriores.

- 1. Exploración de otros compuestos bioactivos presentes en las microalgas:** Se recomienda investigar los compuestos bioactivos presentes en las especies microalgas evaluadas, con el fin de identificar aquellos que tienen una mayor capacidad para interferir con la virulencia de *V. parahaemolyticus*. Este estudio podría ampliarse utilizando técnicas de aislamiento y caracterización química más avanzadas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas, para descubrir nuevos principios activos que puedan ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas.
- 2. Evaluación a largo plazo de la eficacia y seguridad:** Aunque se demostraron efectos positivos en un contexto *in vitro*, se sugiere realizar estudios adicionales para evaluar la eficacia y seguridad de los extractos crudos de microalgas a largo plazo en modelos *in vivo*. Esto permitirá verificar si los resultados obtenidos en el laboratorio son sostenibles en condiciones más complejas y en organismos vivos, además de evaluar posibles efectos adversos o toxicidad.
- 3. Estudios de sinergia entre diferentes especies de microalgas:** Un enfoque interesante sería investigar la sinergia entre diferentes especies de microalgas, evaluando si su combinación mejora los efectos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus*. Investigaciones futuras podrían incluir la evaluación de mezclas de extractos y su capacidad para reducir la virulencia de manera más eficaz que los extractos individuales.
- 4. Desarrollo de formulaciones comerciales:** Como parte de una futura fase del estudio, sería interesante investigar la posibilidad de desarrollar formulaciones comerciales a partir de los extractos crudos de microalgas, con el fin de promover su uso en la industria de la acuicultura. Este enfoque incluiría el estudio de su estabilidad, eficacia y costo de

producción, así como la evaluación de su impacto en la salud animal y en el medio ambiente.

Referencias

- [1] Abdel-Latif, H. M., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551, 737951. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737951>
- [2] Alsenani, F., Tupally, K. R., Chua, E. T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H. S., & Schenk, P. M. (2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1834-1841. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.11.010>
- [3] Austin, B., & Day, J. (1990). Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90(3-4), 389-392. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90261-k](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90261-k)
- [4] Banco Central del Ecuador. (2023). *Informe de la evolución de la economía ecuatoriana en 2022 y perspectivas 2023*. Quito. Obtenido de https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Administracion/EvolEconEcu_2022pers2023.pdf
- [5] Cámara Nacional de Acuicultura, CNA. (2023). *Cámara Nacional de Acuicultura*. Recuperado el 11 de noviembre de 2024, de <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- [6] Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, 3(9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- [7] Cuéllar-Anjel, J. (2013). *Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS)*. The Center for Food Security and Public Health. Iowa, Estados Unidos.

- [8] Defoirdt T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in microbiology*, 26(4), 313–328.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>
- [9] Emerenciano, M. G. C., Rombenso, A. N., Vieira, F. D. N., Martins, M. A., Coman, G. J., Truong, H. H., Noble, T. H., & Simon, C. J. (2022). Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding. *Animals*, 12(3), 236.
<https://doi.org/10.3390/ani12030236>
- [10] Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- [11] Ge, H., Li, J., Chen, P., Chang, Z., Shen, M., & Zhao, F. (2017). Cultivation of green algae *Platymonas helgolandica* in rearing water enhances the growth performance and resistance of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Aquaculture International*, 25(3), 1279-1290.
<https://doi.org/10.1007/s10499-017-0113-6>
- [12] Haibo Zhou, Xinmei Liu, Wenyan Hu, Jun Yang, Hui Jiang, Xiaojie Sun, Xiaomei Bie, Zhaoxin Lu, Feng Xue, Dexin Zeng, Luyan Jiang, Qiushi Feng, Yan Liu, Wei Shen. (2022). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail aquatic products in Nanjing, China. *Food Research International*, 162(Part A), 112026.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112026>
- [13] Hoa, T. T., Fagnon, M. S., Thy, D. T. M., Chabrilat, T., Trung, N. B., & Kerros, S. (2023). Growth Performance and Disease Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed Essential Oil Blend (Phyto AquaBiotic). *Animals*, 13(21), 3320.
<https://doi.org/10.3390/ani13213320>

- [14] Jong Soo Mok, Sung Rae Cho, Yu Jeong Park, Mi Ra Jo, Kwang Soo Ha, Poong Ho Kim, Min Ju Kim. (2021). Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112785.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112785>
- [15] Jusidin, M. R., Othman, R., Shaleh, S. R. M., Ching, F. F., Senoo, S., & Oslan, S. N. H. (2022). In Vitro Antibacterial Activity of Marine Microalgae Extract against *Vibrio harveyi*. *Applied Sciences*, 12(3), 1148.
<https://doi.org/10.3390/app12031148>
- [16] Kuo, J. C., Chang, Y. H., Chen, T. Y., & Chen, Y. M. (2015). Elucidation of anti-*Vibrio* factors associated with green alga *Picochlorum* sp. strain S1b. *Journal of Applied Phycology*, 27, 257-265.
- [17] Letchumanan, V., Chan, K., & Lee, L. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers In Microbiology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>
- [18] Pozo, F., Borbor, M., Solórzano, R., Sonnenholzner, S., & Bayot, B. (2024). Optimized swarming motility assay to identify anti-virulence products against *Vibrio parahaemolyticus*, a pathogen of farmed shrimp. *MethodsX*, 12, 102622.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102622>
- [19] Rahman, M. S., Carraro, R., Cardazzo, B., Carraro, L., Meneguolo, D. B., Martino, M. E., Andreani, N. A., Bordin, P., Mioni, R., Barco, L., Novelli, E., Balzan, S., & Fasolato, L. (2017). Molecular Typing of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Mollusks in the North Adriatic Sea. *Foodborne pathogens and disease*, 14(8), 454–464. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2263>
- [20] Vahdati, S. N., Behboudi, H., Tavakoli, S., Aminian, F., & Ranjbar, R. (2022). Antimicrobial Potential of the Green Microalgae Isolated from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Public Health*. <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i5.9428>

- [21] Vera, M. (2022). Uso de *Artemia franciscana* enriquecida con extractos de algas marinas para el control de *Vibrio parahaemolyticus* en larvas *Penaeus vannamei*. [TESIS].
Escuela Superior Politécnica del Litoral
- [22] Yu, L. H., The, C. S. J., Yap, K. P., & Thong, K. L. (2020). Diagnostic approaches and contribution of next-generation sequencing technologies in genomic investigation of *Vibrio parahaemolyticus* that caused acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 28, 2547-2559.
- [23] Zheng, Z., Li, R., Aweya, J. J., Yao, D., Wang, F., Li, S., Tuan, T. N., & Zhang, Y. (2021). The PirB toxin protein from *Vibrio parahaemolyticus* induces apoptosis in hemocytes of *Penaeus vannamei*. *Virulence*, 12(1), 481-492.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1872171>
- [24] Dehbanipour, R., & Ghalavand, Z. (2022). Anti-virulence therapeutic strategies against bacterial infections: recent advances. *Germs*, 12(2), 262–275.
<https://doi.org/10.18683/germs.2022.1328>