

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE
MICROALGAS SOBRE PATÓGENOS ASOCIADOS A ESTREPTOCOCOSIS EN
TILAPIA**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR/A:

JEFFERSON ANDRÉS LIMA ANDRADE

DIRECTOR:

Ing. CARLA SANDOVAL GUANO, MSc.

Ibarra, 2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA EN

BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE MICROALGAS SOBRE PATÓGENOS ASOCIADOS A ESTREPTOCOCOSIS EN TILAPIA”

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como
requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

CARLA SANDOVAL, MSc.

DIRECTOR



FIRMA

PEDRO BARBA, MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

ANDREA CHILQUINGA, MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	100420430-9	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	LIMA ANDRADE JEFFERSON ANDRÉS	
DIRECCIÓN:		ATUNTAQUI	
EMAIL:		jalimaa@utn.edu.ec	
TELÉFONO FIJO:	2907544	TELÉFONO MÓVIL:	0969523996

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE MICROALGAS SOBRE PATÓGENOS ASOCIADOS A ESTREPTOCOCOSIS EN TILAPIA
AUTOR (ES):	JEFFERSON ANDRÉS LIMA ANDRADE
FECHA: DD/MM/AAAA	02/06/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. CARLA SANDOVAL MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 2 días del mes de junio de 2022

EL AUTOR:

(Firma) 
Nombre: Jefferson Andrés Lima Andrade

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradecer a mi familia por todo el apoyo brindado, por la comprensión, y por las enseñanzas que me ayudaron a formar mi carácter que hoy me ha permitido llegar a esta meta planteada hace mucho tiempo.

A mi carrera de ingeniería en Biotecnología, la cual me convirtió en un apasionado por la ciencia e investigación, en donde logré descubrir una nueva perspectiva que estimuló mi curiosidad e imaginación, y donde pude de desarrollar conocimientos invaluable que sé que me servirán para toda mi vida.

A todos esos ingenieros que aparecieron en el transcurso de mis estudios, los cuales supieron compartir de forma excepcional su conocimiento, y me hicieron entender a esta carrera de una forma totalmente diferente, a aquellos que me mostraron que ser un buen profesional va mucho más allá de simples notas académicas.

A mis compañeros, con los que supimos superarnos juntos, apoyarnos en los momentos que lo necesitábamos, y con los cuales se compartió buenos momentos más allá de un salón de clases.

A todo el personal de los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Biotecnología Aplicada, quienes brindaron su atención y apoyo para que pudiera desenvolverme en sus instalaciones de manera productiva con el fin de desarrollar mis actividades.

DEDICATORIA

A mis padres, Pablo Lima y Dalva Andrade, por brindarme el apoyo, confianza y paciencia necesaria para que lograra cumplir todos mis objetivos, enseñándome que las limitaciones solo se encuentran en la mente, y que el trabajo duro siempre retribuye con resultados.

A mis hermanos mayores Byron e Irene quienes han estado siempre para recordarme que los problemas son pasajeros, y que ellos siempre estarán ahí para brindarme su mano cuando la necesite.

A mi tío Segundo Lima, quien fue un soporte muy fundamental para mi familia en todas las ocasiones en las que necesitábamos ayuda y él siempre supo brindárnosla.

A mi persona, quien sabe cuánto trabajo y dedicación demando este trabajo, quien sabe que a pesar de que existieron momentos en donde se mermaban las fuerzas para continuar, siempre supo levantar la cabeza y seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	11
CAPÍTULO I.....	14
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Antecedentes	14
1.2 Planteamiento del problema	17
1.3 Justificación.....	18
1.4 Pregunta directriz	19
1.5 Objetivos	19
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	19
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
1.6 Hipótesis.....	20
CAPÍTULO II	21
2 MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Tilapia	21
2.2 Anatomía del pez.....	21
2.3 Enfermedades comunes presentes tilapia	22
2.3.1 <i>Síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (SHB)</i>	23
2.3.2 <i>Micobacteriosis</i>	23
2.3.3 <i>Pseudomoniasis</i>	24
2.3.4 <i>Estreptococosis en tilapia</i>	24
2.4 <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
2.4.1 <i>Técnicas moleculares usadas para el estudio epidemiológico de S. agalactiae</i>	26
2.5 Coinfecciones en Tilapia.....	26
2.5.1 <i>Coinfección bacteriana</i>	27
2.6 Microalgas.....	27
2.7 Compuestos bioactivos de las microalgas	28
2.8 Bioactividad antimicrobiana de microalgas	29
2.9 Cultivo de microalgas.....	30
2.10 Cinética de crecimiento.....	31
2.11 Recuento celular	32

2.11.1	<i>Cámara de Neubauer</i>	32
2.12	Densidad óptica	33
2.13	Curva de crecimiento	33
2.13.1	<i>Fases en una curva de crecimiento</i>	33
2.13.2	<i>Tasa de crecimiento</i>	34
2.14	Antibiogramas	36
2.15	Concentración mínima inhibitoria.....	37
CAPÍTULO III		38
3	METODOLOGÍA	38
3.1	Ubicación del área de estudio.....	38
3.2	Cultivo de microalga	38
3.2.1	<i>Siembra en medio sólido</i>	38
3.3	Condiciones de cultivo y escalamiento	39
3.3.1	<i>Modo de operación del fotobiorreactor de 1 litro</i>	39
3.3.2	<i>Inoculación al fotobiorreactor de 1 litro</i>	41
3.4	Parámetros cinéticos.....	41
3.4.1	<i>Toma de muestra</i>	41
3.4.2	<i>Absorbancia</i>	41
3.4.3	<i>Concentración de células por ml</i>	42
3.4.4	<i>Relación entre absorbancia y concentración celular</i>	42
3.4.5	<i>Análisis estadístico</i>	43
3.5	Cosecha	43
3.5.1	<i>Rendimiento de biomasa microalgal</i>	44
3.6	Obtención del extracto intracelular mediante ruptura celular por sonicación	45
3.7	Determinación de carbohidratos totales (Dubois) mediante Fenol-Ácido sulfúrico ...	46
3.7.1	<i>Preparación de la curva patrón</i>	47
3.7.2	<i>Preparación y medida de la muestra</i>	48
3.7.3	<i>Análisis estadístico</i>	48
3.8	Evaluación de la bioactividad	49
3.8.1	<i>Selección de tilapias enfermas</i>	49
3.9	Cultivo a partir de órganos diana	49
3.10	Aislamiento del patógeno.....	50
3.10.1	<i>Prueba de Catalasa</i>	50
3.10.2	<i>Tinción Gram y morfología</i>	50
3.10.3	<i>Identificación de microorganismos mediante espectrometría de masas MALDI-ToF</i>	50
3.11	Ensayos de actividad antimicrobiana	51

3.11.1	<i>Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de microalga.</i>	54
3.11.2	<i>Análisis estadístico</i>	56
CAPÍTULO IV		57
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1	Curva de crecimiento de las microalgas	57
4.2	Obtención de extractos de cultivo de microalga	60
4.2.1	<i>Extracto crudo</i>	60
4.2.2	<i>Extracto intracelular</i>	62
4.3	Identificación de patógenos a partir de tejidos de tilapia	66
4.4	Actividad antimicrobiana de extractos de microalga	70
CAPITULO V		77
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
5.1	Conclusiones	77
5.2	Recomendaciones	78
REFERENCIAS		81
ANEXOS		99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Anatomía externa de un pez, (b) Anatomía interna de un pez (FAO, 2011).	21
Figura 2. Características antimicrobianas de algunos compuestos de microalgas.	33
Figura 3. Curva de crecimiento, a) Fase lag, b) Fase aceleración, c) Fase exponencial, d) Fase de desaceleración, e) Fase estacionaria, f) Fase de muerte.	34
Figura 4. Ensayo de susceptibilidad por dilución en caldo (Ryan, 2003).	37
Figura 5. Esquema del cultivo de microalgas.	39
Figura 6. Diseño del fotobiorreactor para microalgas. a) Bomba de aire (bomba de pecera); b) Manguera con Filtro Micropore 0.22 micras; c) Manguera de pecera (entrada de aire); d) Manguera con filtro de algodón (salida de aire); e) Manguera de destroza para toma de muestra; f) Tapa metálica; g) Manguera de pecera; h) Frasco de vidrio (2 Litros); i) Manguera difusora de aire.	40
Figura 7. Esquema del proceso de cosecha de biomasa microalgal.	43
Figura 8. Productos obtenidos del cultivo de microalgas.	44
Figura 9. Biomasa seca de microalgas.	44
Figura 10. Esquema del proceso de ruptura celular de microalgas por el método de sonicación.	46
Figura 11. Disección y selección de órganos de tilapia.	49
Figura 12. Discos con extracto de microalga sobre el medio MH inoculado con <i>S. agalactiae</i>	53
Figura 13. Diagrama del proceso de ensayo de actividad antimicrobiana.	54
Figura 14. Método de macro dilución. Extracto de microalga (verde), medio TSB (amarillo).	55
Figura 15. Curvas de crecimiento de las microalgas.	58
Figura 16. Rendimiento de especies de las microalgas de acuerdo con el consumo del sustrato.	61
Figura 17. Concentración de carbohidratos totales de microalgas.	63
Figura 18. <i>Chlamydomona agloiformis</i> , vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.	65
Figura 19. <i>Pectinodesmus pectinatus</i> , vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.	66
Figura 20. <i>Ettlia pseudoalveolaris</i> , vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.	66
Figura 21. Ensayos de bioactividad con los extractos de microalgas.	70
Figura 22. Tratamientos usados en los ensayos de bioactividad.	73
Figura 23. Curva de Absorbancia vs Concentración de extracto de microalga.	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias en el comportamiento y la apariencia física externa de un pez sano y de un enfermo	22
Tabla 2. Características antimicrobianas de algunos compuestos de microalgas.....	29
Tabla 3. Factores y niveles de estudio	52
Tabla 4. Tratamientos experimentales.....	52
Tabla 5. Parámetros de crecimiento obtenidos durante el cultivo de microalgas.....	57
Tabla 6. Microorganismos identificados taxonómicamente por espectrometría de masas MALDI TOF	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de muestreo de Tilapias.	99
Anexo 2. Ubicación de laboratorios de Biotecnología.	99
Anexo 3. Formulación de Medio Murashige y Skoog para microalgas.	100
Anexo 4. Composición de medio comercial.	100
Anexo 5. Selección de peces enfermos.	100
Anexo 6. Frotis del ojo y opérculo de la tilapia.	100
Anexo 7. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de <i>Chlamydomona agloiformis</i>	101
Anexo 8. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de <i>Pectinodesmus pectinatus</i>	101
Anexo 9. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de <i>Ettlia pseudoalveolaris</i>	102
Anexo 10. Biomasa y rendimiento de especies de microalga estudiadas.	102
Anexo 11. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos totales en el sobrenadante.	102
Anexo 12. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos totales en la muestra sonicada.	103
Anexo 13. Códigos iniciales y finales que se obtuvieron a partir del cultivo de tejidos de tilapia.	103
Anexo 14. Especies patógenas aisladas de tejidos de tilapias enfermas.	104
Anexo 15. Halos de inhibición de los extractos de microalga.	105
Anexo 16. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos de microalga.	106
Anexo 17. Datos de absorbancia y crecimiento en placa de los distintas concentraciones de extracto de microalga.	106
Anexo 18. Crecimiento en placas con extracto de microalgas a distintas concentraciones.	107

RESUMEN

El cultivo de tilapia en el Ecuador se ha posicionado como el segundo producto acuícola más exportado, generando ganancias de \$ 3 millones de dólares; sin embargo, existen enfermedades de origen bacteriano que representan un riesgo en su producción a nivel mundial, siendo la estreptococosis una de las más importantes. Diversos antibióticos se han usado para controlar la infección por *Streptococcus* spp., pero ninguno ha probado ser eficaz; por lo que se plantean nuevas alternativas, una de ellas es el uso de extractos de microalgas, mismas que poseen propiedades antimicrobianas que pueden ser aplicadas como tratamiento contra estos patógenos. En la presente investigación se buscó evaluar la actividad antimicrobiana de tres especies de microalgas (*Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*), usando distintos tipos de extractos (intracelular, extracelular, y extracto crudo), contra un patógeno causal de la estreptococosis en tilapia (*Streptococcus* sp.). El potencial antimicrobiano de los extractos de microalga frente a *Streptococcus* sp. se evaluó mediante el método de Kirby Bauer, resultando el extracto intracelular de *P. pectinatus* como la microalga con mayor capacidad inhibitoria con un halo promedio de $31,71 \pm 2,81$. De igual manera, el extracto intracelular de *P. pectinatus* presentó los mejores resultados en cuanto a CMI (6.25-12.5 %) y CMB (12.5 %), que las demás especies de microalgas. El extracto intracelular de las tres especies de microalgas fue el que manifestó los mejores resultados durante los ensayos. Con dicha investigación se determinó que las microalgas poseen propiedades antimicrobianas, las cuales pueden ser aplicadas como un potencial tratamiento alternativo en el control de la estreptococosis en cultivos de tilapia.

Palabras

Microalga, Tilapia, Estreptococosis, Antimicrobiano, Bioactividad.

ABSTRACT

Tilapia culture in Ecuador has positioned itself as the second most exported aquaculture product, earning \$ 3 million dollars; however, there are diseases of bacterial origin that represent a risk in its production worldwide streptococcosis being one of the most important. Several antibiotics have been used to control *Streptococcus* spp. infection, but none have proven to be effective; therefore, new alternatives are proposed, one of them is the use of microalgae extracts, which have antimicrobial properties that can be applied as a treatment against these pathogens. In the present investigation, we sought to evaluate the antimicrobial activity of three species of microalgae (*Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, and *Ettlia pseudoalveolaris*), using distinct types of extracts (intracellular, extracellular, and crude extract), against a causal pathogen of streptococcosis in tilapia (*Streptococcus* sp.). The antimicrobial potential of microalgae extracts against *Streptococcus* sp. was developed using the Kirby Bauer method, resulting in the intracellular extract of *P. pectinatus* as the microalgae with the highest inhibitory capacity with an average halo of $31,71 \pm 2.81$. Similarly, the intracellular extract of *P. pectinatus* presented the best results in terms of MIC (6.25-12.5%) and CMB (12.5%), than the other species of microalgae. The intracellular extract of the three species of microalgae was the one that showed the best results during the tests. With this research, it was determined that microalgae have antimicrobial properties, which can be applied as a potential alternative treatment in the control of streptococcosis in tilapia cultures.

Keywords

Microalgae, Tilapia, Streptococcosis, Antimicrobial, Bioactivity.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Se presume que la inserción de la tilapia al Ecuador inició con *Oreochromis mossambicus* (1965), *Oreochromis niloticus* (1974), y posteriormente el híbrido rojo (*Oreochromis* sp.) a principios de los 80 (Abad, 2019; Zambrano et al., 2006). El cultivo y producción de tilapia comenzó en la provincia del Guayas, como una alternativa al cultivo de camarón, el cual, al ser afectado por el síndrome de Taura, dejó una disponibilidad de 14 000 hectáreas, para la introducción y posterior policultivo Tilapia-Camarón en 1995; actualmente existen cerca de 2 000 hectáreas dedicadas al cultivo de tilapia en esta provincia (Alvarado et al., 2016; FAO, 2010).

En Ecuador el cultivo de tilapia se posiciona como el segundo a nivel nacional del sector acuícola, después del camarón, considerando producción y exportación, (FAO, 2010). Representa una de las actividades con mayor crecimiento del mercado en los últimos años, gracias a su rápido desarrollo, adaptabilidad a condiciones de cautiverio, una carne de buena calidad y precio asequible, pasando de exportar 21 731 libras en 1993, a 1 835 184 libras en 2018 (Abad, 2019).

La variedad de tilapia que el país exporta es un tetrahíbrido resultante del cruce entre las especies del género *Oreochromis*: *O. mossambicus* (Mozambica), *O. niloticus* (Nilótico), *O. hornorum* y *O. aureus* (Aurea); siendo Estados Unidos el principal mercado con el 91% de estas exportaciones (FAO, 2010), además es considerado uno de los principales países productores de tilapia a nivel mundial (Abad, 2019). Sin embargo, esta industria ha presentado desafíos globales en los últimos años, pues la frecuente ocurrencia de ciertos patógenos como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., y *Streptococcus* spp. (Cao et al., 2022; FAO, 2011), han llegado a frenar el desarrollo de este sector, no solo en cultivos de tilapia, sino en otras especies, como el salmón, la trucha, o la lubina (Kayansamruaj et al., 2014).

En América central y del sur, las enfermedades bacterianas más importantes reportadas en tilapias son: el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), causado por *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. y otras especies de aeromonádidos móviles; la

estreptococosis, causada por *Streptococcus* sp.; y *columnaris*, causada por *Flexibacter columnaris* o *Flexibacter maritimus* (Conroy, 2010).

La estreptococosis es uno de los problemas sanitarios más importantes en la acuicultura mundial, debido a su amplia distribución geográfica, la diversidad de especies afectadas, cuantiosas pérdidas por mortalidad, costos de tratamiento, disminución en el crecimiento y dificultad en la comercialización (Rey et al., 2007). *S. iniae*, *S. agalactiae*, *S. dysagalactiae* y *Lactococcus garviae* son las especies causales más relevantes en *Oreochromis* spp. (Anshary et al., 2014). Los síntomas suelen ser variados: letargo, natación errática (natación en espiral o giratoria), oscurecimiento de la piel, anorexia, exoftalmia con opacidad y hemorragia ocular, distensión abdominal, hemorragia difusa en el opérculo, alrededor de la boca, del ano y en la base de las aletas (Y. W. Li et al., 2013; Pumchan et al., 2020).

Según lo indican Bromage et al., (1999); Michel et al., (1997); Yanong & Francisfloyd, (2013) y Yuasa et al., (1999), existen dos formas de manifestación de la estreptococosis en tilapias: casos agudos con presentación sistémica, con súbita y alta mortalidad, y formas crónicas, donde la mortalidad se extiende por varias semanas. Osman et al. (2017), explica que, en los casos más agudos, los peces contagiados inducen tasas de mortalidad > 50% dentro de 3 a 7 días. Por otro lado en infecciones crónicas, la mortalidad podría extenderse a varias semanas, con una muerte diaria de uno o dos peces (Li et al., 2013).

Se han desarrollado formas de diagnóstico para identificar estreptococosis en tilapias, donde las más importantes para determinar el patógeno causal de la enfermedad, son realizadas en laboratorio mediante técnicas microbiológicas y moleculares (He et al., 2020; Legario et al., 2020); no obstante a pesar de los esfuerzos, tanto en identificación del patógeno, como en el desarrollo de un tratamiento, se ha presentado una eficacia limitada a la hora de actuar en el control de dicha enfermedad (Intervet, 2006).

De acuerdo con Álvarez et al., (2004) y Zilberg et al., (2010), el uso de antibióticos, es una de las herramientas más empleadas a la hora de tratar y controlar la estreptococosis en tilapias. No obstante, Elala et al., (2020), menciona que, el uso excesivo e inapropiado de antibióticos para tratar infecciones por estreptococos en

peces, ha generado el desarrollo de patógenos acuícolas resistentes a dichos compuestos.

García et al., (2009) y Carvalho et al., (2014), argumentan que, la búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas a partir de plantas, ha presenciado un enorme crecimiento en el ámbito de desarrollo e investigación contra patógenos de importancia clínica como; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Pascoal et al., 2020), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, e incluso hongos como *Candida albicans*, y *Aspergillus fumigatus* (Bocanegra-García et al., 2009; Panghal et al., 2011).

Un nuevo avance en la búsqueda de estos compuestos bioactivos, contempla el uso de recursos marinos, tales como, macro y microalgas, cianobacterias, e invertebrados (Hayes, 2012); de los cuales según Falkenberg et al., (2019) y Maadane et al., (2017), han reportado que las microalgas poseen una bioactividad interesante frente a patógenos como *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *klebsiella*, y *Staphylococcus*. Investigaciones para evaluar el potencial antibacterial de distintos extractos de microalgas de agua dulce y salada, frente a bacterias patógenas, se han llevado a cabo (Cannell et al., 1988; Katircioglu et al., 2006; Srinivasakumar y Rajashekhar, 2009; Viso et al., 1987); y demuestran una potente actividad bacteriostática contra bacterias Gram (+) y Gram (-) (Falaise et al., 2016).

Luna (2015), indica que estos organismos fotosintéticos son prometedoramente óptimos para la producción de sustancias de interés químico, farmacéutico e industrial. Se reporta que, especies como *Chlorella vulgaris* y *Porphyridium cruentum* poseen características idóneas con amplias aplicaciones en campos de interés farmacéutico, químico, o industrial; siendo el género *Chlorella*, el que ha presentado un mayor espectro bioactivo, ya sea como antimicrobiano, antimicótico o antiviral., (Amaro et al., 2011; Kellam & Walker, 1989; Sanmukh, 2014).

Existen reportes de estudios en el Ecuador, sobre diversidad de microalgas, y su potencial antimicrobiano desarrollados en Carchi, Guayas, Pichincha y Santa Elena (Morales et al., 2017; Suasnavas et al., 2017); donde se han evaluado los extractos de microalgas (*Chlorella* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp.), frente a patógenos como *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*, encontrando que sus extractos metanólicos poseen una actividad inhibitoria frente a estos patógenos; se

reportó adicionalmente su composición fitoquímica, describiendo presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, fenoles, taninos, saponinas, y carbohidratos (Barona, 2014; Suasnavas et al., 2017). Dichos compuestos, junto con otros, son los responsables de la propiedad antimicrobiana en las microalgas (Cardozo et al., 2007; Mayer y Hamann, 2005).

Es por eso que, en investigaciones con microalgas se obtienen resultados favorables en bioactividad, gracias a su amplio espectro de compuestos orgánicos complejos; por lo que, especies de microalgas como, *Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*, resultan interesantes de ser evaluadas contra bacterias patógenas de importancia humana, vegetal o animal; recopilando resultados positivos y datos relevantes para posteriores investigaciones.

1.2 Planteamiento del problema

En Ecuador, el sector acuícola representa rubros importantes de exportación no petroleros, comprendiendo unos \$ 3 millones de dólares en el caso de la tilapia, con una producción de alrededor de 1 millón de libras en el año 2020, según la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA, 2020). De acuerdo con la FAO (2005), Ecuador es uno de los principales países productores de *O. niloticus*, aunque existen inconvenientes en la producción, debido a patologías que han llegado a causar la mortalidad de estos peces.

La principal amenaza para el desarrollo en la producción de tilapia son las enfermedades infecciosas, especialmente la estreptococosis, la cual llega a presentar tasas de mortalidad del 30 % hasta el 90 % (Cao et al., 2022; FAO, 2005b). Se han descubierto que distintos géneros y especies de cocos y cocobacilos Gram positivos pueden estar implicados en la etiología de la "Estreptococosis", pero se reporta que *Streptococcus agalactiae* y *S. iniae*, son las especies patógenas dominantes de la estreptococosis alrededor del mundo (Abu-Elala et al., 2020). Estos patógenos se pueden diseminar fácilmente entre peces infectados en contacto con otros no infectados, llegando a causar que las bacterias alcancen la circulación sanguínea y los órganos internos como cerebro, hígado, y riñón (Thai Agricultural Standard, 2010).

Varias alternativas en el tratamiento a la estreptococosis en cultivos de tilapia han sido empleadas, como por ejemplo; dietas alimenticias con el uso *Rosmarinus officinalis* (romero) (Zilberg et al., 2010); vacuna polivalente inyectable, en reproductores y crías de tilapia del Nilo (Abu-Elala et al., 2019); y antibióticos (Álvarez et al., 2004). Es importante notar que, Ecuador al ser un país relevante en la producción

de tilapia, carece de investigaciones sobre la presencia de estreptococosis en cultivos de tilapia; a pesar de que la estreptococosis también se ha reportado en los países fronterizos de Colombia y Perú, en los que se han aislado los microorganismos causantes, identificando *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus* spp. respectivamente (Jiménez et al., 2007; Ortega Ascencios et al., 2016; Yessica Ortega et al., 2017).

Por otra parte, aunque existen varias investigaciones con microalgas en el Ecuador, exponiendo su versatilidad para la obtención de productos como; producción de aceite (Koch, Kaiser, Portilla Gil, 2010); obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de la microalga *Spirulina platensis* (Albujá et al., 2011); y la obtención de compuestos con actividad antibacteriana a partir de las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* (Marcela Álvarez, 2007), no existen investigaciones enfocadas en la aplicación de estas sobre patógenos causantes de enfermedades acuícolas en el país.

Adicionalmente, aunque existen reportes de Barona, (2014) y Suasnavas et al., (2017), en donde las microalgas mostraron tener un potencial bioactivo contra patógenos de importancia clínica en humanos, además de poseer un gran espectro de síntesis de compuestos antimicrobianos, no existen investigaciones en las cuales se proponga el uso de estos microorganismos fotosintéticos como un posible tratamiento sobre estreptococosis en cultivos de tilapia; esto permite que se plantee un tema de investigación que permita aprovechar los recursos naturales del país, para solventar una problemática en un campo industrial importante.

1.3 Justificación

Dentro de la gran biodiversidad que caracteriza al Ecuador, se encuentra la diversidad de especies de microalgas (Morales et al., 2017). Estas se han reportado por Singh, Kate, y Banerjee (2005), como organismos útiles por sus diversas aplicaciones en sectores como el alimenticio, industrial, y farmacéutico. Sin embargo, a pesar de encontrarnos en un país con diversos ecosistemas y condiciones que favorecen el desarrollo de microalgas en casi cualquier lugar, se desconocen las propiedades y beneficios que estas pueden llegar a brindar (antivirales, antimicrobianas, antimicóticas).

Según Zilberg et al., (2010), la búsqueda de compuestos naturales, libres de sustancias químicas sintéticas, para el desarrollo de tratamientos antibióticos, se ha convertido en algo esencial a la hora de tratar infecciones en peces. Por lo tanto, las propiedades de las microalgas pueden ser aprovechadas en varios campos de

importancia económica en el país. Esta investigación pretende enfocar a las microalgas como un potencial recurso antimicrobiano, que puede ser desarrollado como un tratamiento frente a un problema patológico que afecta a uno de los sectores con mayor crecimiento en el mercado de exportación a nivel mundial, como lo es la producción de tilapia, y donde se han reportado pérdidas económicas significativas, debido a infecciones por estreptococosis.

La investigación se centra en el aprovechamiento de microalgas nativas como un recurso propio del país, su factibilidad radica en que las microalgas pueden llegar a ser tomadas de varios lugares de nuestro territorio y aisladas en un laboratorio, pudiendo así determinar los componentes fitoquímicos de cada microalga, e identificar el metabolito antimicrobiano responsable de controlar el desarrollo de algún patógeno de interés. En el caso de este estudio, el patógeno de interés es *Streptococcus* sp. el cual afecta los cultivos de tilapia a nivel mundial, y representa daños importantes a nivel económico y productivo en este sector.

Los resultados obtenidos serán de relevancia científica, ya que no existen antecedentes donde se evalúe el potencial bioactivo de las microalgas sobre los patógenos causales de la estreptococosis en tilapia; así como también representara un aporte a la investigación en el área de Biotecnología Marina, área que aún no se ha aprovechado de manera significativa en el país, y que puede llegar a ser explotada de manera productiva debido a su ubicación geográfica.

1.4 Pregunta directriz

¿Los extractos de microalgas poseen potencial antimicrobiano frente a *Streptococcus* sp.?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar el potencial antimicrobiano de extractos de microalgas sobre *Streptococcus* sp. en tilapia.

1.5.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de las microalgas cultivadas en laboratorio.
- Aislar *Streptococcus* sp., de tejidos afectados en tilapia.

- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de microalga sobre *Streptococcus* sp. en tilapia.

1.6 Hipótesis

Los extractos de microalgas poseen una actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus* sp., microorganismo patógeno causante de la estreptococosis en tilapia.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tilapia

Las tilapias pertenecen a la familia *Cichlidae* y comprende tres géneros: *Tilapia*, *Oreochromis*, y *Sarotherodon*, con más de 100 especies conocidas (Canonico y Arthington, 2005; Trewavas y History, 1983; Wicki, Gustavo A., 2018); Según León (2009), las tilapias son peces endémicos originarios de África y el cercano Oriente, los cuales a principios del siglo XX ya eran un factor importante en la alimentación humana y el pez más producido en el mundo. El término “Tilapia” está basado en el vocablo Africano del idioma “Shwahili”(población indígena de la costa del lago Ngami), derivado de la palabra “Tilapi”, el cual significa “Pez”(Castillo, 2001).

La tilapia es una especie tropical que prefiere vivir en aguas poco profundas, las temperaturas letales superior e inferior son de 42 °C y 12 °C, respectivamente, mientras que la temperatura preferida oscila entre 28 °C y 32 °C, adicionalmente esta se desarrolla en un rango de pH de 6 a 9 (FAO, 2005a; Phuoc et al., 2021). En cuanto a su alimentación, este pez es un omnívoro-vegetariano, que se alimenta de fitoplancton, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, fauna bentónica, detritus y películas bacterianas asociadas con detritus (Little y Hulata, 2000).

2.2 Anatomía del pez

El conocimiento de la anatomía del pez es importante, pues esta proporciona las condiciones básicas para un diagnóstico presuntivo del tipo de enfermedad, basándose en la identificación de órganos diana afectados, en la Figura 1 (a) y (b) se describe la anatomía de un pez (FAO, 2011).

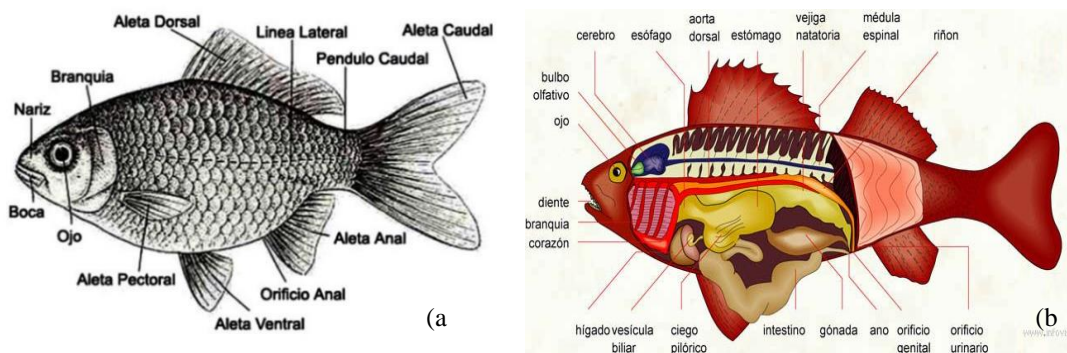


Figura 1. (a) Anatomía externa de un pez, (b) Anatomía interna de un pez (FAO, 2011).

2.3 Enfermedades comunes presentes tilapia

En las granjas piscícolas, las enfermedades se presentan por la interacción de variables ambientales o de manejo, presencia de agentes patógenos y condiciones sub-óptimas tanto nutricionales como inmunológicas de los organismos en cultivo (FAO, 2011). Este factor de estrés provoca una baja en el sistema inmunológico del animal, haciéndolo susceptible a distintas enfermedades como el síndrome de septicemia hemorrágica bacteriana, micobacteriosis, pseudomoniasis y estreptococosis; a continuación se describen anomalías que se suelen presentarse en peces enfermos (Tabla 1) (Abdel-Latif et al., 2020; FAO, 2005b)

Tabla 1.

Diferencias en el comportamiento y la apariencia física externa de un pez sano y de un enfermo.

Aspecto que considerar	Pez sano	Pez enfermo
Natación	Normal (característico de cada especie)	Irregular, errático, puede estar dando giros, con hundimiento de costado en la superficie
Consumo de alimento	Voracidad característica de la especie. Sea en superficie o en fondo, con actividad estimulada en los horarios de rutina de alimentación	No consume alimento o queda volumen importante de alimento no consumidos
Reacción de fuga	Responde a los ruidos y estímulos	No responde a los ruidos al acercarnos al estanque
Coloración	Pigmentación definida de acuerdo con la especie	Colores claros en caso de anemias, falta de oxígeno y oscurecimiento en algunas enfermedades infecciosas. Petequias (puntos hemáticos)
Piel	Suave, sin descamación ni hematomas, con secreción de mucus	Descamaciones evidentes; úlceras o hematomas con hipersecreción mucus
Ojos	Brillantes con cornea transparente	Opacos
Branquias	Con una coloración rojo brillante y con lamelas completas	Coloración anormal (Rosa Pálidas, Cianótica, Hemorrágicas, etc.), con lamelas discontinuas (“deshilachadas”) con lesiones, o con presencia evidente de parásitos

2.3.1 Síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (SHB)

Las tilapias afectadas por el síndrome muestran signos de exoftalmia, anorexia, úlceras en las aletas pectorales y ventrales, a nivel interno se observa palidez hepática, necrosis del hígado, corazón, y bazo; la SHB puede manifestarse y producir pérdidas del 5% al 100% en tilapias cultivadas en aguas dulces y salobres (Conroy, 2010).

Diversas especies de bacterias Gram negativas se han aislado en varios de los países latinoamericanos en los cuales se cultivan tilapias y sus híbridos, entre estos encontramos: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. y otras especies de aeromonádidos móviles (Conroy, 2010). Además la septicemia hemorrágica por aeromonas motiles es una entidad que puede ser inducida por varias especies de este género bacteriano, entre ellas *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* (Pulido, 2004).

Estos microorganismos Gram negativos habitan el medio acuático y hacen parte de la microflora gastrointestinal normal de muchos peces de agua dulce, e incluso llegan también a afectar al ser humano (Pulido, 2004). El uso de antibióticos es el tratamiento más común en este tipo de infección; es necesario establecer la dosis a ser aplicada, calculando la concentración mínima inhibitoria (C.M.I en $\mu\text{g/ml}$ = ppm) (Conroy, 2010).

2.3.2 Micobacteriosis

La micobacteriosis es una infección crónica y progresiva, causada por ingesta de detritos, alimentos o tejidos contaminados y lesiones a través de la piel o del tejido (Lara-Flores et al., 2014). Hasta el momento esta infección ha sido detectada en tilapias cultivadas en dos países de la Región de América Central y en Cuba, específicamente en *O. aureus*, basándose en el diagnóstico histopatológico de los peces afectados (Conroy, 2010).

Los agentes etiológicos más reportados de la micobacteriosis son *Mycobacterium chelonae*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. avium*, y *M. haemophilum*, los cuales en los peces afectados muestran pequeños granulomas focales en el hígado, bazo y riñón, lo que llega a dar lugar a importantes pérdidas en tilapias (Conroy, 2010; Lara-Flores et al., 2014). Es importante señalar que, estos agentes etiológicos encontrados en

numerosas especies ícticas dulceacuícolas y marinas, han sido relacionados con infecciones en el ser humano (Eslava Mocha, Malagón Rozo, 2004).

2.3.3 Pseudomoniasis

El responsable de la enfermedad son las bacterias Gram negativas *Pseudomonas sp.*, estas son bacterias oportunistas, se encuentra en forma natural en todos los ambientes (acuáticos, terrestres y en la atmósfera), así como formando parte de la flora del intestino de los peces saludables, hasta que las condiciones ambientales se alteran y propician la enfermedad (FAO, 2011). La pseudomoniasis se manifiesta con un curso agudo o crónico, con lesiones hemorrágicas sobre la piel y tejidos internos, siendo esto último lo más frecuente, además se presenta oscurecimiento de la piel, descamación, ascitis abdominal y exoftalmia (Eissa et al., 2010).

P. fluorescens, *P. anguilliseptica*, *P. aeruginosa*, y *P. putida*, han sido las especies encontradas como agentes causales de la pseudomoniasis (Eissa et al., 2010). Para tratar estos patógenos existen alimentos medicados con antibióticos de amplio espectro como la terramicina o la oxitetraciclina, o el uso de antibióticos en solución al agua como la Aureomicina; sin embargo, nuevamente es importante considerar que es mejor prevenir que curar (FAO, 2011).

2.3.4 Estreptococosis en tilapia

Se ha descubierto que distintos géneros y especies de cocos y cocobacilos Gram positivos pueden estar implicados en la infección, gracias a que estos poseen genes de virulencia con diversidades genéticas entre especies (Legario et al., 2020); encontrando a *S. iniae* y *S. agalactiae*, como las especies más insidiosas en estos cultivos (Palang et al., 2020; Sukhavachana et al., 2020).

La estreptococosis suele producir granulomas comprometiendo al bazo, cerebro, hígado y riñón, además presentan movimientos natatorios desorientados y erráticos, dado que se produce una meningoencefalitis, exoftalmia uni o bilateral con o sin opacidad de la córnea, por otra parte, las tilapias enfermas muestran en general signos clínicos semejantes a la SHB (Conroy, 2010; Osman et al., 2017; Ye et al., 2011).

Gracias a los modernos métodos de clasificación bacteriana, basados en el estudio genómico (secuencia del 16SrRNA e hibridación DNA-DNA) mediante PCR y

QPCR, parte del mosaico taxonómico ha sido recientemente resuelto en la tilapia, donde se encuentra que esta patología se debe principalmente a *S. agalactiae* y secundariamente a *S. iniae* (Ghittino, 1958; He et al., 2020; Legario et al., 2020).

Streptococcus agalactiae, ha sido reconocido durante mucho tiempo como un patógeno de mamíferos, sin embargo es una preocupación emergente en los peces, pues se han presentado infecciones en especies como: besugo *Sparus auratus*, besugo *Sparus sarba*, trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, bagre *Ictalurus punctatus*, lubina rayada híbrida *Morone chrysops*, y tilapia *Oreochromis spp.*(Evans et al., 2009; Garcia et al., 2008; Olivares-Fuster et al., 2008).

Algunas cepas de *Streptococcus agalactiae* que infectan peces muestran resistencia a gentamicina, kanamicina, trimetoprima, nitrofurantoína, ampicilina, espiramicina, oleandomicina, sulfametoxazol, ácido oxolínico, penicilina, eritromicina y oxitetraciclina (Faria et al., 2014; Soto et al., 2015).

2.4 *Streptococcus agalactiae*

El género *Streptococcus*, son bacterias Gram-positivas, que forman agrupaciones de cocos dispuestas en cadena, pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas, patógenos responsables de causar enfermedades en humanos y animales (Chu et al., 2016; Ryan, 2003). Este tipo de patógenos requieren de un medio enriquecido con agar sangre o suero para su aislamiento, también son capaces de fermentar carbohidratos, produciendo ácido láctico y siendo además catalasa negativos (Patrick Murray, Ken Rosenthal, 2005).

Streptococcus agalactiae pertenece al grupo B de estreptococos (GBS); este patógeno ha sido identificado tanto en animales, como en el ser humano (Chu et al., 2016); pues según el estudio realizado por Delannoy et al., (2013), la aparente asociación entre los serotipos identificados de *S. agalactiae*, en grupos específicos de especies hospedadoras, sugiere que las cepas de *S. agalactiae* acuáticas pueden presentar un peligro zoonótico o antroponótico, lo cual sugiere un marco racional para la exploración de la patogénesis y el contenido del genoma asociado al huésped de las cepas de *S. agalactiae*.

En conclusión, como se ha mencionado anteriormente, *S. agalactiae* es una enfermedad invasiva, la cual no se limita solo a infecciones en humanos, pues se han reportado en especies de mamíferos terrestres como perros, gatos, vacas, inclusive

mamíferos acuáticos o semiacuáticos (Brochet et al., 2006; Sorensen et al., 2010); además de cocodrilos, ranas y peces (Delannoy et al., 2013).

2.4.1 Técnicas moleculares usadas para el estudio epidemiológico de *S. agalactiae*

Numerosos métodos moleculares han sido usados, incluyendo métodos comparativos, como campos pulsados en gel de electroforesis (PFGE), el cual es adecuado para llevar a cabo investigaciones de brotes epidemiológicos (Bishop et al., 2007; Wang et al., 2010). Para los análisis de población genética, son preferibles los métodos de tipificación portátiles y altamente estandarizados, tipificación de secuencia multilocus (MLST), que se dirige al genoma central, o genotipado de 3 conjuntos del contenido del genoma de *S. agalactiae* (Van Belkum et al., 2007).

MLST es una herramienta importante para la epidemiología molecular porque las bases de datos MLST para especies de patógenos individuales actualmente cubren muchos más aislados de los que se han caracterizado en base a la secuenciación del genoma completo (Brochet et al., 2006). Esta herramienta ha permitido el estudio de los ST`s, determinando sus asociaciones, y discrepancias de acuerdo a los distintos serotipos presentes en *S. agalactiae* (Delannoy et al., 2013; Wang et al., 2010).

2.5 Coinfecciones en Tilapia

Las coinfecciones suelen surgir cuando dos o varios patógenos diferentes llegan a infectar al mismo huésped, ya sea como infección simultánea o de manera concurrente, lo cual causa un incremento en los efectos de los patógenos implicados, y conduce a graves consecuencias negativas en el huésped expuesto (Abdel-Latif et al., 2020).

Numerosos estudios sobre la aparición de coinfecciones bacterianas, parasitarias, fúngicas y virales en varias especies de tilapia, se han llevado a cabo, demostrando así que las coinfecciones se han asociado con graves impactos negativos en los peces susceptibles porque aumentan las enfermedades y la probabilidad de brotes en los peces afectados (Abdel-Latif et al., 2020); además las coinfecciones pueden alterar el curso de la enfermedad y aumentar la gravedad de la misma, a través de interacciones sinérgicas y, más raramente, antagonistas (Bradley y Jackson, 2008).

2.5.1 Coinfección bacteriana

El cultivo de tilapia es susceptible a varias enfermedades bacterianas, como la franciselosis, causada por *Francisella noatunensis subsp. orientalis* (Fno); estreptococosis, causada por *S. agalactiae*, *S. iniae*, y *S. dysagalactiae*; edwardsielosis, causada por *Edwardsiella tarda* y *E. ictaluri* y septicemia hemorrágica bacteriana, causada por varias aeromonas, incluidos *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. hydrophila subsp. Dhakensis*, y *A. veronii* (Abdel-Latif et al., 2020).

En un estudio donde se evaluó la presencia de Fno en *O. niloticus*, criada en granjas acuícolas, reveló un caso de coinfecciones con un pez infectado con *S. agalactiae* y Fno, posteriormente al siguiente año se notificó otro brote infeccioso en *O. niloticus*, y se atribuyó a coinfecciones entre *S. agalactiae* y Fno (Assis et al., 2017).

Se han inducido con éxito coinfecciones en condiciones de laboratorio, y se ha concluido que la coinfección provoca una tasa de mortalidad más temprana y significativamente mayor en comparación con los peces desafiados con cultivos puros de una sola bacteria (Abdel-Latif et al., 2020).

2.6 Microalgas

Microorganismos autótrofos, consideradas como fitoplancton, representan el primer eslabón en la cadena alimenticia; por otro lado, su organización celular puede variar entre unicelular, colonial, y filamentosa, no obstante, a pesar de que muchas de las especies se desarrollan de forma aislada, algunas crecen de manera simbiótica en asociación con otros microorganismos (Luna, 2015; Richmond, 2005).

Las microalgas poseen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, siendo capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Luna, 2015); y siendo así consideradas como los mayores organismos productores de oxígeno, puesto que su mayor área de desarrollo son los océanos, los cuales cubren el 71% de la superficie terrestre, aportando así entre el 40% y 50% de oxígeno a la atmósfera (Andersen, 2005).

Las microalgas poseen un alto potencial en diversos campos, pues son capaces de convertir sustancias inorgánicas en compuestos orgánicos naturales que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales (Gouveia et al., 2010). Muchos de estos compuestos son células enteras de microalgas (biomasa microalgal) o sus bioproductos metabólicos generados durante su ciclo celular, y que se han utilizado como

suplementos alimenticios o alimentos directos mostrando en ciertos casos resultados relevantes (Zepka et al., 2010).

Estos microorganismos fotosintéticos poseen proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas, por lo que representan un potencial en la investigación, en áreas farmacéuticas o nutraceuticas, debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antialérgicas, antioxidantes, hipoglicemiantes, inmunosupresoras, entre otras (De Jesus Raposo et al., 2013).

2.7 Compuestos bioactivos de las microalgas

Varios compuestos metabólicos de microalgas, así como su biomasa tienen un efecto beneficioso, estos pueden clasificarse según su composición bioquímica con actividad biológica, tales como: ácidos grasos, proteínas, péptidos, aminoácidos, esteroides, pigmentos, vitaminas, alcaloides, entre otros compuestos (Kim y Kang, 2011).

La composición y el contenido de los lípidos en microalgas varía entre especies y condiciones de hábitat, los lípidos principales en microalgas de carácter polar (mono y digalactosil diacilglicerol y fosfatidilglicerol) han descrito que poseen actividad antiinflamatoria y antitrombótica, no obstante, los compuestos lipídicos más estudiados en las microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Antonopoulou et al., 2005).

En relación a los pigmentos, las cianobacterias particularmente sintetizan altos niveles de ficobiliproteínas, con porcentajes que alcanzan hasta 8% de su peso seco, estos pigmentos se han utilizado como marcadores de fluorescencia no radiactivos cuando se une covalentemente a los anticuerpos, proteína A, biotina, lecitina y hormonas, además de esta aplicación, las ficobiliproteínas tienen importante actividad antioxidante y antiinflamatoria (Perez-Garcia et al., 2011).

Los carotenoides son otra clase importante de pigmentos encontrados de forma abundante en microalgas, por la actividad provitamina A de β -caroteno y su efecto sobre la visión y el sistema inmunológico, o bien por su actividad antioxidante, asociada con la prevención del cáncer, la arteriosclerosis, el envejecimiento y las enfermedades degenerativas (Rodrigues et al., 2015).

2.8 Bioactividad antimicrobiana de microalgas

La actividad antimicrobiana de las microalgas han sido atribuidas a compuestos que pertenecen a varias clases químicas, tales como: indoles, terpenos, acetogeninas, fenoles, ácidos grasos e hidrocarburos halogenados volátiles (Mayer y Hamann, 2005).

Los extractos sin células de microalgas ya se están probando como aditivos para la formulación de alimentos y piensos, en un intento de reemplazar los compuestos antimicrobianos de origen sintético actualmente en uso, incluidas las dosis sub terapéuticas de antibióticos empleados como medida profiláctica en la cría de animales (Tramper et al., 2003).

Pratt et al., (1944), aisló el primer compuesto antibacteriano de una microalga, *Chlorella*; la cual estaba basada en una mezcla de ácidos grasos, y se encontró que la clorelina es responsable de esa actividad inhibidora contra bacterias Gram (+) y Gram (-); desde entonces, la investigación destinada a identificar principios activos antibacterianos producidos por microalgas ha experimentado un auge (Ghasemi et al., 2004).

La búsqueda de compuestos antibióticos naturales surgió por el riesgo y preocupación asociado con el desarrollo de varias cepas multirresistentes en todo el mundo; y, aunque las microalgas pueden sintetizar algunos productos útiles, la búsqueda de nuevos antibióticos aún es basta y demanda de la investigación; algunos compuestos con actividad antibacteriana se describen en la Tabla 2 (Amaro et al., 2011).

Tabla 2.

Características antimicrobianas de algunos compuestos de microalgas.

Microalga	Compuesto activo	Microorganismo objetivo	Referencia
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ácido eicosapentaenoico	<i>Listonella anguillarum</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Vibrio</i> spp.	(Desbois et al., 2009; Smith et al., 2010)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácidos grasos de cadena corta (ácido butanóico y metil lactato)	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(Santoyo et al., 2009)
<i>Skeletonema costatum</i>	Ácidos grasos insaturados, saturados de cadena larga	<i>Vibrio</i> spp.	(Naviner et al., 1999)
<i>Euglena viridis</i>	Extractos orgánicos	<i>Pseudomonas</i> <i>Aeromonas</i> <i>Vibrio</i>	(Das et al., 2005)

2.9 Cultivo de microalgas

Cultivar microalgas esta básicamente orientado en dos propósitos, remoción de contaminantes, y la obtención de biomasa para fines específicos, ambos dependen del sistema de cultivo, la o las especies cultivadas y los factores ambientales, además, la elección del tipo de sistema de cultivo es importante, y debe realizarse en base a factores biológicos, técnicos, ambientales y económicos, definidos previamente (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

La cosecha de la biomasa algal es el procedimiento más complejo y costoso en el cultivo de microalgas, existiendo varias técnicas diferentes tanto en eficiencia como en complejidad (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Sin embargo los procesos industriales más comunes son sedimentación, filtración y flotación (Borowitzka y Moheimani, 2013).

Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros (nutrientes, luz) que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo, además estos cambian según la especie cultivada (Park et al., 2011; Richmond, 2003). Así mismo, los cultivos presentan una gran variedad de diseños, encontrando principalmente 2 grandes grupos: sistemas abiertos y cerrados; cada uno con una variedad importante de diseños diferentes (Borowitzka, 1999; Contreras-Flores et al., 2003)

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (biocombustible, pigmentos, alimento, etc.); las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros biológicos (Park et al., 2011), y en un sistema cerrado se pueden lograr cultivos monoespecíficos aislados del medioambiente (Posten, 2009).

Las microalgas en un cultivo para fitorremediación deben cumplir con 3 condiciones: alta tasa de crecimiento; alta tolerancia a la variación estacional y diurna, si es un sistema abierto; y buena capacidad para formar agregados para una cosecha por simple gravedad (Park et al., 2011).

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo, en ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el

aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz, pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+), este también es un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas (Park et al., 2011). Las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20 %, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40 % ; sin embargo, esta reduce la producción algal, lo que sugiere que un alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Park et al., 2011).

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía, aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1 %, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento; en los medios de cultivo suele incorporarse en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

2.10 Cinética de crecimiento

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cel.ml^{-1}), en peso seco (total y/o orgánico), cantidad de proteína, cantidad de pigmentos, los cuales son medidos en unidades, como fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

Este incremento puede ser estimado por diferentes métodos, entre los cuales los más utilizados en los laboratorios son el recuento celular a través del microscopio o mediante contadores de partículas (generalmente costosos), la determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría, o finalmente la cuantificación de la biomasa en peso seco, total u orgánico, o de sus componentes bioquímicos que son de interés para los fines de un cultivo en particular (proteínas, pigmentos o ácidos grasos, entre otros) (Arredondo Vega y Voltolina, 2007);

Estos cálculos cinéticos posibilitan que los sistemas de cultivo sean optimizados, e incluso automatizados con el fin de lograr objetivos específicos en tales cultivos (Alvarez et al., 2016). La determinación de la cinética permite, mejoramiento en producción y así obtener altas concentraciones celulares, o el efecto de la variación de algún nutriente en la división celular, tales conocimientos sobre microalgas se utilizan principalmente debido a que estas pueden ser analizadas bajo condiciones definidas y reproducibles (Andersen, 2005).

Cualquier estimación de las tasas de crecimiento requiere una serie temporal de mediciones que permitan una estimación de la tasa de cambio de la biomasa, y alternativamente, se puede medir otro parámetro como un verificador del número de células, el cual debe demostrar que está correlacionado linealmente con la variable medida (peso seco, material orgánico particulado, o densidad óptica) (Andersen, 2005).

2.11 Recuento celular

Para realizar el recuento celular existen diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra entre una lámina y una laminilla rígida (cubreobjeto especial) colocada sobre plataformas laterales a una altura establecida; para microalgas se usa con mayor frecuencia el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer (Arredondo Vega y Voltolina, 2007; Mayorga & Manso, 2017).

Para microalgas de mayores dimensiones, como muchos dinoflagelados, los tipos de cámara que se utilizan más comúnmente son: de Sedgwick-Rafter o el hematocitómetro de 0.2 mm de profundidad con reglilla de Fuchs-Rosenthal (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

2.11.1 Cámara de Neubauer

El hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm^2), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de $0.1 \mu\text{L}$, sus cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños, y el cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm^2 ($0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$), los que a su vez están divididos en 16 cuadros más pequeños (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

Para células más grandes de $6 \mu\text{m}$ y con cultivos relativamente poco concentrados, se aconseja que el recuento se haga en los cuatro cuadros marcados como

A, B, C y D, cuando las células son pequeñas y la concentración de los cultivos es muy alta, es preferible utilizar cinco cuadros menores del cuadro central marcado con X (Arredondo Vega y Voltolina, 2007) (Figura 2).

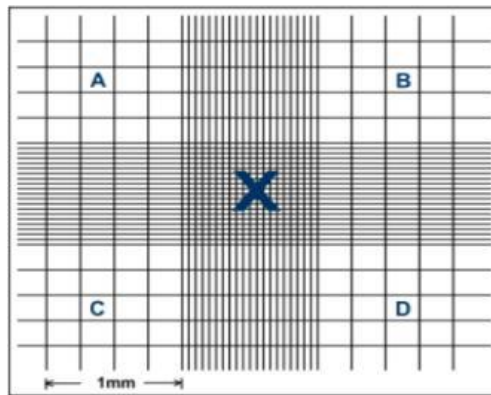


Figura 2. Características antimicrobianas de algunos compuestos de microalgas.

2.12 Densidad óptica

La concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, esta se usa en los laboratorios para reconocer rápidamente las fases de crecimiento de los cultivos, por lo cual permite tomar decisiones inmediatas sobre los tiempos de cosecha o de dilución, generalmente se recomienda una longitud cercana al pico de absorción de la clorofila (675 nm), lo cual permite obtener una lectura aun cuando la concentración celular es baja (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

2.13 Curva de crecimiento

Las microalgas se reproducen principalmente por división celular, presentando un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo óptimo, sin embargo las condiciones cambian con la edad del cultivo, por lo que también varía la velocidad de crecimiento poblacional, y a partir de estos datos es posible reconocer diferentes fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o de biomasa (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

2.13.1 Fases en una curva de crecimiento

La primera fase que se presenta es la de latencia, adaptación o lag (Figura 4a), donde la tasa de crecimiento es insignificante, debido a que la microalga debe adaptarse a los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH, los cuales pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo (Arredondo Vega y Voltolina, 2007; Boaden, 2011)

Luego se inicia una fase aceleración (Figura 3b), donde diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el RNA (ácido ribonucleico), seguido de las proteínas y del peso individual, el aumento en la concentración celular inicia en esta fase (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

A continuación, la fase exponencial (Figura 3c) comienza y es donde la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante, es por esto que la concentración celular aumenta rápidamente, hasta llegar a una desaceleración (Figura 3d), debido a una menor disponibilidad de factores que regulan el crecimiento, presentándose así una baja en la tasa de división celular (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

Posteriormente, la fase estacionaria (Figura 3e), donde las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes, y finalmente se entra a una fase de muerte (Figura 3f), donde la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración celular disminuye (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

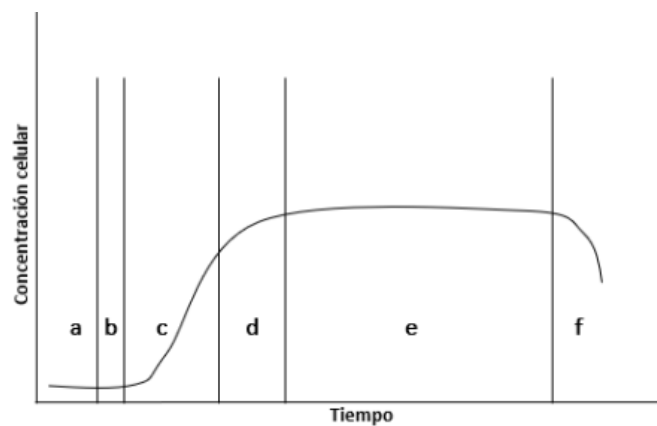


Figura 3. Curva de crecimiento, a) Fase lag, b) Fase aceleración, c) Fase exponencial, d) Fase de desaceleración, e) Fase estacionaria, f) Fase de muerte.

2.13.2 Tasa de crecimiento

Durante el crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento en las células por unidad de tiempo es proporcional al número de células presentes en el cultivo al comienzo de cualquier unidad de tiempo, en otras palabras, el crecimiento de la población sigue la siguiente ecuación (Andersen, 2005):

$$\frac{dn}{dt} = \mu \cdot N \implies N_t = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Ecuación 1

Donde N_0 es el tamaño de la población al inicio de un intervalo de tiempo, N_t es el tamaño de la población al final del intervalo tiempo, y μ es la tasa de crecimiento; las unidades de μ son siempre expresadas por unidad de tiempo (t^{-1}), de donde se obtiene la siguiente ecuación (Andersen, 2005):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{\Delta t} = (\ln N_t - \ln N_0)/\Delta t$$

Ecuación 2

Dónde:

u = tasa de crecimiento específica

N_0 = valor de absorbancia o concentración de células inicial

N_t = valor de absorbancia o concentración de células final

\ln = logaritmo natural

Δt = intervalo de tiempo

Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación para el cultivo, expresado en las mismas unidades de tiempo que μ , se puede calcular a partir de la ecuación descrita por (Andersen, 2005):

$$Tg = \frac{\ln 2}{u} = \frac{0.693}{u}$$

Ecuación 3

Dónde:

Tg = tiempo de generación

$\ln 2$ = constante igual a 0.693

u = tasa de crecimiento específica

Cuando el cultivo no tuvo un crecimiento exponencial durante cierto intervalo de tiempo, o el organismo no conduce a una acumulación exponencial de biomasa o

número de células, entonces el investigador realmente necesita conocer adicionalmente el rendimiento del cultivo, y esto es lo que debe calcularse e informarse (Andersen, 2005).

El rendimiento se determina calculando la diferencia entre el tamaño del inóculo inicial y el stock en pie después de algún intervalo de crecimiento, y este valor se divide por el tiempo transcurrido entre la inoculación y la cosecha (o la medición de la biomasa), obteniéndose así la siguiente ecuación (Andersen, 2005):

$$Y = \frac{N_1 - N_2}{\Delta t}$$

Ecuación 4

Donde N_1 y N_2 son la biomasa o tamaño de la población, al inicio y final respectivamente del periodo medido, y Δt es el tiempo transcurrido entre las mediciones de N_1 y N_2 .

2.14 Antibiogramas

El antibiograma determina la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado, y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana, el procedimiento de disco-placa, basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (Vila, 2012).

En el ensayo, el inóculo se siembra en la superficie de una placa de agar y se aplican discos que contienen cantidades definidas de antimicrobianos, los cuales durante el tiempo de incubación, se difunden en el medio para producir un gradiente circular alrededor del disco (Ryan, 2003). El tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco es medido, y a menudo esta medida puede usarse como una previa de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del órgano; aunque este dato no permite una lectura segura de dicha concentración (Ryan, 2003; Vila, 2012).

Los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas con los distintos antibióticos se convierten en categorías de “susceptible”, “moderadamente susceptible” y “resistente” consultando una tabla en el Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI) (Ryan, 2003; Wayne, 2014). Este método es conveniente y eficaz para bacterias aeróbicas y facultativas de crecimiento rápido, como las enterobacterias, las pseudomonas y los estafilococos (Ryan, 2003).

2.15 Concentración mínima inhibitoria

La eficiencia de un antibiótico se establece determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) que nos indica “la concentración mínima en mg.ml^{-1} o $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento microbiano”, y la cantidad necesaria a administrarse con riesgos aceptables de toxicidad (Ryan, 2003); otro parámetro de evaluación de antimicrobianos es la cantidad mínima bactericida (CMB), que se refiere a la concentración de antibiótico necesario para disminuir del tamaño original del inóculo bacteriano en un porcentaje mayor o igual al 99.9 % (CLSI, 2018; Fernandez, 2012).

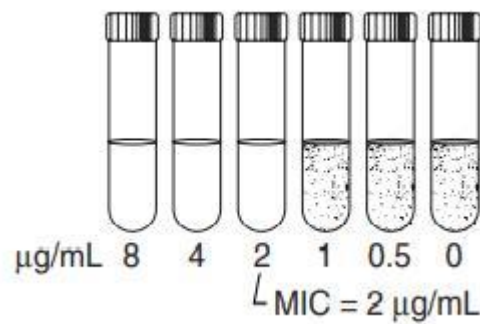


Figura 4. Ensayo de susceptibilidad por dilución en caldo (Ryan, 2003).

CAPÍTULO III

3 METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del área de estudio

La investigación se realizó en dos fases; una fase de muestreo y otra experimental. El muestreo se llevó a cabo en el “Paradero Ecoturístico Tilapia San Pedro”, ubicado en las coordenadas (17 N; 780527.00 m E; 97106.00 m N), al noreste de la provincia de Imbabura, en el cantón Ibarra, en la parroquia de Lita (Anexo 1.).

La fase experimental fue realizada en los laboratorios de la Universidad Técnica del Norte, en los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Biotecnología Aplicada, con las coordenadas (17 N; 821248.00 m E; 38376.00 m N), ubicadas en el campus antiguo del hospital San Vicente de Paúl, en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura (Anexo 2.).

3.2 Cultivo de microalga

Las cepas con las que se trabajó fueron: *Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*, obtenidas del cepario de microalgas del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte; aisladas a partir de muestras tomadas de la laguna Yahuarcocha con anterioridad.

3.2.1 Siembra en medio sólido

Con el objetivo de obtener biomasa, las cepas seleccionadas se sembraron inicialmente en cajas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, con 20 ml de medio modificado *Murashige Skoog (MS)*, establecido como medio de cultivo para crecimiento de microalgas (Bernard y Rout, 2018), (Anexo 3).

El medio se ajustó a un pH de 7 y las cepas se cultivaron mediante la técnica de estriado simple en placa. Las placas se cultivaron bajo condiciones controladas: una irradiancia de $21.55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, obtenida a partir de una fuente de luz LED blanca (Light Emitting Diodes) de 12W. El control de esta variable fue medida con un luxómetro (LIGHT METER LICOR 250A), y luego transformada a unidades de radiación fotosintéticamente activa o PAR, haciendo uso del factor de conversión descrito por Borowitzka y Moheimani, (2013), para lámparas de luz blanca (Luxes x 0.0135); el fotoperiodo que se usó fue de 24:0 horas de luz:oscuridad respectivamente, a una temperatura ambiente de $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.65 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Condiciones de cultivo y escalamiento

La biomasa de microalga, obtenida a partir del crecimiento en placas, fue tomada con la ayuda de un asa estéril y disuelta en 2 tubos que contenían 2 ml de una solución nutritiva constituida por un medio comercial (1 mL.L^{-1}), y bicarbonato de sodio NaHCO_3 (0.3 g.L^{-1}) (Anexo 4). En total 4 ml de la biomasa disuelta en la solución nutritiva, se adicionaron a un frasco de vidrio con 150 ml de dicha solución mencionada anteriormente (Figura 5).

Posteriormente, los reactores se sometieron a un fotoperíodo de 24:0 horas de luz: oscuridad respectivamente, con lámparas led de luz blanca, con una intensidad de luz de $93.2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, medida por un luxómetro (LIGHT METER LICOR 250A), por un tiempo de 8 días, a temperatura ambiente ($26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.65 \text{ }^\circ\text{C}$), para luego ser escalados a un volumen de 1 litro, en fotobiorreactores diseñados en laboratorio; el esquema del reactor se encuentra descrito en el siguiente apartado (Figura 6).

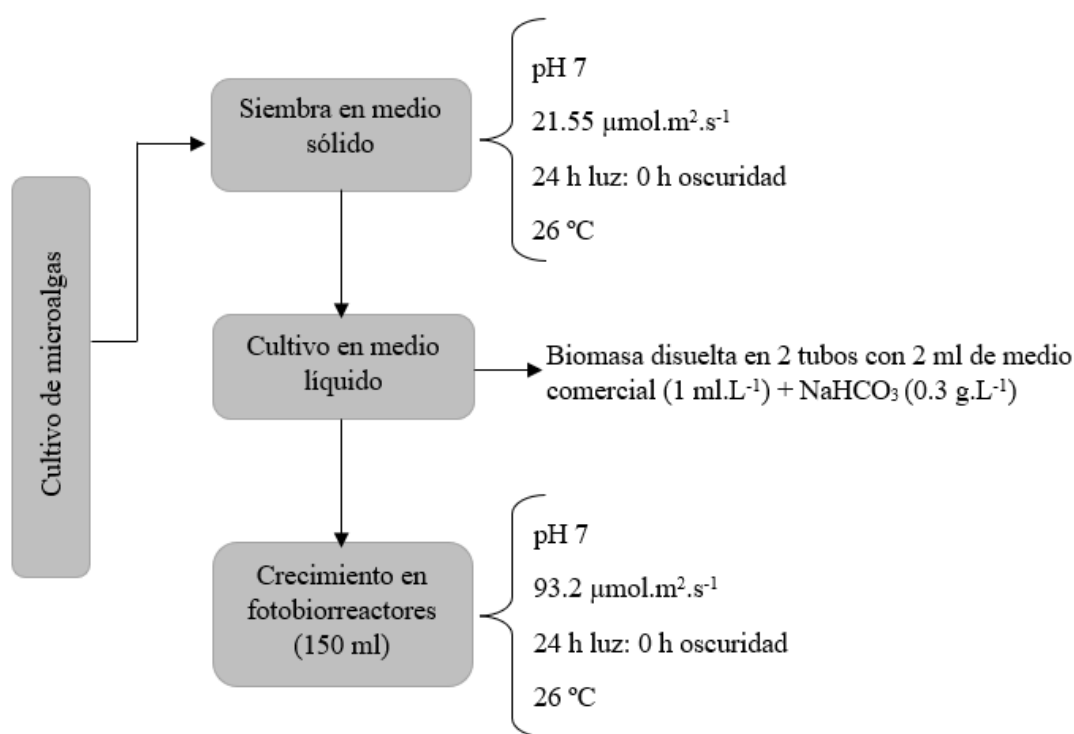


Figura 5. Esquema del cultivo de microalgas.

3.3.1 Modo de operación del fotobiorreactor de 1 litro

Para el diseño del fotobiorreactor se tomaron en cuenta aspectos como, la distribución de luz, agitación y burbujeo, y control del cultivo (toma de muestra)

(Benavente et al., 2012); llegando así a un diseño de columna de burbujas (Acuña, 2004), pues posee un burbujeo constante en la base del reactor, lo cual mejoró la distribución de aire en el recipiente, y permitió una mejor circulación de las microalgas dentro del fotobiorreactor (Andersen, 2005) (Figura 6).

Tal como se observa en la Figura 6 (a), el reactor consta de una entrada de aire, la cual está compuesta por una bomba de pecera con capacidad de $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, conectada una manguera de pecera con un filtro Micropore 0.22 micras (Figura 6 b y c). La manguera de entrada de aire conecta con una manguera difusora dispuesta en la base del fotobiorreactor en forma de espiral; esta manguera consta de pequeños agujeros los cuales ayudan a la dispersión del aire, contribuyendo a que el burbujeo se distribuya por todo el reactor (Figura 6 g, i).

Como salida de gases en el fotobiorreactor, se añadió en la parte central de la tapa, una manguera pequeña, de 4 cm, misma que se encuentra con un tapón de algodón para evitar el ingreso de microorganismos patógenos ajenos al medio (Figura 6 d).

Para la toma de muestras, y su posterior análisis y control del cultivo, se implementó una manguera de venoclisis o cateterismo, en la cual es posible tomar medio de cultivo del reactor, mediante una jeringa estéril (Figura 6 e).

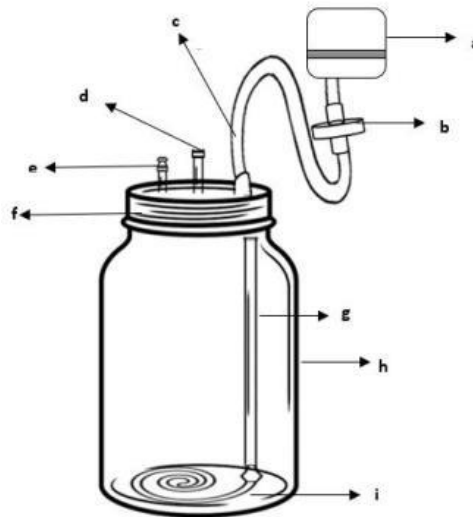


Figura 6. Diseño del fotobiorreactor para microalgas. a) Bomba de aire (bomba de pecera); b) Manguera con Filtro Micropore 0.22 micras; c) Manguera de pecera (entrada de aire); d) Manguera con filtro de algodón (salida de aire); e) Manguera de venoclisis para toma de muestra; f) Tapa metálica; g) Manguera de pecera; h) Frasco de vidrio (2 Litros); i) Manguera difusora de aire.

3.3.2 Inoculación al fotobiorreactor de 1 litro

El 10 % del volumen del reactor (1 litro), fue inoculado con el caldo de cultivo de los frascos inóculos montados previamente, la cantidad de células por ml inoculadas por especie para cada fotobiorreactor fue: *C. agloiformis* (1.49×10^6 células. ml^{-1}), *P. pectinatus* (2.86×10^6 células. ml^{-1}), *E. pseudoalveolaris* (2.4×10^6 células. ml^{-1}). El medio consistió en una solución de agua destilada previamente auto clavada, a la cual luego se le adicionó el medio comercial (1 ml.L^{-1}), suplementado con NaHCO_3 (0.3 g. L^{-1}). Las cepas de los reactores crecieron bajo condiciones de fotoperiodo de 24:0 horas de luz: oscuridad.

3.4 Parámetros cinéticos

3.4.1 Toma de muestra

El procedimiento para la toma de muestra de los fotobiorreactores fue realizado por medio de la manguera de venoclisis ubicada en la tapa del fotobiorreactor (Figura 6 e), con la ayuda de una jeringa estéril, con la que se extrajo 1 ml de volumen de muestra, misma que fue puesta en microtubos de 1ml para sus posteriores análisis.

La toma de muestra se llevó a cabo para las mediciones de absorbancia y densidad celular (células. ml^{-1}), estas se realizaron dos veces por día, una en la mañana y otra en la tarde, con una diferencia de 4 horas y 30 minutos; ambos procedimientos fueron llevados a cabo hasta alcanzar la fase estacionaria (Alvarez et al., 2016; Rosales-Loaiza et al., 2008).

3.4.2 Absorbancia

La absorbancia se mide con el objetivo de construir una gráfica de crecimiento en función de la absorbancia. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro (Jenway 6705 UV/Vis) a 750 nm, pues en esta longitud de onda es posible medir la cantidad de células microalgales presentes en una muestra, al medir clorofila A, la cual es abundante en las microalgas, especialmente en microalgas verdes, mismas que son empleadas en este estudio, por lo que el aumento en la cantidad de clorofila A en la muestra, indica un crecimiento de las microalgas en un fotobiorreactor (Salomón, 2015); la muestra fue diluida con agua destilada dependiendo del crecimiento del cultivo para evitar que la muestra se presente muy turbia, facilitando así la lectura en el

espectrofotómetro; cada muestra fue medida por triplicado. Con estos datos se obtuvo una gráfica de absorbancia versus tiempo.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento específica y el tiempo de generación diario en los fotobiorreactores, se utilizó la ecuación (2) y la ecuación (3) respectivamente, misma que se describió con anterioridad (Andersen, 2005).

3.4.3 Concentración de células por ml

El conteo de las células se llevó a cabo con la ayuda de un hematocitómetro Neübauer Boeco Germany (0.1 mm), bajo un microscopio (Olympus CX31) a 40X; la muestra de cada especie de microalga diluida fue llevado al conteo, cada muestra tomada fue medida por triplicado. Para el cálculo de la concentración de microalgas por ml en el hematocitómetro Neübauer, se usó la siguiente fórmula descrita por (Arredondo Vega y Voltolina, 2007):

$$\text{Concentración celular} \frac{\text{cel}}{\text{ml}} = \# \text{ células} \times 10^4 \times F.D$$

Ecuación 5

Dónde:

células = número de células totales contadas

10^4 = factor de conversión de 0.1 μ l a 1 ml

F.D = factor de dilución

Se obtuvo una gráfica de concentración celular versus tiempo. Adicionalmente se determinó la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación diario de las microalgas, donde se aplicó la fórmula descrita en la ecuación (2), y en la ecuación (3), respectivamente (Andersen, 2005).

3.4.4 Relación entre absorbancia y concentración celular

Para obtener una curva de calibración que nos permita evaluar el estado de crecimiento en el fotobiorreactor, se analizó la relación entre la biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz; Al comprobar la existencia de esta relación, los datos obtenidos de absorbancia nos ayudaran a conocer la cantidad de

células.ml⁻¹ del cultivo y así determinar en qué fase de crecimiento se encuentran las microalgas (Díaz, 2016).

Para esto se elaboró una gráfica con los datos obtenidos previamente de las mediciones diarias de absorbancia en un espectrofotómetro, y de la concentración celular realizadas en la cámara de Neübauer Boeco Germany (0.1 mm).

3.4.5 Análisis estadístico

Las variables obtenidas tanto de absorbancia, concentración celular, y la relación entre estas dos variables, fueron analizadas mediante una prueba t de Student, para determinar la existencia de una correlación estadísticamente significativa de cada uno de estos datos, la prueba se llevó a cabo con un nivel de confianza del 95%, y una probabilidad $p < 0.05$. Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico InfoStat v2020.

3.5 Cosecha

El proceso se realizó mediante centrifugación del caldo de cultivo del reactor en tubos falcon de 50 ml, a 5000 rpm por 5 min a 4°C (Figura 7). Los productos de este proceso fueron, extracto crudo (precipitado o biomasa húmeda), y extracto extracelular (sobrenadante), tal como se muestra en la Figura 8.

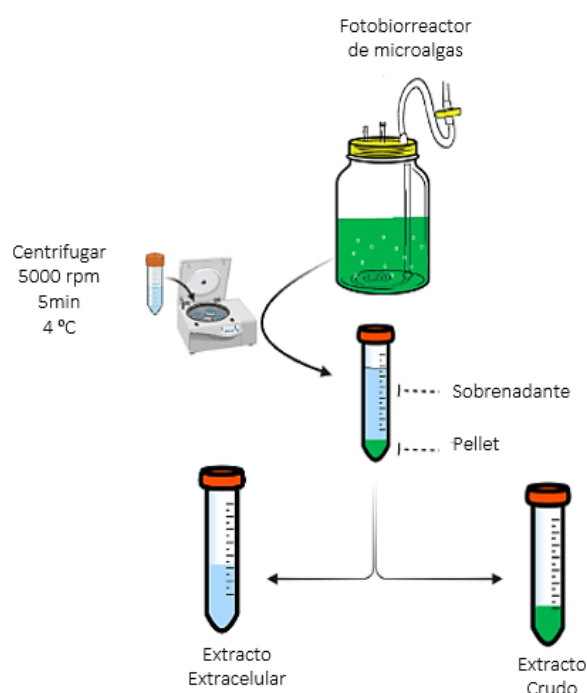


Figura 7. Esquema del proceso de cosecha de biomasa microalgal.

Se tomó este extracto extracelular y se almacenó en tubos falcon de 15 ml a 4 °C para las posteriores pruebas de actividad antimicrobiana. Posteriormente, siguiendo el mismo proceso, se realizaron lavados a la biomasa cruda con agua destilada, para asegurar la que esta se encuentre libre del medio acuoso (Barona, 2014; Suasnavas et al., 2017).

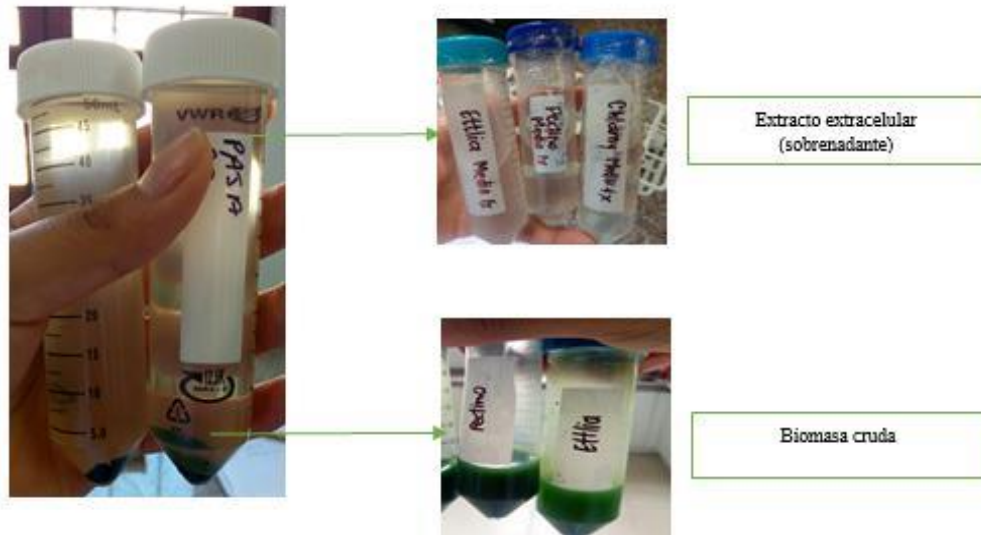


Figura 8. Productos obtenidos del cultivo de microalgas.

3.5.1 Rendimiento de biomasa microalgal

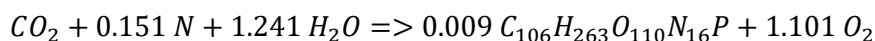
La biomasa cosechada fue llevada a un proceso de secado en una estufa a 60 °C de temperatura por 48 horas (Figura 9); pasado este tiempo, la biomasa se pesó en una balanza analítica (ADAM PGW 753i).



Figura 9. Biomasa seca de microalgas.

Para el cálculo del porcentaje de rendimiento de la biomasa, se estableció la reacción estequiométrica en función del sustrato consumido (Nitrógeno) (Ecuación 7), de acuerdo con las guías mencionadas por Rodríguez et al., (2012) y Elías et al., (2015);

de esta reacción se obtuvo el rendimiento teórico, por otro lado, se obtuvo el valor del rendimiento real con los datos obtenidos en laboratorio de la biomasa seca. Tanto el rendimiento real, y teórico, se calcularon dividiendo la cantidad de biomasa para la cantidad de sustrato (N). Finalmente, el porcentaje de rendimiento se determinó valiéndose de la ecuación 8 descrita por Doran, (2013). Los datos fueron medidos por triplicado.



Ecuación 7.

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento Real}}{\text{Rendimiento Teórico}} \times 100$$

Ecuación 8

3.5.1.1 *Análisis estadístico*

Los datos de rendimiento obtenidos de cada una de las microalgas fueron valorados mediante un análisis de varianza ANOVA, para así determinar diferencias significativas y la especie de microalga con el mejor rendimiento. Los datos fueron evaluados en el programa estadístico InfoStat v2020.

3.6 **Obtención del extracto intracelular mediante ruptura celular por sonicación**

El proceso de ruptura de la pared celular de las microalgas para obtener el extracto intracelular, se realizó según la metodología planteada por Balderas et al., (2020), en el que se modificó el uso de la biomasa de microalga seca, pues para este ensayo se empleó biomasa cruda (húmeda) de microalga (Figura 10).

Para obtener el extracto intracelular, se añadió 1 ml de NaOH (1M) por cada ml de biomasa cruda, luego se llevó a congelación a 4 °C por 30 minutos. A continuación, la muestra se agitó en un vortex (Glob científico inc.) para así romper las partículas de hielo.

La biomasa fue llevada a sonicación; utilizando un limpiador ultrasónico (Branson modelo 2510R-DTH), el cual operaba bajo parámetros fijos como: una frecuencia de 42 kHz y una potencia de 100 W; el proceso se llevó a cabo por un tiempo de 90 minutos. Posteriormente, la muestra fue observada bajo el microscopio a 40x, con

el fin de evidenciar una ruptura de la pared celular en la microalga (Adam et al., 2012; Klotz, 2011).

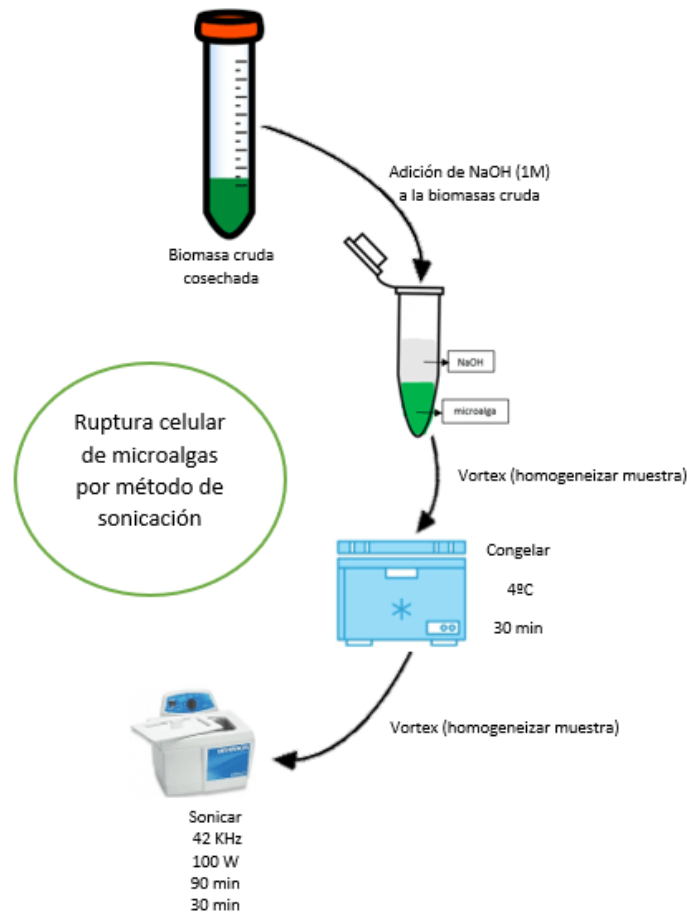


Figura 10. Esquema del proceso de ruptura celular de microalgas por el método de sonicación.

3.7 Determinación de carbohidratos totales (Dubois) mediante Fenol-Ácido sulfúrico

Mediante este método se cuantifico el contenido de carbohidratos de una muestra mediante el método colorimétrico de fenol-sulfúrico, el cual consiste en una reacción donde los azúcares complejos se desdoblán en sacáridos más simples al ser hidrolizados, estos se colorean por el fenol, el cual absorbe la luz en el rango visible a una longitud de onda de 480 a 490 nm (Moheimani, 2013). El método se ha desarrollado para determinar cantidades muy pequeñas de azúcares y sustancias relacionadas (Manzoor et al., 2014; Zuriaga-Agustí et al., 2013). Para este ensayo fue preciso obtener previo a la medida de las muestras de microalga, dos curvas patrón, con el objetivo de conseguir una ecuación para así determinar la concentración de carbohidratos totales cada la muestra.

3.7.1 Preparación de la curva patrón

Fue necesario establecer dos curvas patrón, para cuantificar la concentración de carbohidratos totales presentes en el sobrenadante (muestra disuelta en un medio comercial) y en el extracto sonicado (muestra disuelta en NaOH 1M).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se prepararon dos soluciones stock, una que contenía 10 ml del medio comercial con glucosa ($C_6H_{12}O_6$), y otra que contenía 10 ml de NaOH (1M) con $C_6H_{12}O_6$ a una concentración de $100 \mu g.ml^{-1}$.

Para obtener la curva inicialmente se tomaron alícuotas de las soluciones preparadas de 0.1 ml; 0.2 ml; 0.3 ml; 0.4 ml; 0.5 ml; 0.6 ml; 0.7 ml; 0.8 ml; 0.9 ml, y 1.0 ml, las cuales a excepción de la última alícuota, se completaron hasta un volumen de 1.0 ml con el solvente respectivo (medio comercial o NaOH 1M), para el blanco para la curva del sobrenadante se usó 1 ml del medio comercial, y para la curva de la muestra sonicada se usó 1ml de NaOH (1M). Cabe señalar que cada dilución corresponderá a una concentración del azúcar, pues se partió de una solución stock, por lo que cada alícuota tomada representara una concentración en $\mu g.ml^{-1}$.

Luego de esto se aplicó el método de Dubois en todos los tubos, para lo cual se añadió a cada tubo 25 μl de una solución acuosa al 5 % de fenol (C_6H_6O); luego de esto se añadió rápidamente 2.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, luego se dejaron los tubos en reposo durante 10 min, se agitaron durante 30 segundos, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta conseguir la transformación de color (Morales, 2012).

Para obtener la lectura bajo el espectrofotómetro, se tomó 1 ml de cada tubo y se colocó en una cubeta, para luego ser medida a 484 nm. Luego con los datos de absorbancia y concentración celular se graficó Abs Vs. Concentración de azúcares, la cual debió tener un $R^2= 0.99$, lo cual me indica que las variables poseen una correlación significativa, una vez cumplido esto, se obtuvo una ecuación de la recta para cada curva patrón.

La ecuación obtenida se expresó como $Y= mX+b$, siendo en este caso Y la absorbancia, y X la concentración del carbohidrato en $\mu g.ml^{-1}$. Sabiendo esto, se despejó x en la ecuación, y de esta forma se obtuvo una ecuación para calcular la concentración de carbohidratos totales en una muestra en base a la absorbancia.

Las ecuaciones obtenidas en cada curva patrón fueron usadas para el cálculo de la cuantificación de carbohidratos totales de las muestras correspondientes.

3.7.2 Preparación y medida de la muestra

Para el análisis de las muestras se tomó 1 ml, tanto del sobrenadante, como del extracto sonicado de microalga. Luego a cada muestra se aplicó el método de Dubois descrito anteriormente, añadiendo 25 μ l de solución acuosa al 5 % de fenol (C_6H_6O); y luego rápidamente 2.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, dejando los tubos en reposo durante 10 min, y agitándolos durante 30 segundos.

El blanco para la muestra de sobrenadante fue el medio líquido comercial a una concentración de 1 ml.L^{-1} , y para el extracto sonicado fue NaOH (1M). Estas muestras se midieron bajo el espectrofotómetro a 484 nm (Morales, 2012). Los datos obtenidos de absorbancia fueron reemplazados en la ecuación correspondiente obtenida a partir de las curvas patrón realizadas con anterioridad.

3.7.3 Análisis estadístico

Para los datos obtenidos en la curva patrón, de absorbancia y concentración de carbohidratos, se estableció una prueba t de Student, para determinar el coeficiente de correlación estadística entre la absorbancia y la concentración del carbohidrato. Dicho análisis se realizó con un nivel de confianza del 95% y una probabilidad de $p < 0.05$. El programa estadístico usado fue InfoStat v2020.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA entre los datos obtenidos del sobrenadante y del sonicado para cada especie, y así determinar en qué tipo de muestra existió mayor concentración de carbohidratos. De igual manera se aplicó un ANOVA para así determinar la especie de microalga con mayor cantidad de carbohidratos. Estos análisis se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 95% y una probabilidad de $p < 0.05$. El programa estadístico usado fue InfoStat v2020.

3.8 Evaluación de la bioactividad

3.8.1 Selección de tilapias enfermas

Las tilapias fueron muestreadas en el paradero ecoturístico en Lita, en este lugar se encontraban varios estanques, de los cuales se seleccionaron los menos profundos para poder visualizar a los peces con síntomas de enfermedad. Se seleccionaron peces que presentaban los signos clínicos de exoftalmia, branquias pálidas, hemorragia ocular, natación errática y circular, y daños en las aletas (Osman et al., 2017).

Los animales fueron sacados del estanque hasta provocar muerte por asfixia, luego con la ayuda de un hisopo estéril se hizo un frotis en órganos externos: opérculo y ojos; estos hisopos se almacenaron en tubos de tapa rosca con 15 ml de agua peptona; a continuación, los peces fueron almacenados en un cooler para su transporte al laboratorio (Thai Agricultural Standard, 2010).

3.9 Cultivo a partir de órganos diana

Los peces muestreados fueron inmediatamente llevados a una cámara de flujo laminar para realizar una disección en la zona abdominal, para extraer el riñón, de la misma manera se realizó la disección en la cabeza del pez, aproximadamente a la altura de los ojos, para identificar y extraer el cerebro (Figura 11)(Anshary et al., 2014).



Figura 11. Disección y selección de órganos de tilapia.

Luego los órganos diseccionados fueron macerados en una caja Petri con la ayuda de un bisturí estéril, de forma aséptica se tomó una muestra con la ayuda de un aza, para sembrar mediante estriado simple en placas con medio agar sangre (5 % de sangre), e incubarlos a 37°C por 48 horas; las muestras almacenadas en agua peptona, obtenidas a partir del hisopado previo de opérculo y ojos, fueron igualmente sembrados

mediante estriado simple en placas con medio agar sangre (5% de sangre), a continuación se incubaron a 37°C por 48 horas (Bromage et al., 1999, y Ye et al., 2011).

3.10 Aislamiento del patógeno

3.10.1 Prueba de Catalasa

Las placas cultivadas previamente por 48 horas fueron sometidas a una prueba bioquímica de identificación de microorganismos, llamada prueba de catalasa. La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas, el principal objetivo de esta prueba es separar los géneros *Micrococaceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. (negativa) y *Enterococcus* spp. (negativa) (Antonio et al., 2010). Por lo tanto, se buscó placas que al ser sometidas a esta prueba fueran catalasa negativas.

Con la ayuda de un palillo estéril se tomaron colonias de la placa, y se distribuyó sobre una gota de peróxido de hidrógeno; en este caso se buscaron colonias catalasa negativas (Ye et al., 2011). Estas colonias catalasa negativas fueron sembradas nuevamente en agar sangre con 5% de sangre, mediante un estriado por agotamiento, e incubadas a 37°C por 48 horas, con la finalidad de aislar al microorganismo.

3.10.2 Tinción Gram y morfología

Se buscaron colonias en la placa que posean características de estreptococos, como lo son colonias pequeñas blancas, translúcidas y convexas (Yessica Ortega et al., 2017). Otra herramienta de identificación de los microorganismos aislados fue la tinción Gram, y su posterior observación bajo el microscopio a un aumento de 100X, con el objetivo de evidenciar la presencia de cocos y cadenas de cocos Gram positivos. Las colonias que no se observaron puras totalmente fueron nuevamente resembradas en agar sangre con 5% de sangre, mediante un estriado por agotamiento, e incubadas a 37°C entre 24 a 48 horas.

3.10.3 Identificación de microorganismos mediante espectrometría de masas MALDI-ToF

La espectrometría de masas MALDI-ToF o desorción/ionización laser asistida por matriz, es una técnica basada en el análisis de iones moleculares de macromoléculas

celulares, las cuales muestran un perfil de espectro característico para cada macromolécula, lo cual hace que esta herramienta sea muy usada para identificar bacterias, hongos, y levaduras (Schumann & Maier, 2014).

Para la identificación de especies bacterianas se usa comúnmente el perfil de espectro de una proteína ribosomal pues estas son moléculas bastante conservativas en el curso de la evolución, y los espectros que presentan son característicos de un taxón dado; en este caso proteínas del ribosoma de 16S ARN, el cual es comparado con la base de datos que posee el dispositivo, para así determinar la probabilidad de similitud mediante un porcentaje, y así determinar el género y especie del microorganismo (Assis et al., 2017).

Las colonias aisladas fueron enviadas a los Laboratorios de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM, donde se sometieron a una identificación taxonómica mediante espectrometría de masas MALDI-ToF, misma que ya se ha usado para identificar microorganismos del género *Streptococcus* (Rothen et al., 2020).

Se utilizó una matriz de ionización HCCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid), 40 mg/ml y modo Linear SARAMIS para la lectura de los pocillos; los softwares usados fueron MALDI-MS Application (2.9.4.1) y SARAMIS (System Version 4.1.0.9) para la identificación de microorganismos presentes en la muestra, en este caso para identificar presencia de *Streptococcus* sp. (Kann et al., 2020 y Saltos Rosero et al., 2020).

3.11 Ensayos de actividad antimicrobiana

Debido a que no se encontró el patógeno deseado en las tilapias muestreadas, se optó por un patógeno disponible en los laboratorios de Biotecnología Aplicada-UTN para iniciar los ensayos de actividad antimicrobiana, siendo este un *S. agalactiae*, que fue seleccionado debido la coincidencia con el género de interés, e incluso siendo su especie, de las más reportadas en casos de estreptococosis en tilapias.

Se aplicaron los extractos extracelular, intracelular, y extracto crudo de las microalgas *C. agloiformis*, *P. pectinatus*, y *E. pseudoalveolaris*, frente a cultivos de *S. agalactiae*. A continuación, se establecieron los factores y niveles para los ensayos de bioactividad, siendo las especies de microalga, los extractos de microalga, y el patógeno

los factores experimentales; por otro lado, los niveles correspondientes para cada factor fueron definidos, estos datos se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Factores y niveles de estudio.

INDICE	FACTORES	NIVELES
		a1= <i>Ettlia pseudoalveolaris</i>
A	Especies de microalga	a2= <i>Chlamydomona agloiformis</i> a3= <i>Pectinodesmus pectinatus</i>
		b1: Extracto crudo
B	Extractos de microalga	b2: Extracto extracelular b3: Extracto intracelular
C	Patógeno	c1: <i>Streptococcus agalactiae</i>

En total se obtuvieron 9 tratamientos, para los ensayos de bioactividad de los extractos de microalgas, cada tratamiento fue realizado por triplicado (Tabla 4).

Tabla 4.

Tratamientos experimentales.

TRATAMIENTOS		SIGNIFICADO
Nº	CÓDIGO	
1	a1b1c1	<i>Ettlia pseudoalveolaris</i> +Extracto crudo+ <i>Streptococcus</i> sp.
2	a1b2c1	<i>Ettlia pseudoalveolaris</i> +Extracto extracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.
3	a1b3c1	<i>Ettlia pseudoalveolaris</i> +Extracto intracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.
4	a2b1c1	<i>Chlamydomona agloiformis</i> +Extracto crudo+ <i>Streptococcus</i> sp.
5	a2b2c1	<i>Chlamydomona agloiformis</i> +Extracto extracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.
6	a2b3c1	<i>Chlamydomona agloiformis</i> +Extracto intracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.
7	a3b1c1	<i>Pectinodesmus pectinatus</i> +Extracto crudo+ <i>Streptococcus</i> sp.
8	a3b2c1	<i>Pectinodesmus pectinatus</i> +Extracto extracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.
9	a3b3c1	<i>Pectinodesmus pectinatus</i> +Extracto intracelular+ <i>Streptococcus</i> sp.

Los ensayos se llevaron a cabo por el método de difusión en placa o Método de Kirby-Bauer (Sacsquispe Contreras y Velásquez Pomar, 2002); para lo cual se usó

medio Mueller Hinton (MH) agar (DIFCO) con 5% de sangre, y *S. agalactiae*, como el patógeno para la evaluación frente a los tres extractos de microalga.

Para preparar el cultivo de *S. agalactiae* que sirvió como inóculo para el ensayo de bioactividad, a este se lo sembró en un tubo con tapa rosca con 7ml de medio TSB 24 horas antes del ensayo, luego de este tiempo, el cultivo en TSB se ajustó a una turbidez de 0.5 en la escala McFarland, este procedimiento se lo realizó con un turbidímetro (Cepas et al., 2019).

Se inició con la siembra del patógeno (*S. agalactiae*) en las placas; la siembra se realizó mediante estriados continuos, intentando cubrir lo más uniformemente posible la placa, luego de esto, se dejaron secar las placas de entre 1 a 3 minutos dentro de la cámara de bioseguridad (Berenice, 2012).

Se impregnaron discos de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro con 25 μ l de cada uno de los extractos de microalga, estos fueron colocados en la superficie del medio MH. Para evitar que los discos con el extracto de microalga se dispersasen en el medio, se dejaron secar por 5 minutos antes de ser puestos sobre la superficie de la placa.

Tal como se observa en la Figura 12, los discos se distribuyeron adecuadamente sobre el medio, con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa y una distancia de alrededor de 30 mm entre discos (Barona, 2014); en cada placa se colocaron tres discos de papel filtro, conteniendo en cada disco un tipo diferente de extracto de microalga.

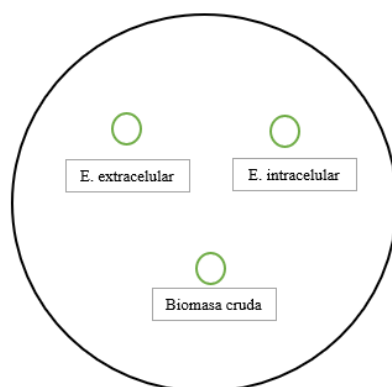


Figura 12. Discos con extracto de microalga sobre el medio MH inoculado con *S. agalactiae*.

Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Cumplido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición formados, para así determinar el extracto y especie de microalga con mayor bioactividad, el procesos se describe en la Figura 13.

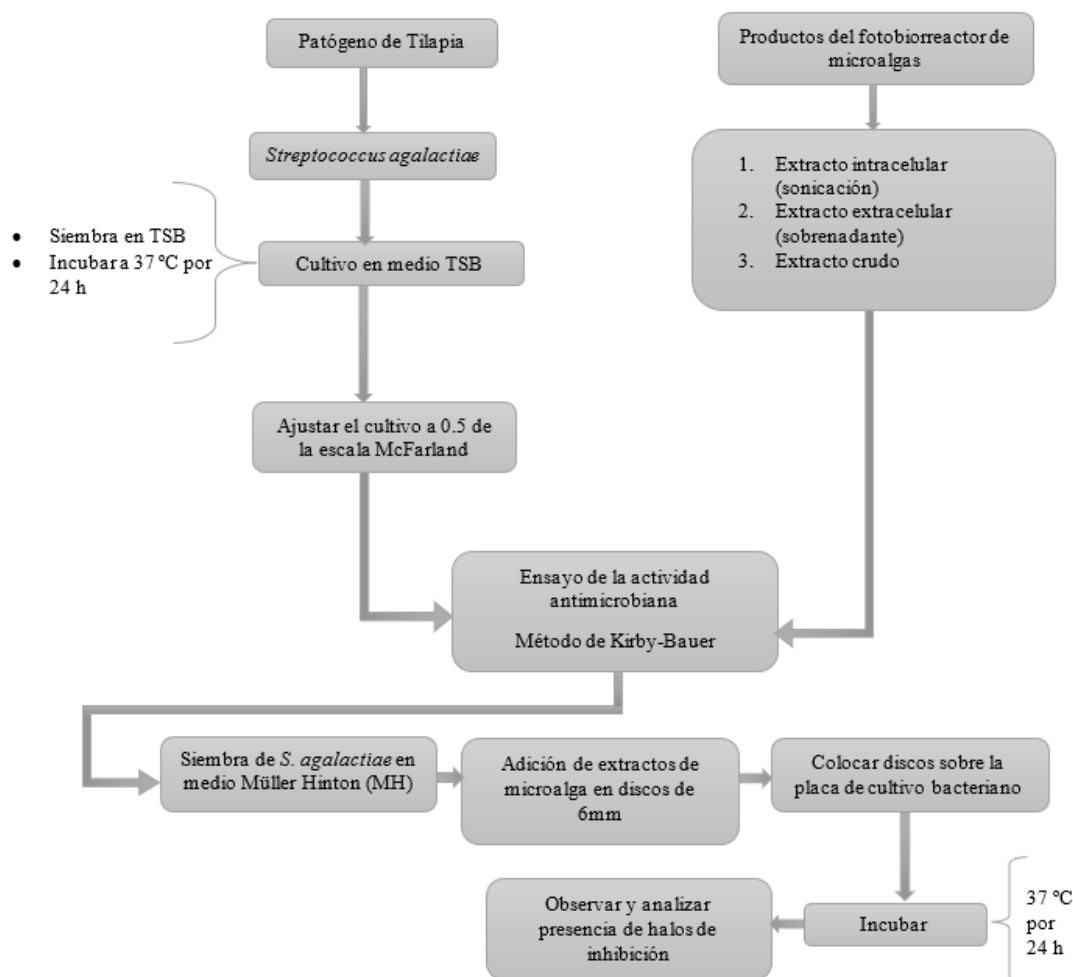


Figura 13. Diagrama del proceso de ensayo de actividad antimicrobiana.

3.11.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de microalga.

Estos ensayos se realizaron con los extractos que tuvieron resultados positivos en el método de Kirby-Bauer. La CMI de los distintos extractos fueron determinados mediante el método de macro dilución en caldo, basado en las directrices establecidas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, con ciertas modificaciones enfocados a la naturaleza de los extractos tratados (CLSI, 2018).

Se realizaron diluciones seriadas del extracto sobre para lo cual se tomaron 500 µl del extracto y fueron adicionados a 500 µl de TSB, el proceso se lo realizó de forma

consecutiva consiguiendo diferentes concentraciones de extracto tal como se muestra en la Figura 14 (Izabella et al., 2018).

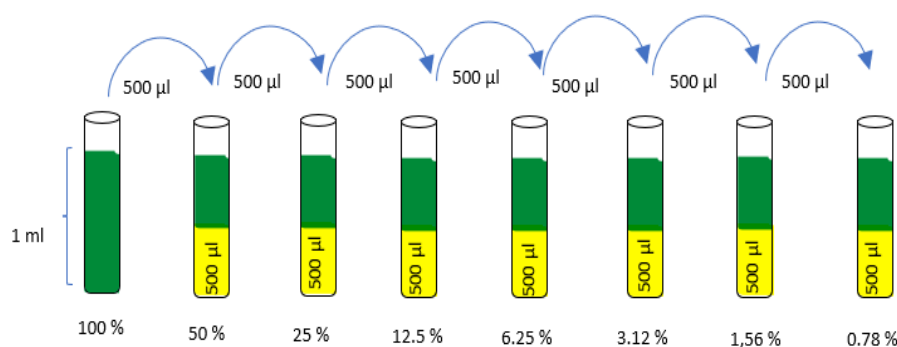


Figura 14. Método de macro dilución. Extracto de microalga (verde), medio TSB (amarillo).

Cada tubo terminó con 500 µl del extracto a distintas concentraciones, luego a cada tubo se le añadió 500 µl del cultivo bacteriano en TSB (*S. agalactiae*), ajustado previamente a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland; por lo tanto, la concentración inicial a la que se encontraba cada tubo se redujo nuevamente a la mitad; se usó un tubo sin el inóculo bacteriano como control negativo, y un tubo con el inóculo bacteriano como control positivo de crecimiento. Los tubos se dejaron incubar por 24 horas a 37 °C. Se realizaron 3 repeticiones de cada concentración ensayada.

La CMI fue determinada como la menor concentración del extracto diluido, donde no existió un crecimiento del patógeno en los tubos (cultivo de *S. agalactiae*), este crecimiento se analizó mediante una medición en el espectrofotómetro a 600 nm (CLSI, 2018; Santoyo et al., 2009).

Para la toma de absorbancia en el espectrofotómetro (Jenway 6705 UV/Vis) a 600 nm, se realizaron las diluciones necesarias, debido a la turbidez del extracto, con el objetivo de poder obtener una lectura estable entre las repeticiones; el blanco tuvo que ser elaborado para cada concentración, con el extracto de microalga correspondiente (Maadane et al., 2017).

Los tubos donde no se evidenció un crecimiento visible fueron sembradas en medio agar sangre mediante el método de extensión en placa, añadiendo 50 µl del tubo, sobre el medio sólido, los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 horas. Con estos datos obtenidos se realizaron curvas de Absorbancia vs concentración del extracto, para así determinar la CMI, y de acuerdo con la ausencia o crecimiento en placa se determinó la CMB para cada especie de microalga. La CMB se determinó como la menor

concentración del extracto donde no existió crecimiento bacteriano sobre las placas (CLSI, 2018).

3.11.2 Análisis estadístico

El diámetro de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos, fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA, y donde se determinó mediante una prueba de Tukey los mejores tratamientos. El análisis se realizó con un intervalo de confianza del 95%, y una probabilidad $p < 0.05$. Estos datos fueron analizados en el programa estadístico InfoStat v2020.

Por otro lado, los datos de absorbancia obtenidos para cada una de las concentraciones fueron analizados por medio de un ANOVA, para así determinar que existían diferencias significativas entre estas variables. Se usó un intervalo de confianza del 95%, y una probabilidad $p < 0.05$. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo en el programa estadístico InfoStat v2020.

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo describe los resultados en la obtención de los extractos de microalgas, el aislamiento del patógeno a partir de tejidos de tilapia, y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de microalga frente a *Streptococcus* sp.

4.1 Curva de crecimiento de las microalgas

Los parámetros que se obtuvieron de la cinética de crecimiento, correspondientes a cada especie usada, fueron; máxima concentración celular (x_{\max}) (más alta concentración de células que se obtuvo durante la curva de crecimiento), tasa de crecimiento específica (μ), y tiempo de duplicación de la microalga (T_g) (Tabla 5).

Tabla 5.

Parámetros de crecimiento obtenidos durante el cultivo de microalgas.

Microalga	x_{\max} (<i>cel.ml⁻¹</i>)	μ <i>d⁻¹</i>	T_g <i>d</i>	R^2 (Análisis de número de células)	R^2 (Análisis de absorbancia)
<i>C. agloiformis</i>	2.73x10 ⁷	0.76	1.32	0.91	0.95
<i>P. pectinatus</i>	5.13x10 ⁷	0.77	1.30	0.95	0.97
<i>E. pseudoalveolaris</i>	1.21x10 ⁷	0.34	2.93	0.95	0.97

Se obtuvo una curva de crecimiento para las especies; *Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*, mismas que se describen en la Figura 15.

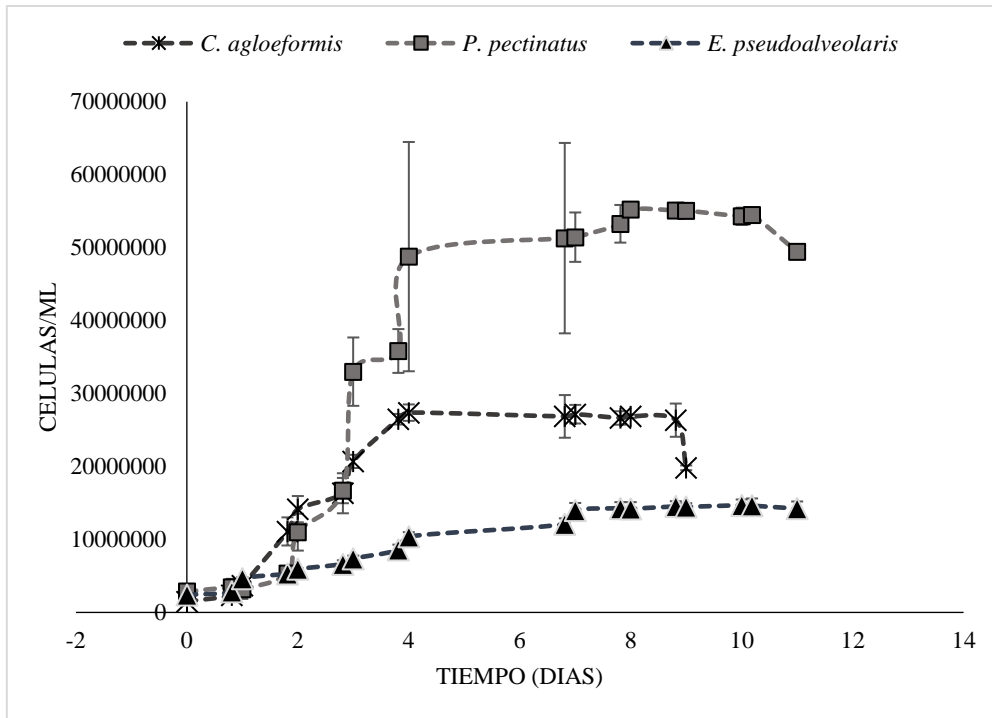


Figura 15. Curvas de crecimiento de las microalgas.

Todas las especies de microalga se comportaron de manera distinta a las condiciones de cultivo empleadas, pues se puede observar que no todas las microalgas crecieron con una buena concentración celular. Se puede observar que *P. pectinatus*, creció mejor en comparación con *C. agloiformis* y *E. pseudoalveolaris*, lo cual indica que la especie *P. pectinatus*, puede adaptarse mejor a las condiciones de crecimiento establecidas en este estudio, sin embargo, no se puede determinar que factor fue mejor aprovechado por esta microalga. De acuerdo con Grama et al., (2016), y Zhang et al., (2017), una intensidad lumínica que ronda los $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sobre el género *Pectinodesmus*, es reportada como la óptima, pues a mayores intensidades, se alcanzaría una fotoinhibición, perjudicando al cultivo. Si embargo hay distintas variables que inciden en como las microalgas se desarrollaran Sánchez et al., (2020).

A pesar de que *C. agloiformis* presentó una tasa de crecimiento similar a *P. pectinatus*, $\mu=0.76 \text{ d}^{-1}$, y $\mu=0.77 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, e incluso presentaron tiempos de generación similares siendo $T_g=1.32$ días para *C. agloiformis*, y $T_g=1.30$ días para *P. pectinatus*; sus concentraciones celulares máximas fueron ampliamente diferenciables, esto puede representar una baja capacidad por parte de *C. agloiformis* para adaptarse a las condiciones de cultivo, e incluso esta especie presentó un crecimiento exponencial, solamente hasta el día 4 (Figura 15), donde comenzó su fase estacionaria, manteniendo así una baja concentración celular, según parece *C. agloiformis* estuvo creciendo bajo

condiciones de estrés, lo cual por otra parte puede generar la acumulación de algún metabolito de interés especialmente carbohidratos, pues este se relaciona con la baja concentración celular (Torres et al., 2017).

Por otra parte, la especie *E. pseudoalveolaris*, mostró los más bajos resultados en la cinética de crecimiento tanto en $\mu=0.34\text{ d}^{-1}$, $T_g=2.93$ días y $x_{\max}= 1.21 \times 10^7$ células. ml^{-1} , con lo que se podría decir que esta especie no se logró adaptar a este medio de cultivo, sin embargo, se observó que en posteriores cultivos la microalga mejoró su producción de biomasa. De acuerdo a investigaciones realizadas por Seo et al., (2019), el género *Ettlia* debe ser primeramente adaptada al nuevo medio en pequeñas cantidades, especialmente si este varía bruscamente en sus nutrientes, pues estos pueden afectar funciones como la formación de azúcares y aminoácidos, y más importante, en la formación del material genético, pueden llegar a disminuir la división celular de estos microorganismos (Andersen, 2005).

Las curvas de crecimiento en las microalgas se comportaron de acuerdo con lo esperado, presentando una fase de adaptación, una fase exponencial, una fase estacionaria, y finalmente un inicio de su fase de muerte. Estos datos ayudaron a determinar los días de fase estacionaria para la cosecha de los reactores de cada especie de microalga, siendo de 8 días para *E. pseudoalveolaris*, y *P. pectinatus*, y de 5 días para *C. agloiformis*. De acuerdo con Arguello, (2020), y González Davis, (2010) ciertos metabolitos se desarrollan en la fase estacionaria en las microalgas, como lípidos, carotenoides o carbohidratos, pues estos suelen proveer de energía a la célula durante esta fase de crecimiento donde los nutrientes en el medio de cultivo son insuficientes. Adicionalmente se ha reportado que ácidos grasos como ácido graso palmitoleico, linoleico y oleico son producidos durante la fase estacionaria, siendo estos compuestos reportados por sus propiedades antimicrobianas Cortés et al., (2009).

Los resultados en el crecimiento de las microalgas estudiadas en esta investigación fueron distintos con otros estudios (Kim et al., 2021; Yirgu et al., 2021), pues factores como luz, temperatura, concentración de nitrógeno-carbono, salinidad, y pH pueden intervenir en la variabilidad en la cinética de crecimiento de una microalga (Gong y Huang, 2020). La intensidad de luz y fotoperiodos fueron variables importantes, pues Alvarez et al., (2016), menciona que una mayor intensidad lumínica

y tiempo de exposición incrementan la actividad fotosintética y la división celular, influyendo en la concentración de células en un fotobiorreactor.

De acuerdo a Nzayisenga et al., (2020), una mayor intensidad lumínica aumenta el crecimiento microalgal, sin embargo se estima que los valores óptimos se encuentran en un rango de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por lo que las especies de microalgas cultivadas en este estudio (*C. agloiformis*, y *E. pseudoalveolaris*), podrían incrementar su crecimiento al aumentar la intensidad lumínica a la que son expuestas, aunque en el caso de la especie *P. pectinatus*, posiblemente este incremento provoque una fotoinhibición, al sobrepasar los rangos de intensidad lumínica reportados para este género de microalga (Grama et al., 2016 y Zhang et al., 2017).

4.2 Obtención de extractos de cultivo de microalga

Los extractos se adquirieron en la fase estacionaria correspondiente de cada especie de microalga estudiada.

4.2.1 Extracto crudo

Los porcentajes de rendimientos obtenidos de biomasa con respecto al consumo de Nitrógeno, para cada especie de microalga tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las especies *C. agloiformis* y *E. pseudoalveolaris* ($F=7.33$; $gl=2$; $p=0.04$). El mejor rendimiento obtenido fue con la especie *E. pseudoalveolaris* con $0.97 \text{ g}/0.1\text{gN}$ (64%), en comparación con las especies *P. pectinatus* con $0.93 \text{ g}/0.1\text{gN}$ (61%) y *C. agloiformis* con $0.45 \text{ g}/0.1\text{gN}$ (30%) (Figura 16).

E. pseudoalveolaris obtuvo el mejor rendimiento con respecto a *P. pectinatus*, y *C. agloiformis*, tomando en cuenta que las microalgas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, posiblemente el cómo se adapta cada especie de microalga a estas condiciones determine su crecimiento (Andersen, 2005); estudios previos de Kim et al., (2020), encontraron que el género de *Ettlia* sp., posee una alta capacidad para aprovechar mejor intensidades lumínicas de hasta $630 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, lo cual explica que esta especie de microalga haya obtenido los mejores resultados en cuanto a rendimiento de biomasa, y posiblemente esta puede ser cultivada en estanques abiertos.

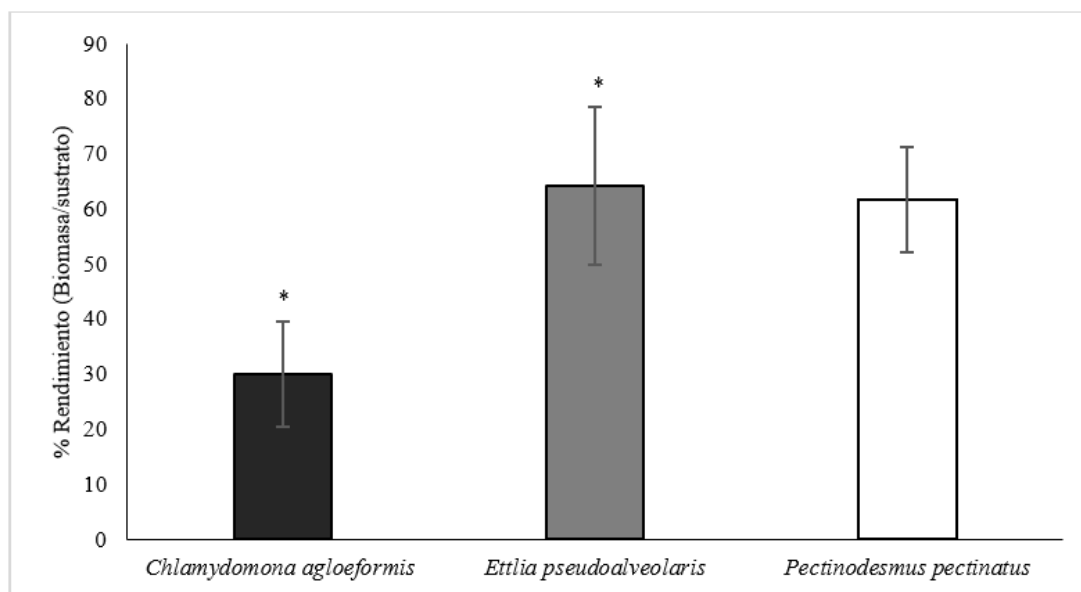


Figura 16. Rendimiento de especies de las microalgas de acuerdo con el consumo del sustrato.

La mezcla homogénea en un fotobiorreactor (FBR), es una de las principales características que influyen en el crecimiento celular (Borowitzka y Moheimani, 2013). Banerjee et al., (2020), estudió distintos tipos de FBR, entre estos diseños airlift con orificio dispersor, columna de burbujas con orificio dispersor, y columna de burbujas con anillo dispersor; resultando este último como el óptimo para la producción de biomasa. En el presente estudio se empleó un FBR de columna de burbujas (Figura 8), lo cual permitió una distribución homogénea del CO₂ dentro del reactor, el cual es un componente que interviene en la fotosíntesis, este es fijado por la enzima Rubisco donde se obtiene piruvato y acetil CoA, misma que actúa en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos, empleados como energía de división celular, en ausencia de luz (García & Guadalupe, 2012).

En los estudios reportados por Araujo et al., (2011), se obtuvieron resultados similares en los porcentajes de rendimientos con FBRs de columna de burbujas en el cultivo de microalgas de agua dulce; la ventaja con este tipo de FBR, está en la dispersión uniforme del CO₂, pues la microalga fija el CO₂, en el proceso de fotosíntesis, usándolo en el ciclo de Calvin, donde a partir de este se producen moléculas de triosa fosfato como di-hidroxiacetona-fosfato, y gliceraldehido-3-fosfato (G3P), siendo estos precursores para la formación de biomoléculas más complejas (lípidos y carbohidratos), que intervienen en la formación de nuevas células (Sánchez, 2019); esto se ha logrado evidenciar en las microalgas en estudio, pues estas mejoraron su crecimiento al ser cultivadas en un FBR de columna de burbujas con anillo dispersor.

La especie de microalga *C. agloiformis*, presentó el rendimiento más bajo, pues se ha reportado que el género *Chlamydomona*, necesita cantidades de intensidad lumínica altas de entre 300 a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Borowitzka y Moheimani, 2013 y Ho et al., 2015), por lo que la intensidad lumínica de 93.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, empleados en esta investigación fueron demasiado bajos para su producción de biomasa, aunque por otra parte esta falta de iluminación, junto con la baja concentración de Nitrógeno, puede ser propicia para el desarrollo de metabolitos como lípidos o carbohidratos (Figueroa-Torres et al., 2017).

4.2.2 Extracto intracelular

Se evidenció que existe una ruptura de la pared celular mediante el método de sonicación, pues la cuantificación de carbohidratos totales por el método del fenol-ácido sulfúrico de Dubois, demuestra que los componentes internos de la microalga son liberados (carbohidratos), por otro lado, la microscopía, realizada antes y después del procedimiento de ruptura, muestra que el método de sonicación afecta la pared celular de la microalga.

4.2.2.1 Cuantificación de carbohidratos por el método del fenol-ácido sulfúrico de Dubois

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, entre la concentración de carbohidratos totales del sobrenadante de las microalgas, con respecto a la concentración de carbohidratos totales de las muestras de microalgas sometidas a ruptura celular por el método de sonicación, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las especies, *C. agloiformis* ($F=2195.28$; $gl=1$; $p<0.01$), *P. pectinatus* ($F=161.33$; $gl=1$; $p<0.01$), y *E. pseudoalveolaris* ($F=857.03$; $gl=1$; $p<0.01$), siendo la concentración de carbohidratos totales en las muestras de microalgas sometidas al método de sonicación, mayor en comparación con la del sobrenadante de dichas microalgas (Figura 17).

De acuerdo con el estudio de Timira et al., (2021), la técnica de sonicación permite que se logre exitosamente la liberación de componentes intracelulares, como lípidos, proteínas, o carbohidratos, en microalgas, por lo que la cuantificación de carbohidratos realizada antes y después de la sonicación es un método confiable para poder evidenciar que existe una ruptura celular de las microalgas, pues se logró observar que la concentración de carbohidratos aumentó luego de ser sometidas a sonicación. Por otra parte se ha comprobado que dicha técnica es una de las más eficientes para obtener

compuestos intracelulares, en comparación con otras técnicas como: digestión por microonda y auto clavado (Ansari et al., 2018); esto explica que en todas las microalgas en estudio, luego de la ruptura celular, exista un aumento en la cantidad de carbohidratos, posterior al tratamiento de sonicación, pues las ondas de choque que se generan en el sonicador provocan un daño en la integridad celular de las microalgas.

Los parámetros empleados en la técnica de ruptura celular, como: potencia (100W), y frecuencia (42 Khz), coinciden con las investigaciones realizadas por Lecina et al., (2017) y Tavakoli et al., (2021), donde se logra demostrar que el método de sonicación rompe la pared celular en microalgas. Sin embargo el método puede ser optimizado al ejecutarse en conjunto con otras técnicas posteriores a la sonicación como: extracción con solventes para obtención de carbohidratos (Tavakoli et al., 2021; Zhao et al., 2013), lípidos (Neto et al., 2013); o extracción de líquido iónico para obtener un determinado producto (Tan et al., 2020).

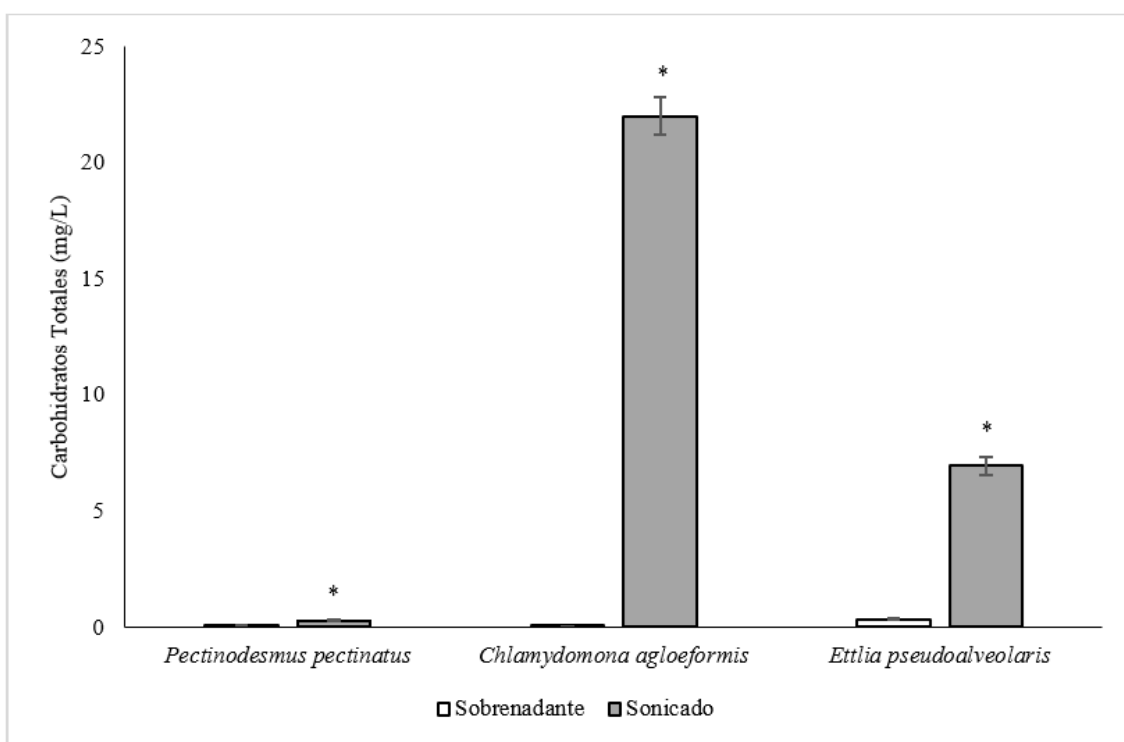


Figura 17. Concentración de carbohidratos totales de microalgas.

Por otro lado, se analizó la especie de microalga con el mayor contenido de carbohidratos totales, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las especies en estudio ($F=1305.66$; $gl=2$; $p<0.01$), siendo *C. agloeiformis* como la microalga con más concentración de carbohidratos con 21.99 mg. L^{-1} , a diferencia de las especies *E. pseudoalveolaris* (6.94 mg. L^{-1}), y *P. pectinatus* (0.3 mg. L^{-1}).

En el estudio realizado por Qu et al., (2020), se determinó que *Chlamydomona* sp. poseía una mayor concentración de carbohidratos que otras microalgas como *Desmodesmus* sp., y *Parachlorella kessleri*; así mismo Enwereuzoh et al., (2021), encontró que *Chlamydomona reinhardtii*, poseía la mayor concentración de carbohidratos en referencia a otras especies de microalgas; en ambos casos se concluye que *Chlamydomona* sp., posee una alta capacidad en la remoción de compuestos en el agua, pues esta logra fijar altas cantidades de Nitrógeno y Carbono, por lo que logra producir una importante cantidad de carbohidratos, incluso convirtiéndola en una especie potencial en la producción de bioetanol.

P. pectinatus fue la especie de microalga con la menor concentración de carbohidratos internos, lo cual puede estar ligado a condiciones de estrés, ya que ciertas microalgas se adaptan mejor que otras a ciertas condiciones de cultivo, según lo visto anteriormente, *P. pectinatus*, presenta un óptimo crecimiento reflejado en su producción de biomasa; sabiendo que compuestos como los carbohidratos aumentan en condiciones de estrés, posiblemente esta especie de microalga al estar bien adaptada al medio de crecimiento no necesita una mayor producción de carbohidratos Samadhiya et al., (2021).

Existen ciertos factores que influyen en la producción de carbohidratos, entre los más importantes, la concentración de nutrientes, siendo uno de estos el Nitrógeno, pues se ha demostrado que la ausencia o bajas concentraciones de este nutriente, causa un estrés en la célula, haciendo que esta produzca mayor cantidad de azúcares o lípidos (Benedetti et al., 2018), por lo que posiblemente la especie *C. agloiformis* necesitó una mayor cantidad de Nitrógeno que las demás especies de microalgas, por lo que entró en estrés, produciendo así mayor cantidad de carbohidratos. En el caso del CO₂, y la intensidad de luz, se sabe que estos intervienen en el proceso de la fotosíntesis, mediante la cual la microalga produce carbohidratos que se almacenan como almidón, además de otras biomoléculas (Salinas et al., 2021)

Adicionalmente si hablamos de fijación de CO₂, el diseño de columna de burbujas del FBR afecta el contenido de carbohidratos, pues este, junto con el fotoperiodo, influyen en el proceso de fotosíntesis, pues la cantidad de CO₂ distribuida en el FBR, ayudará o afectará la fijación del Carbono en el ciclo de Calvin, mediante el cual se obtienen azúcares usados como fuente energética y almacenados como almidón (Deviram et al., 2020); en este caso el FBR empleado en esta investigación, puede ser

empleado para la obtención de carbohidratos en *C. agloiformis*, sin embargo esto no quiere decir que sea óptima para obtención de biomasa, pues la especie se encontraba bajo un estrés, y de acuerdo con Torres et al., (2017), la producción de lípidos o carbohidratos generalmente suele estar ligado a un decrecimiento en la producción de biomasa.

4.2.2.2 Microscopia

Como se observa en la Figura 18, Figura 19, y Figura 20, las diferencias visibles bajo el microscopio (40X), luego de la ruptura celular por el método de sonicación fueron; daño de la pared celular y destrucción total de la misma.

Incluso en algunas microalgas se logró observar que ya no se encontraba su contenido, esto debido a que el proceso de sonicación afectó su pared celular. De acuerdo con Timira et al., (2021), el proceso de sonicación provoca que el colapso de las burbujas en un medio acuoso generen ondas de choque, las cuales provocan una desintegración de la pared celular de las microalgas, efecto que se logra observar en las especies *C. agloiformis*, *P. pectinatus*, y *E. pseudoalveolaris*.

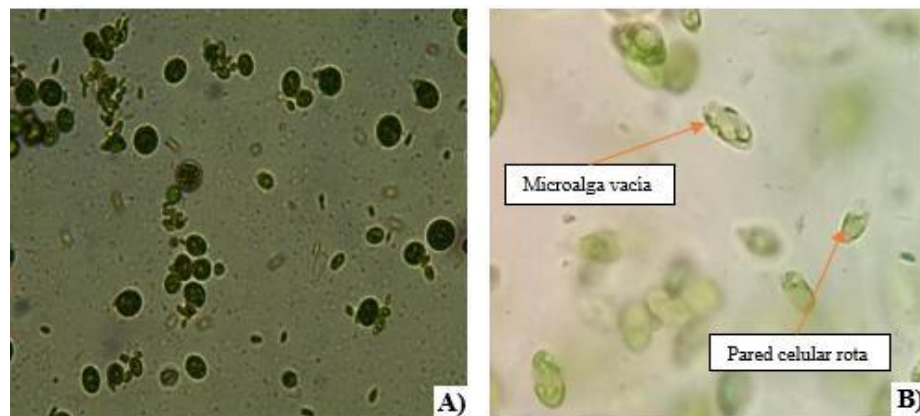


Figura 18. *Chlamydomonas agloiformis*, vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.

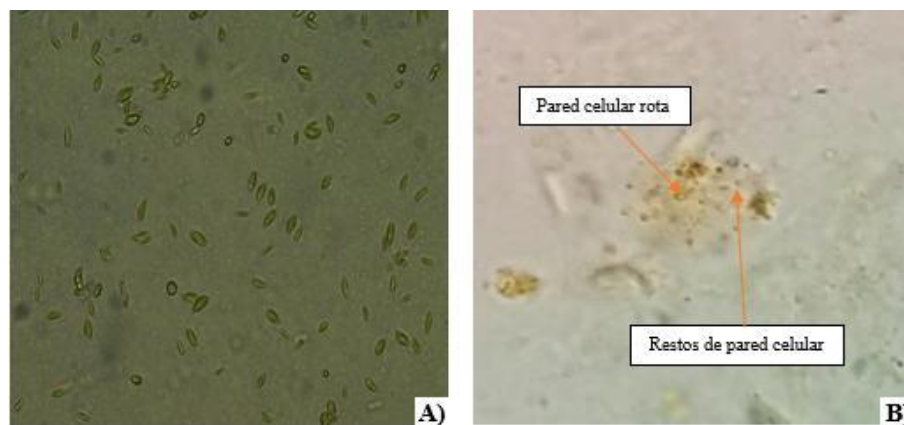


Figura 19. *Pectinodesmus pectinatus*, vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.

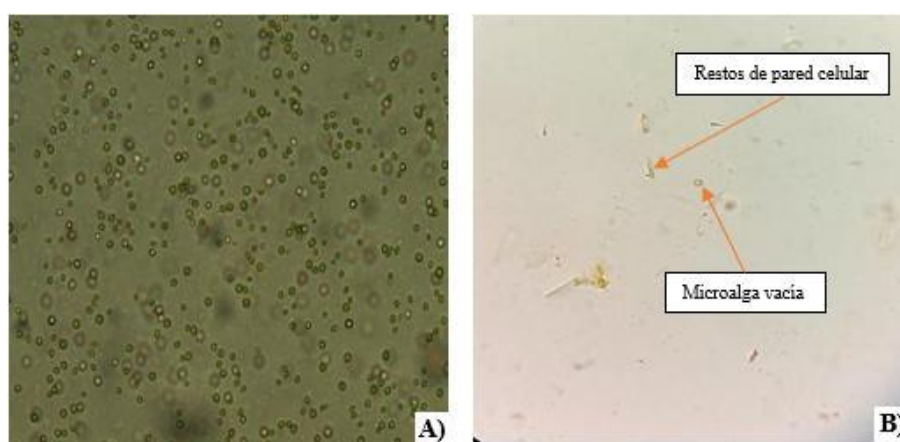


Figura 20. *Ettlia pseudoalveolaris*, vista bajo el microscopio a 40X. A) Antes de la sonicación; B) Después de la sonicación.

Algo interesante que se logró observar, fue que ciertas microalgas presentaban daño en su pared celular (microalgas vacías) (Figura 18), mientras que otras evidenciaban una completa desintegración de la célula (restos de pared celular) (Figura 19; Figura 20). Alhattab et al., (2019), y Singh et al., (2022), reportan que la variedad en la composición de la pared celular, que generalmente son polisacáridos como celulosa, xilano, proteoglicanos, o algaenan (presente en la clase *Chlorophyceae*), determinará su resistencia a impactos químicos, mecánicos, o enzimáticos (Skorupskaite et al., 2019); por lo que al evidenciarse visualmente que *C. agloiformis* conservó en ciertas células parte de su estructura, parece ser que esta microalga posee en su pared celular una mayor cantidad de estos compuestos.

4.3 Identificación de patógenos a partir de tejidos de tilapia

Se obtuvieron en total 10 microorganismos puros aislados a partir de los tejidos de tilapia (Anexo 13), entre las cuales se obtuvieron bacterias Gram (+) (*Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus equorum*), Gram (-) (*Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *Klebsiella pneumoniae*), y un hongo (*Candida albicans*) (Tabla 6; Anexo 14).

Tabla 6.

Microorganismos identificados taxonómicamente por espectrometría de masas MALDI TOF.

Nº	Código de Muestra	Microorganismo	Porcentaje de Identificación (%)
1	T1-R3-Rs (1.1)	<i>Aeromonas</i> sp.	93.00
2	T1-R3-Col (1.2)	<i>Aeromonas</i> sp.	90.00
3	T1-R3-Lech (1.3)	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99.90
4	T1-Cbr2-Rs1	<i>Aeromonas</i> sp.	93.10
5	T2-O1-Rs1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	93.50
6	T2-R1-Rs1	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99.90
7	T2-Cbr1 (1)(N)	<i>Candida albicans</i>	90.10
8	T2-Cbr1 (1)(B)	<i>Staphylococcus aureus</i>	99.90
9	T2-Cbr1 (2) (N)	<i>Staphylococcus equorum</i>	90.40
10	T2-Cbr2-Rs1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99.90

Estos microorganismos aislados están considerados como patógenos en la tilapia (Abdel-Latif et al., 2020), esto se debe a que, según Thai Agricultural Standard, (2010), las tilapias se encuentran a merced de varios patógenos en su entorno de desarrollo, debido a las malas prácticas durante las etapas de crianza del pez. Entre las muestras aisladas no se encontró la presencia de estreptococos, por lo que se decidió usar la especie *Streptococcus agalactiae*, previamente aislada en el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte.

Las muestras identificadas presentaron un porcentaje de identificación mayor o igual al 90 %, lo cual según Schumann y Maier, (2014), indica un alta probabilidad de similitud entre el espectro generado por estas muestras, con el espectro almacenado en la base de datos del equipo planteado. La rapidez de esta técnica y fiabilidad del espectro de proteínas de 16S rARN, demuestra que, según Assis et al., (2017), la técnica puede ser usada para el diagnóstico rápido de enfermedades en peces dentro de un laboratorio, pues incluso pueden brindar información sobre el perfil de susceptibilidad del agente etiológico, permitiendo emplear tratamientos de control en el caso de estos cultivos.

Los microorganismos identificados por espectrometría de masas MALDI TOF, coinciden con otros estudios, donde ya se han reportado estos microorganismos como patógenos en la tilapia, siendo estos: *Aeromonas* sp., que de acuerdo a Adeniyi et al., (2020) y Megahed, (2020), son causantes de aeromoniasis; *Plesiomonas shigelloides* por Preena et al., (2020); *K. pneumoniae* por Shameem et al., (2021); *S. aureus* y *S. equorum* en estudios de Razek, (2019); y *C. albicans* por Samah Oda et al., (2016). Cabe señalar que en estudios realizados por Rao et al., (2021) y Wamala et al., (2018), resultados similares se obtuvieron, pues también se logró aislar a más de un patógeno a la vez a partir de tilapias enfermas (*Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Plesiomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Solibacillus*, y *Exiguobacterium*), determinando la presencia de una coinfección bacteriana ligada a factores ambientales, o técnicas de cultivo; lo cual es una de las posibles causas de que en el presente estudio se hayan aislado varios de estos patógenos en las tilapias enfermas.

Por otro lado, no en todos los cultivos se logró aislar colonias puras, puesto que de acuerdo con la naturaleza de los microorganismos, estos llegan a desarrollarse en un consorcio microbiano, en el cual se forman relaciones o dependencias entre individuos, llegando así a crearse biopelículas (Li et al., 2020); por lo tanto el buscar aislar un patógeno específico causante de estreptococosis en tilapias enfermas, presenta complicaciones, pues al parecer la coinfección bacteriana que mostraban estos peces, implicó que varias colonias de microorganismos crezcan en el medio de cultivo (Ray et al., 2020).

Los organismos aislados en este estudio, a pesar de ser patógenos en cultivos acuícolas, posiblemente no se encuentren ligados a brotes epidemiológicos en el país, incluyendo estreptococos, pues según la Cámara Nacional de Acuicultura, (2017), no se han reportado aún brotes de patógenos que puedan ser considerados letales para la producción de tilapia, como lo son el SHB (Conroy, 2010), pseudomoniasis (Eissa et al., 2010) o estreptococosis (Osman et al., 2017); por lo tanto los patógenos encontrados en estos peces, deben estar asociados más a las prácticas de cultivo empleadas en el sitio de muestreo.

A pesar de no haber aislado *Streptococcus* sp., los microorganismos identificados, como *Aeromonas* sp., *K. pneumoniae*, *P. shigelloides*, *S. aureus*, *S. equorum*, y *Candida albicans*, son patógenos para la tilapia (Razek, 2019; Megahed, 2020; Preena et al., 2020; Samah Oda, 2016; Shameem M. et al., 2021), resultado

interesante, pues según Abdel-Latif et al., (2020), una coinfección bacteriana desencadena la susceptibilidad a los patógenos presentes en el ambiente durante el cultivo de estos peces. Por lo tanto, estas patologías deberían ser tratadas como una enfermedad provocada por varios patógenos, pues las tilapias seleccionadas presentaron cuadros sintomatológicos relacionados a enfermedades como SHB, y Aeromoniasis (Abdel-Latif et al., 2020), mismas que al presentarse simultáneamente en estos cultivos, dificultan un diagnóstico adecuado, ya que se debe tomar en cuenta a los patógenos implicados en la coinfección (Rao et al., 2021).

Los peces enfermos seleccionados presentaban cuadros sintomatológicos reportados en una infección por estreptococos en peces, como nado errático, exoftalmia, y palidez en escamas (Anshary et al., 2014), sin embargo la ausencia del agente causal de estreptococosis, está ligada a la similitud sintomatológica que existe con otro tipo de enfermedades como SHB, aeromoniasis, pseudomoniasis, o micobacteriosis (Abdel-Latif et al., 2020; Osman et al., 2017), con lo que la selección de las tilapias pudo llegar a ser muy ambigua, aunque según Ye et al., (2011), los síntomas más típicos de estreptococosis en tilapias son: ojos saltones, hemorragia en branquias y nado errático, sin embargo esto no asegura su correcta selección.

La especie *S. agalactiae* seleccionada, se ha reportado como el agente etiológico comúnmente identificado en la estreptococosis en tilapias y otro tipo de peces de interés comercial como el salmón, o la trucha (Chen et al., 2015; Oliveira et al., 2018; Mian et al., 2009), por lo que, emplear esta especie de estreptococo en ensayos de actividad antimicrobiana, pudo llegar a brindar datos interesantes que pueden ser enfocados en posteriores investigaciones.

A pesar de que el estreptococo usado en los ensayos no se aisló del huésped esperado, estudios realizados por Chu et al., (2016), y Pereira et al., (2010), confirman que las posibles variaciones genéticas entre aislados de *S. agalactiae* (subespecies), a partir de diferentes huéspedes como humanos, vacas o peces; no es un requisito previo para que este cruce la barrera específica de infección del huésped, pues un patógeno aislado de un animal específico, puede llegar a infectar a otro organismo de características distintas; de modo que, la cepa del laboratorio empleada (*S. agalactiae*), podría brindar importante información en tilapias.

4.4 Actividad antimicrobiana de extractos de microalga

Las especies de las microalgas *C. agloeformis*, *P. pectinatus*, y *E. pseudoalveolaris*, exhibieron una actividad antibacteriana frente al patógeno *S. agalactiae*.

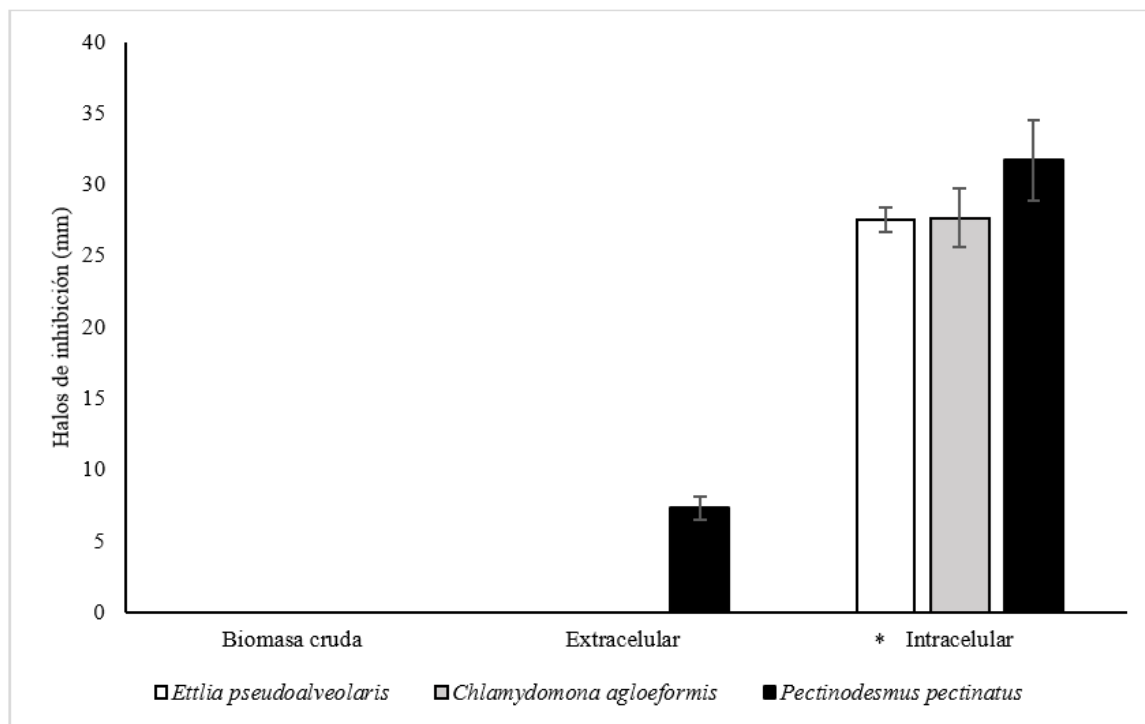


Figura 21. Ensayos de bioactividad con los extractos de microalgas.

Se determinó el mejor extracto de microalga entre los tres extractos evaluados mismos que demostraron tener diferencias estadísticamente significativas ($F=625.94$; $gl=2$; $p<0.01$), donde se observó que el extracto intracelular tiene los mejores resultados con un promedio de 19.74 mm en los halos de inhibición, en comparación con los extractos extracelular (2.44 mm) y crudo; siendo este último el único que no presentó actividad antimicrobiana en ninguna de las especies de microalga frente a *S. agalactiae* (Figura 21).

En el estudio realizado por Tavakoli et al., (2021), se obtuvieron resultados similares al evaluar los extractos internos de microalgas obtenidos por sonicación, frente a patógenos como *Pseudomonas putida*, *Shewanella putrefaciens*, y *Aeromonas rivipollensis*; donde se atribuyó su bioactividad a los altos niveles de polifenoles (antioxidante); sin embargo la acción antimicrobiana dependerá mucho del patógeno y especie de microalga, pues hay que considerar que el contenido interno de las microalgas es único en su contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, carotenoides, y

vitaminas (Timira et al., 2021). De acuerdo con esto, no solamente los pigmentos como polifenoles son los únicos responsables de la actividad antimicrobiana en microalgas, pues mayormente se han reportado a los ácidos grasos (linoleico, oleico, docohexaenoico, eicosapentaenoico) como los principales metabolitos que actúan frente a bacterias patógenas (Alsenani et al., 2020).

De acuerdo con Falaise et al., (2016), rara vez se encuentran componentes antimicrobianos en un medio acuoso, pues estos generalmente suelen ser hidrofóbicos, y necesitan de ciertas técnicas para ser extraídos de la microalga; esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el extracto extracelular al estar compuesto de agua, fue uno de los que menor actividad antimicrobiana mostró; por otra parte, los componentes internos de la célula (extracto intracelular) siendo mayormente hidrofóbicos, fueron los más bioactivos, pues según Amaro et al., (2011), el contenido interno de la microalga posee una variedad de compuestos antimicrobianos como: ácidos grasos de cadena corta, de cadena larga, saturados, insaturados o polinsaturados, y pigmentos como clorofilas o β -carotenos.

A pesar de que se obtuvieron buenos resultados con el extracto intracelular, existen otros métodos, con las cuales se pudo obtener un extracto más “puro”, pues en el presente ensayo se usó todo el contenido intracelular de la microalga, mas no un componente específico de este, lo cual genera ciertas incertidumbres a la hora de atribuir la actividad antimicrobiana a algún compuesto en concreto (Falaise et al., 2016); en ese caso resultaría interesante optar por otras técnicas posteriores a la ruptura celular, como es el uso de solventes orgánicos como etanol, para extracción de pigmentos como clorofila *a* y *b* (Tavakoli et al., 2021); extracción con líquido iónico para obtener lípidos o carbohidratos (Tan et al., 2020); o extracción por fluido supercrítico, para carotenoides (Morcelli et al., 2021).

Por otra parte, se realizó en análisis ANOVA para determinar la mejor especie de microalga que presentó los mayores halos de inhibición promedio de sus extractos. Encontrando que existen diferencias significativas ($F=34.43$; $gl=2$; $p<0.01$), entre la microalga *P. pectinatus*, respecto a las especies *C. agloiformis* y *E. pseudoalveolaris*. La especie *P. pectinatus*, alcanzó un promedio de 13.01 mm en sus halos de inhibición, incluso siendo la única que presentó una actividad antimicrobiana en dos de sus tres extractos evaluados (intracelular y extracelular); por otro lado, no se encontraron diferencias entre las especies *C. agloiformis* y *E. pseudoalveolaris*, mismas que

presentaron bioactividad antimicrobiana solamente en uno de sus extractos evaluados (intracelular).

Aunque las condiciones de cultivo fueron las mismas para todas las microalgas, los extractos intra y extracelular de *P. pectinatus*, mostraron los mejores resultados, en comparación con las especies *C. agloiformis*, y *E. pseudoalveolaris*. De acuerdo a Alsenani et al., (2020), los principales responsables de la actividad antimicrobiana en microalgas son ácidos grasos y pigmentos, siendo posible que *P. pectinatus*, posea una mayor cantidad de estos compuestos, pues previas investigaciones han encontrado que el género *Pectinodesmus* sp. produce lípidos (ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, eicosanoico) y pigmentos (luteína) en mayores cantidades que otras microalgas (Huang, 2020; Samadhiya et al., 2021).

De acuerdo con Huang, (2020), la producción de lípidos está relacionada principalmente a un alta concentración de Carbono en relación al Nitrógeno, pues esto aumenta la producción de glucosa, la cual en su metabolismo produce mayores cantidades de ATP, NADPH, y acetyl CoA, que intervienen en la biosíntesis de ácidos grasos y lípidos. Esto pudo haber incidido en que *P. pectinatus* haya mostrado mayor actividad antimicrobiana, pues en el presente estudio, la buena distribución del CO₂ en el FBR, y un estrés debido a una baja concentración de Nitrógeno en el medio de cultivo, influyeron en la producción de lípidos. Sin embargo, aún queda identificar el tipo de compuesto que actúa durante la inhibición bacteriana, por lo que es necesario implementar técnicas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), para determinar los componentes químicos presentes en estos extractos (Alsenani et al., 2020 y Pérez et al., 2021).

Los ensayos de bioactividad con los extractos de microalga frente a *S. agalactiae*, demostraron que, de acuerdo con la prueba de Tukey, el tratamiento 9 fue el mejor en comparación con los demás tratamientos, siendo este el del extracto intracelular de la especie *P. pectinatus* (F=470.95; gl=8; p<0.01), y el cual mostró un halo de inhibición con un diámetro promedio de 31.71 ± 2.81 mm (Figura 22).

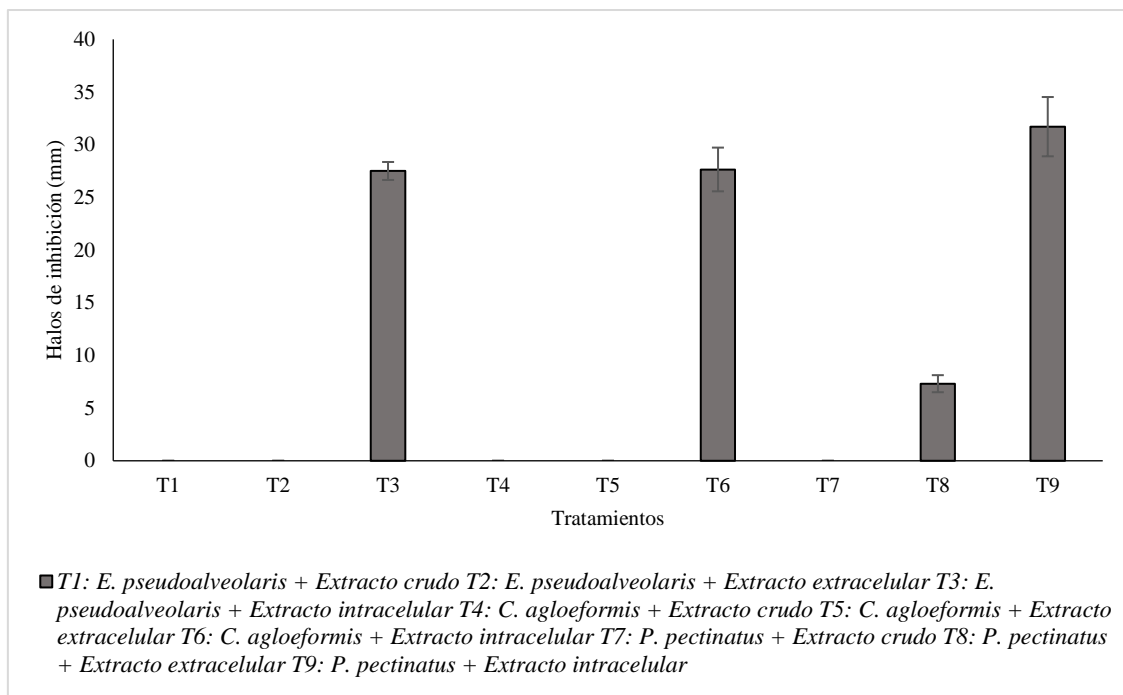


Figura 22. Tratamientos usados en los ensayos de bioactividad.

Diversos estudios ya se han reportado en la actividad antimicrobiana de microalgas frente a *Streptococcus* sp., con las especies *Chlorella* spp. (Falaise et al., 2016, y Michelon et al., 2021); *Tetraselmis suecica*, *Chlorococcum humicola* y *S. platensis* (Maadane et al., 2017); comprobando así que los extractos de microalga poseen bioactividad frente a estas bacterias Gram (+), esto concuerda con los resultados de actividad antimicrobiana observados en la presente investigación, pues *S. agalactiae* (Gram +), fue susceptible al menos a un tipo de extracto de las especies de microalgas empleadas en los ensayos. De acuerdo a Tavakoli et al., (2021), el contenido bioactivo de las microalgas comprende ácidos grasos y pigmentos, los cuales destruyen la integridad de la membrana celular de las bacterias, siendo más resistentes las Gram (-), pues estas se componen de una capa celular adicional a diferencia de las Gram (+).

El mecanismo de acción de estos compuestos, principalmente de ácidos grasos y pigmentos, aún no ha sido determinado con exactitud, sin embargo se cree que interfieren con el proceso de biosíntesis de los ácidos grasos bacterianos, llegando a provocar una fisura en su membrana, o una interrupción en la ingesta de nutrientes (Alsenani et al., 2020), incluso estos metabolitos pueden llegar a tener una acción sinérgica, llegando a afectar las proteínas y enzimas de la membrana celular bacteriana (Shaima et al., 2021). A pesar de esto no se pueden descartar otro tipo de metabolitos como aminoácidos Michelon et al., (2021), o incluso péptidos (Scyptolin A y B), los

cuales son más específicos al inhibir enzimas determinadas, como la transpeptidasa, involucrada en la síntesis de la membrana celular bacteriana (Rojas et al., 2020).

En el caso de los ácidos grasos Dvoretzky et al., (2019), menciona que los ácidos grasos están directamente relacionados con la actividad peroxidasa, la cual causa un estrés oxidativo por la peroxidación de ácidos grasos insaturados; Cortés et al., (2009), encontró que ácidos grasos como, linolénico, oleico, y palmitoleico, provocan un daño en la membrana lipídica de los microorganismos, pues durante el estrés oxidativo las colas hidrofóbicas que componen las membranas bacterianas sufren un daño comprometiendo su estabilidad. El extracto intracelular de *P. pectinatus*, puede haber tenido este mecanismo de acción pues la presencia de estos compuestos se han reportado en el género *Pectinodesmus* (Huang, 2020; Samadhiya et al., 2021).

Bouhleb et al., (2021), y Ghannam, (2016), reportan al β -caroteno y luteína como los compuestos con mayor bioactividad (antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, y antiviral), incluso Grubisi, (2022), señala que las microalgas dentro del filo clorófitas, como es el caso de *C. agloiformis*, *P. pectinatus*, y *E. pseudoalveolaris*, suelen presentar una mayor cantidad de luteína. De acuerdo con Mitra et al., (2021); y Criss, (2017), aún no se sabe con exactitud el mecanismo de acción de estos pigmentos, pero se cree que la luteína y β -caroteno inducen la acumulación de lisozima, una enzima antibacteriana que digiere la pared celular de los patógenos. *P. pectinatus* pudo haber presentado una mayor cantidad de luteína, pues según Gong, (2020), este género generalmente posee una mayor cantidad de dicho pigmento.

Adicionalmente se construyeron las curvas de absorbancia vs concentración de extracto (Figura 23), así como la presencia o ausencia de crecimiento en placa (Anexo 17), para determinar CMI y CMB, para los extractos que presentaron una propiedad antibacteriana durante los ensayos de inhibición. Adicionalmente, se realizó un análisis de la varianza ANOVA, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones usadas en *E. pseudoalveolaris*/Extracto intracelular ($F=118.28$; $gl=4$; $p<0.01$); *C. agloiformis*/Extracto intracelular ($F=1309.82$; $gl=4$; $p<0.01$); *P. pectinatus*/ Extracto intracelular ($F=33871.91$; $gl=5$; $p<0.01$); y *P. pectinatus*/ Extracto extracelular ($F=367.55$; $gl=4$; $p<0.01$).

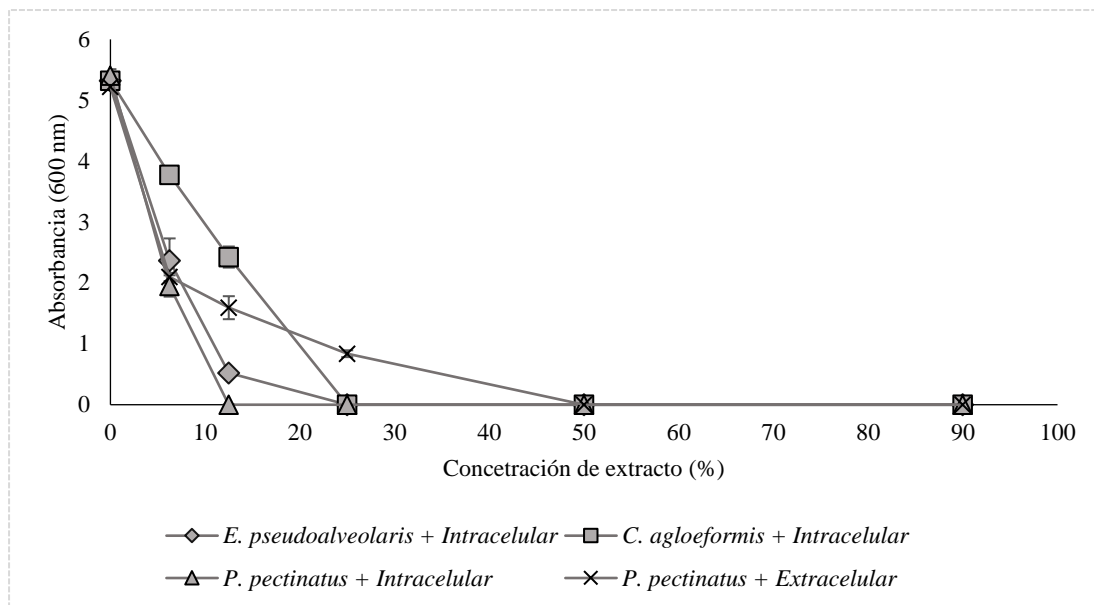


Figura 23. Curva de Absorbancia vs Concentración de extracto de microalga.

Al igual que en los ensayos de bioactividad realizados anteriormente, el extracto intracelular de *P. pectinatus* presentó los mejores resultados, con una CMI=12.5%-6.25%, y una CMB=12.5%, en comparación con las especies *C. agloiformis* (CMI=25%-12.5%; CMB=25%), y *E. pseudoalveolaris* (CMI=25%; CMB=50%); por otra parte el único extracto diferente al intracelular evaluado fue, el extracto extracelular en *P. pectinatus*, sin embargo este mostró la más alta CMI (50%) y CMB (90%) frente a *S. agalactiae* (Anexo 17); el extracto crudo no fue evaluado, pues este no presentó actividad antimicrobiana durante los ensayos de Kirby Bauer

Es importante señalar que ya se han realizado estudios con microalgas frente a patógenos Gram (+), tal como los reportados por Michelon et al., (2021), en los que se observó que *Chlorella* spp., presentó CMI, sin embargo esta no llegó a presentar CMB, contra especies como *Staphylococcus hyicus*, *Enterococcus faecalis*, y *Streptococcus suis*. Alsenani et al., (2020), menciona que la acción bacteriostática o bactericida de las microalgas puede estar ligada al contenido de ácidos grasos y carotenoides, pero se requieren más estudios para entender la interacción entre el patógeno y el compuesto de la microalga.

No hay que pasar por alto que el patógeno usado en este estudio fue una bacteria Gram (+), pues estas suelen ser más susceptibles a compuestos antibacterianos o antibióticos (Alsenani et al., 2020), lo cual de acuerdo con Exner et al., (2017), influye en la actividad bacteriostática y bactericida, pues las bacterias Gram (-) poseen una

membrana externa adicional que actúa como un protector contra toxinas o antibióticos, siendo capaz de detectar señales externas de compuestos que pueden destruir la célula, por lo que estas suelen ser más resistentes y es posible que necesiten de CMI más altas, o incluso lleguen a ser totalmente resistentes al tipo de extracto de microalga empleado (Shaima et al., 2021).

Los resultados obtenidos con *P. pectinatus* sobre su CMI y CMB, sugieren que esta microalga puede estar encaminada a posteriores estudios, donde se busque tratar y prevenir los daños causados en los peces infectados con *Streptococcus sp.*, pues en previas investigaciones realizadas por (Siringi et al., 2021), se empleó con éxito la biomasa de *Spirulina platensis*, para mejorar el crecimiento y salud en cultivos de tilapias (*O. niloticus*). Adicionalmente Chen et al., (2021), resalta el uso de las microalgas como alimento en la industria acuática, pues estas presentan beneficios en el crecimiento, respuesta inmune, y resistencia a enfermedades en distintas especies acuáticas de interés comercial.

CAPITULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- A partir de las especies de microalgas: *Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*, se logró obtener los extractos, intracelular, extracelular, y el extracto crudo. La microalga que obtuvo un mayor rendimiento de biomasa fue *Ettlia pseudoalveolaris*, la cual muestra ser la más apropiada de las tres especies estudiadas, para la producción de biomasa.
- El método de ruptura celular por sonicación en microalgas permite la obtención de metabolitos internos de interés bioactivo, ya que la cuantificación de carbohidratos demuestra la liberación de este compuesto contenido por la microalga.
- No se encontró *Streptococcus* sp., en las muestras de tilapias enfermas tomadas en el Paradero Ecoturístico ubicado en Lita. Sin embargo, los microorganismos patógenos aislados en estas tilapias evidencian la presencia de aeromoniasis, síndrome de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), y contaminación por hongos en los estanques de este lugar.
- Las microalgas *Chlamydomona agloiformis*, *Pectinodesmus pectinatus*, y *Ettlia pseudoalveolaris*, poseen una actividad antimicrobiana frente al patógeno causal de la estreptococosis en la tilapia (*S. agalactiae*), siendo el extracto intracelular el que presenta una mayor capacidad antimicrobiana.
- El extracto intracelular de *P. pectinatus* presenta el mayor potencial antibacterial frente a *S. agalactiae*; lo cual indica que esta microalga puede ser usada potencialmente en el control y prevención de la estreptococosis en tilapias.

5.2 Recomendaciones

- Se podría implementar la medida del peso seco, en el estudio de parámetros cinéticos, de manera que se pueda analizar el crecimiento de las células en base al pesado de la biomasa seca dentro de un periodo de tiempo, estos datos serían otra buena forma de analizar el crecimiento de microalgas.
- En el tiempo de medir los parámetros para la curva de crecimiento, se sugiere realizarlos todos los días, incluidos fines de semana, esto para obtener la mayor cantidad de datos posibles, lo cual ayudará a evidenciar mejor el crecimiento a la hora de graficar estos datos.
- Tomar en cuenta que la constante toma de muestra de los fotobiorreactores puede llegar a generar contaminaciones en el cultivo, por lo que es necesario realizar una microscopia durante este tiempo de muestreo, para así descartar la presencia de cualquier tipo de hongo o bacteria.
- Mantener una intensidad lumínica constante, evitando mover de su punto inicial a los fotobiorreactores, pues el variar su posición influirá en su crecimiento, debido a que la intensidad lumínica varía en cada punto donde se encuentre el fotobiorreactor.
- Priorizar la adaptación de cepas de microalgas que sean más sensibles a los cambios en su medio de cultivo, esto ayudará a que se desarrollen mejor al momento de montarlas en un fotobiorreactor con un medio de formulación distinta.
- Estudiar diferentes medios y condiciones de cultivo para la producción de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos en microalgas (compuestos intervienen en la actividad antimicrobiana). De esta manera se podría aprovechar el potencial de estos microorganismos fotosintéticos en el estudio del control de organismos patógenos.
- Se debería realizar estudios sobre la incidencia de la luz en la producción de biomasa microalgal, pues no existen rangos de fotoinhibición establecidos que puedan ayudar a conocer la cantidad luminosa requerida para estas microalgas.
- Implementar la identificación de compuestos orgánicos en estas microalgas, con el fin de obtener su perfil fitoquímico, lo cual se puede lograr mediante técnicas

de cuantificación de carbohidratos con el método de Dubois, proteínas con el método de Bradford, o identificación de lípidos mediante una cromatografía de capa fina.

- Optar por el uso de solventes como hexano, o metanol, para la obtención de fracciones específicas de las microalgas, de manera que estos datos ayuden a explicar qué tipo de metabolitos pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana de acuerdo con cada especie de microalga.
- Desarrollar protocolos de aislamiento enfocados en el proceso de selección del pez, procurando hacer énfasis en criterios de sintomatología que permitan diferenciar las distintas enfermedades causales de cada patógeno que afectan a este tipo de cultivos.
- Los patógenos de tilapia encontrados en el presente estudio, pueden generar nuevos temas de investigación, enfocándose en áreas como: el nivel de incidencia de los patógenos en otros sitios comerciales, las causas de contaminación en cultivos acuícolas, y coinfección bacteriana como detonante para el desarrollo de una enfermedad.
- Mejorar las prácticas de manejo que se llevan a cabo durante la crianza en los estanques de tilapia, ya que estas podrían estar ligadas en la incidencia de varias infecciones que se han identificado en estos cultivos.
- El método para identificación de estreptococos mediante histopatología puede llegar a ser implementado en los protocolos de aislamiento, pues este ayuda a identificar directamente a partir de cortes del tejidos del pez enfermo las lesiones causadas por estos patógenos, y las cuales pueden ser vistas bajo el microscopio.
- Implementar un protocolo para la identificación molecular de la especie mediante el método de PCR, enfocado en la amplificación del gen 16S ARNr, pues esta reemplaza a las pruebas bioquímicas, mismas que pueden demandar más tiempo en comparación con pruebas moleculares.
- Como un monitoreo rápido se puede optar por pruebas fenotípicas de identificación de especie de origen comercial, como las pruebas API 20, la cual consta de pruebas bioquímicas rápidas, que ayudarán a agilizar el proceso de caracterización del patógeno.

- Realizar investigaciones orientadas a la coinfección bacteriana con las especies patógenas aisladas en este estudio, las cuales pueden ser útiles para el desarrollo de pruebas *in vivo* en peces, ampliando así esta línea de investigación.
- Investigar el mecanismo de aplicación de microalgas, orientado al tratamiento preventivo y de control en los estanques donde exista la presencia de patógenos causantes de enfermedades que afecten al desarrollo y venta del pez.

REFERENCIAS

- Abad, C. Q. (2019). *Tilapia en Ecuador : paradoja entre la producción acuícola y la protección de la biodiversidad ecuatoriana and the protection of Ecuadorian biodiversity* *Introducción*. 26(4), 543–550.
- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Menanteau-Ledouble, S., & El-Matbouli, M. (2020). The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*, 43(6), 651–664. <https://doi.org/10.1111/jfd.13164>
- Abdel-Razek, N. (2019). Antimicrobial activities of chitosan nanoparticles against pathogenic microorganisms in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 27(5), 1315–1330. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00388-0>
- Abu-Elala, N. M., Abd-Elsalam, R. M., & Younis, N. A. (2020). Streptococcosis, Lactococcosis and Enterococcosis are potential threats facing cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquaculture Research*, 51(10), 4183–4195. <https://doi.org/10.1111/are.14760>
- Abu-Elala, N. M., Samir, A., Wasfy, M., & Elsayed, M. (2019). Efficacy of Injectable and Immersion Polyvalent Vaccine against Streptococcal Infections in Broodstock and Offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 88, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042>
- Acuña, R. (2004). Cómo fabricar un biorreactor artesanal para la macropropagación de brotes organogénicos de tejidos vegetales con componentes de catálogo. *Revista Tecnología En Marcha*, 17(1), 92–96.
- Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., & Chemat, F. (2012). “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresource Technology*, 114, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096>
- Adeniyi, O. V., Olaifa, F. E., & Emikpe, B. O. (2020). Effects of dietary tamarind pulp extract on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Applied Aquaculture*, 00(00), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10454438.2020.1785984>
- Albuja, R. F., Araujo, P. A., & López, A. C. (2011). *Obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de Spirulina platensis, mediante degradación anaerobia*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5015/2/T-ESPE-033046-A.pdf>
- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., & Brooks, M. S. L. (2019). Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 61–88. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1560-9>
- 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>
- Alvarado, J. L., Ruiz, W., & Moncayo, E. (2016). *Offshore Aquaculture Development in*

Ecuador. 1(1), 1–6.

- Álvarez, J. D., Agurto, C. P., Álvarez, A. M., & Obregón, J. (2004). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Revista Científica*, XIV(6), 0. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95914602>
- Alvarez, N., Fernando, L., Esther, C. P., Elías, L., Antonio, J., López, V., Manuel, J., Rodríguez, N., & Antonio, J. (2016). Growth kinetic of the microalgae *Chaetoceros muelleric* in a photobioreactor. *Biotecnia*, 19(3), 14–18.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Antimicrobial activities of microalgae : an invited review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 1272–1280.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques* (1st Editio). Academic Press.
- Ansari, F. A., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2018). Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. *Journal of Cleaner Production*, 182, 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.098>
- Anshary, H., Kurniawan, R. A., Sriwulan, S., Ramli, R., & Baxa, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-627>
- Antonopoulou, S., Nomikos, T., Oikonomou, A., Kyriacou, A., Andriotis, M., Fragopoulou, E., & Pantazidou, A. (2005). Characterization of bioactive glycolipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 140(2), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.10.006>
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., & Farias, W. R. L. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102(8), 5248–5250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.089>
- Arguello. (2020). *Campus Omar Dengo Heredia*.
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento*. July 2014, 10. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Assis, G B N, Tavares, G. C., Pereira, F. L., Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2017). Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 40(1), 51–63. <https://doi.org/10.1111/jfd.12493>
- Assis, Gabriella B.N., Pereira, F. L., Zegarra, A. U., Tavares, G. C., Leal, C. A., & Figueiredo, H. C. P. (2017). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01492>
- Banerjee, S., Dasgupta, S., Das, D., & Atta, A. (2020). Influence of photobioreactor configuration on microalgal biomass production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(8), 1487–1497. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02342-4>

- Bardales Grández, K. M., León Vargas, F. R., Grández Ruiz, M., & Jara Herrera, C. (2020). Influencia del nitrógeno en el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. (alga verde). *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 8(2), 141–150. <https://doi.org/10.22386/ca.v8i2.293>
- Barona, A. (2014). *Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga Chlorella extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato*. 111. http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8452/1/BQ_53.pdf
- Benavente, Montañez, Aguilar, Méndez, & Valdivia. (2012). Tecnología De Cultivo De Microalgas En Fotobiorreactores. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 12.
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., & Dall'Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: The potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
- Berenice, J. (2012). Bioprospección de la actividad antimicrobiana y biotóxica de extractos de cianobacterias y microalgas. *Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México. Obtenido de Http://:Www.Biblioteca.Cicese.Mx*, 16–17, 23–33.
- Bishop, E. J., Shilton, C., Benedict, S., Kong, F., Gilbert, G. L., Gal, D., Godoy, D., Spratt, B. G., & Currie, B. J. (2007). Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. *Epidemiology and Infection*, 135(8), 1248–1255. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008515>
- Boaden, E. E. (2011). *Determinación de parámetros biológicos de la microalga Isochrysis aff. galbana: comparación de un fotobiorreactor continuo versus un cultivo batch* (Issue July). Universidad Austral de Chile.
- Bocanegra-García, V., Del Rayo Camacho-Corona, M., Ramírez-Cabrera, M., Rivera, G., & Garza-Gonzalez, E. (2009). The bioactivity of plant extracts against representative bacterial pathogens of the lower respiratory tract. *BMC Research Notes*, 2, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-95>
- Boffill-Rodríguez, Y., García-Rodríguez, A., & Castellanos-Estupiñan, J. (2012). Preliminary quantitative estimate production rates of microalgal biomass from the reaction of photosynthesis. *Tecnología Química*, 32(1), 31–41.
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In R. Osinga, J. Tramper, J. G. Burgess, & R. H. B. T.-P. in I. M. Wijffels (Eds.), *Marine Bioprocess Engineering* (Vol. 35, pp. 313–321). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). *Algae for Biofuels and Energy*.
- Bouhleb, Z., Arnold, A. A., Deschênes, J. S., Mouget, J. L., Warschawski, D. E., Tremblay, R., & Marcotte, I. (2021). Investigating the action of the microalgal pigment marennine on *Vibrio splendidus* by in vivo 2H and 31P solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1863(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2021.183642>

- Bradley, J. E., & Jackson, J. A. (2008). Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. In *Parasitology* (Vol. 135, Issue 7, pp. 807–823). <https://doi.org/10.1017/S0031182008000322>
- Brochet, M., Couvé, E., Zouine, M., Vallaëys, T., Rusniok, C., Lamy, M.-C., Buchrieser, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., Poyart, C., & Glaser, P. (2006). Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes and Infection*, 8(5), 1227–1243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.010>
- Bromage, E. S., Thomas, A., & Owens, L. (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(3), 177–181. <https://doi.org/10.3354/dao036177>
- Cámara Nacional de Acuicultura. (2017). *No existen reportes de mortalidad por enfermedad de la tilapia de cultivo*. Cámara Nacional de Acuicultura. <https://www.cna-ecuador.com/camara-nacional-de-acuicultura-aclara-que-no-existen-reportes-de-mortalidad-por-enfermedad-de-la-tilapia-de-cultivo/>
- Camarena-Bernard, C., & Rout, N. P. (2018). Native microalgae from eutrophic water: Potential for wastewater treatment, low-cost biomass, and lipid production. *Industrial Biotechnology*, 14(5), 257–264. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0009>
- Cannell, R. J. P., Owsianka, A. M., & Walker, J. M. (1988). Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *British Phycological Journal*, 23(1), 41–44. <https://doi.org/10.1080/00071618800650051>
- Canonico, G. C., & Arthington, A. (2005). *The effects of introduced tilapias on native biodiversity*. 483(July 2004), 463–483. <https://doi.org/10.1002/aqc.699>
- Cao, J., Liu, Z., Zhang, D., Guo, F., Gao, F., Wang, M., Yi, M., & Lu, M. (2022). Distribution and localization of *Streptococcus agalactiae* in different tissues of artificially infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 546(December 2020), 737370. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737370>
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., & Pinto, E. (2007). *Metabolites from algae with economical impact* ☆. 146, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007>
- Carvalho, N., Siqueira, I., & Cruz Filho, R. F. (2014). Evaluation of antimicrobial potential of leaf extract of plants collected in the UFAM campus' reserve. *BMC Proceedings*, 8(S4), 6561. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-p198>
- Castillo, L. (2001). *Tilapia roja 2001*. 6, 15–21.
- Cepas, V., López, Y., Gabasa, Y., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Correia, M. J., Santos, L. M. A., Oliveira, F., Ramos, V., Reis, M., Castelo-Branco, R., Morais, J., Vasconcelos, V., Probert, I., Guilloud, E., Mehiri, M., & Soto, S. M. (2019). Inhibition of bacterial and fungal biofilm formation by 675 extracts from microalgae and cyanobacteria. *Antibiotics*, 8(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020077>

- Chen, F., Leng, Y., Lu, Q., & Zhou, W. (2021). The application of microalgae biomass and bio-products as aquafeed for aquaculture. *Algal Research*, 60(August), 102541. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102541>
- Chu, C., Huang, P. Y., Chen, H. M., Wang, Y. H., Tsai, I. A., Lu, C. C., & Chen, C. C. (2016). Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0794-4>
- CLSI. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 11th ed. CLSI document M07-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.*
- CNA. (2020). *Reporte de exportaciones ecuatorianas totales*. <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Conroy, G. (2010). Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América central y del sur. *Jornadas de Acuicultura*.
- Contreras-Flores Ingeniero Bioquímico, C., Contreras-flores, C., Mario Peña-castro, J., & Bernardo Flores-cotera Rosa Olivia Cañizares-villanueva, L. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Aug*, 28(8).
- Cortés-Rojo, C., Estrada-Villagómez, M., Manzo-Ávalos, S., & Saavedra-Molina, A. (2009). Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *saccharomyces cerevisiae*. *Informacion Tecnologica*, 20(2), 71–81. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4043it.08>
- Das, B. K., Pradhan, J., Pattnaik, P., Samantaray, B. R., & Samal, S. K. (2005). Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-1555-3>
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., & De Morais, A. M. M. B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, 93(15), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>
- Delannoy, C. M. J., Crumlish, M., Fontaine, M. C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., Turnbull, J. F., & Zadoks, R. N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-41>
- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., & Smith, V. J. (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 11(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9118-5>
- Deviram, G., Mathimani, T., Anto, S., Ahamed, T. S., Ananth, D. A., & Pugazhendhi, A. (2020). Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. *Journal of Cleaner Production*, 253, 119770. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119770>
- Díaz, C. (2016). Caracterización Microbiológica. *Microbiologia*, 1–18. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-

_Caracterización_microbiológica.pdf?sequence=10%0Ahttp://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-

_Caracterizaci_n_microbiol_gica.pdf?sequence=10

- Doran, P. M. (2013). Homogeneous Reactions. In *Bioprocess Engineering Principles* (pp. 599–703). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-220851-5.00012-5>
- Dvoretzky, D., Dvoretzky, S., Temnov, M., Markin, I., Akulinin, E., Golubyatnikov, O., Ustinskaya, Y., & Eskova, M. (2019). Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites. *Chemical Engineering Transactions*, 74(June 2018), 1429–1434. <https://doi.org/10.3303/CET1974239>
- Eissa, N. M. E., Abou El-Ghiet, E. N., Shaheen, A. A., & Abbass, A. (2010). Characterization of pseudomonas species isolated from tilapia “*Oreochromis niloticus*” in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, Egypt. *Global Veterinaria*, 5(2), 116–121. <https://doi.org/10.13140/2.1.5002.4961>
- Enrique Fernandez, I. S. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general* (Primera).
- Enwereuzoh, U., Harding, K., & Low, M. (2021). Microalgae cultivation using nutrients in fish farm effluent for biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37(April), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.03.007>
- Eslava Mocha, Malagón Roza, F. J. y L.-C. (2004). Caracterización clínico patológica de la enfermedad granulomatosa de pterophyllum scalare en confinamiento. *Orinoquia*, 8(1), 34–56. <https://doi.org/10.22579/20112629.187>
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Pasnik, D. J., & Bohnsack, J. F. (2009). Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 774–776. <https://doi.org/10.3201/eid1505.080222>
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merkens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, Maria, R., Sonntag, Hans-Günther, & Trautmann, M. (2017). Antibiotic resistance : What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria ? Antibiotikaresistenz : Was ist so besonders an den Gram-negativen. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 1–24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388835/>
- Falaise, C., François, C., Travers, M., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., & Mouget, J. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine Drugs*, 1–27. <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- Falkenberg, M., Nakano, E., Zambotti-Villela, L., Zatelli, G. A., Philippus, A. C., Imamura, K. B., Velasquez, A. M. A., Freitas, R. P., de Freitas Tallarico, L., Colepicolo, P., & Graminha, M. A. S. (2019). Bioactive compounds against neglected diseases isolated from macroalgae: a review. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 797–823. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1572-5>
- FAO. (2005a). Cultured aquatic species information programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 2). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en

- FAO. (2005b). *National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Ecuador. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets.*
- FAO. (2010). Visión general del sector acuícola nacional Ecuador. *Aquaculture Management and Conservation Service (FIMA)*, 2005, 9.
- FAO. (2011). Manual básico de sanidad piscícola. In *Manual básico de sanidad*. <http://www.fao.org/3/a-as830s.pdf>
- Faria, F. C., Leal, C. A. G., Carvalho-Castro, G. A., Leite, R. C., & Figueiredo, H. C. P. (2014). Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37(9), 853–857. <https://doi.org/10.1111/jfd.12177>
- Figueroa-Torres, G. M., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2017). Kinetic modelling of starch and lipid formation during mixotrophic, nutrient-limited microalgal growth. *Bioresource Technology*, 241, 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.177>
- García, C., & Guadalupe, D. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 41–49.
- García, J. C., Klesius, P. H., Evans, J. J., & Shoemaker, C. A. (2008). Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 281(1), 151–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.028>
- Ghasemi, Y., Yazdi, M. T., Shafiee, A., Amini, M., Shokravi, S., & Zarrini, G. (2004). Parsiguine, A Novel Antimicrobial Substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology*, 42(4–5), 318–322. <https://doi.org/10.1080/13880200490511918>
- Ghittino, C. (1958). Las Estreptococosis en los peces. *America*.
- Gong, Y., & Huang, J. (2020). Characterization of four untapped microalgae for the production of lipids and carotenoids. *Algal Research*, 49(December 2019), 101897. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101897>
- González Davis, O. (2010). *Bioprospección de la Cianobacterias y Microalgas como agentes de Biocontrol contra Vibrio campbelli M1 y su uso en el cultivo de Litopenaeus vannamei*. 107.
- González-Balderas, R. M., Velásquez-Orta, S. B., Valdez-Vazquez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2020). Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus* sp. by using ultrasound or ozone. *Ultrasonics Sonochemistry*, 62, 104852. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852>
- Gouveia, L., Marques, A. E., Sousa, J. M., Moura, P., & Bandarra, N. M. (2010). Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(2), 21–37. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15884>
- Gramma, B. S., Agathos, S. N., & Jeffryes, C. S. (2016). Balancing Photosynthesis and Respiration Increases Microalgal Biomass Productivity during Photoheterotrophy on Glycerol. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(3), 1611–1618.

<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01544>

- Grubiši, M. (2022). *Bioprospecting of Microalgae Isolated from the Adriatic Sea* :
- Hayes, M. (2012). Marine bioactive compounds: Sources, characterization and applications. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (Vol. 9781461412). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2>
- He, R. Z., Xu, J., Wang, J., & Li, A. X. (2020). Quantitative detection of streptococcosis infection in dead samples of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, *129*(5), 1157–1162. <https://doi.org/10.1111/jam.14697>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *49*(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Ho, S. H., Nakanishi, A., Ye, X., Chang, J. S., Chen, C. Y., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2015). Dynamic metabolic profiling of the marine microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity Luisa Gouveia. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0226-y>
- Intervet. (2006). *Estreptococos en tilapia*. <https://thefishsite.com/articles/streptococcus-in-tilapia>
- Izabella, I. C., Mariano, E. G. A., Careli, R. T., Morais-Costa, F., De Sant’Anna, F. M., Pinto, M. S., De Souza, M. R., & Duarte, E. R. (2018). Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1351-1>
- Jiménez, Rey, A., Penagos, L., Ariza, M., Figueroa, J., & Iregui, C. (2007). *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *54*(II), 285–294. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639214004>
- Kann, S., Sao, S., Phoeung, C., By, Y., Bryant, J., Komurian-Pradel, F., Saphonn, V., Chou, M., & Turner, P. (2020). MALDI-TOF mass spectrometry for sub-typing of *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02052-7>
- Katircioglu, H., Beyatli, Y., Aslim, B., Yuksekdog, Z., & Atici, T. (2006). Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Freshwater. *Internet J Microbiol*, *2*.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *26*(4), 488–495. <https://doi.org/10.1177/1040638714534237>
- Kellam, S. J., & Walker, J. M. (1989). Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal*, *24*(2), 191–194. <https://doi.org/10.1080/00071618900650181>
- Kim, M., Kim, D., Cho, J. M., Nam, K., Lee, H., Nayak, M., Han, J. I., Oh, H. M., & Chang, Y. K. (2021). Hydrodynamic cavitation for bacterial disinfection and medium recycling for sustainable *Ettlia* sp. cultivation. *Journal of Environmental*

- Chemical Engineering*, 9(4), 105411. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105411>
- Kim, S. K., & Kang, K. H. (2011). Medicinal effects of peptides from marine microalgae. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 64). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00025-9>
- Kim, S., Kim, D., Ryu, B. G., & Chang, Y. K. (2020). Design optimization of large-scale attached cultivation of *Ettlia* sp. to maximize biomass production based on simulation of solar irradiation. *Applied Energy*, 279(April), 115802. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115802>
- Klotz, B. (2011). Aproximacion al mecanismo de inactivación de *Escherichia coli* por ondas de ultrasonido de alta intensidad. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(24), 53–68.
- Koch, Kaiser, Portilla Gil, A. A. (2010). *Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro Microalgas nativas de las Provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio [ESPE]*. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/427>
- Lara-Flores, M., Aguirre-Guzman, G., Balan-Zetina, S. B., Sonda-Santos, K. Y., & Zapata, A. A. (2014). Identification of mycobacterium agent isolated from tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 575–580. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_29
- Lecina, M., Sanchez, B., Solà, C., Prat, J., Roldán, M., Hernández, M., Bragós, R., Paredes, C. J., & Cairó, J. J. (2017). Structural changes of *Arthrospira* sp. after low energy sonication treatment for microalgae harvesting: Elucidating key parameters to detect the rupture of gas vesicles. *Bioresource Technology*, 223, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.030>
- Legario, F. S., Choresca, C. H., Turnbull, J. F., & Crumlish, M. (2020). Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Philippines. *Journal of Fish Diseases*, 43(11), 1431–1442. <https://doi.org/10.1111/jfd.13247>
- León, A. (2009). Proyecto De Factibilidad Para La Creación De Una Microempresa Dedicada Al Cultivo Y Comercialización De Tilapia -*Oreochromis* Sp- Al Mercado De Los Estado Unidos Ubicada En La Parroquia De Mindo, Cantón San Miguel De Los Bancos. In *Escuela Politécnica Nacional*. Escuela Politécnica Nacional.
- Li, N., Li, X., Shi, Z. Y., Fan, X. Y., & Zhou, Z. W. (2020). Response of high-, mid- and low-abundant taxa and potential pathogens to eight disinfection methods and their interactions in domestic hot water system. *Science of the Total Environment*, 749(100). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141440>
- Li, Y. W., Liu, L., Huang, P. R., Fang, W., Luo, Z. P., Peng, H. L., Wang, Y. X., & Li, A. X. (2013). *Short Communication Chronic streptococcosis in Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.), caused by Streptococcus agalactiae. October 2012, 1–7*. <https://doi.org/10.1111/jfd.12146>
- Little, D. C., & Hulata, G. (2000). Strategies for tilapia seed production. In *Tilapias: Biology and Exploitation* (pp. 267–326). https://doi.org/10.1007/978-94-011-4008-9_8

- López-Elías, J. A., González-Vega, R., Márquez-Ríos, E., & Torres-Arreola, W. (2015). Effect of nitrogen source and concentration to produce proteins in mass cultures of the microalgae *Chaetoceros muelleri* | Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muell.* *Phyton*, 84(2), 331–337.
- Luna, L. M. G. (2015). *Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos*. March.
- Maadane, A., Merghoub, N., El Mernissi, N., Tarik, A., Amzazi, S., Wahby, I., & Bakri, Y. (2017). Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from moroccan coastlines. In *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* (Vol. 6). <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.6.1250-1256>
- Manzoor, T., Jan, U., Shah, M., & Ahmad Ganie, S. (2014). Variation of lipid and carbohydrate content in *Schizothorax esocinus* from Dal Lake of Kashmir Valley. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(3), 447–450. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.447.450>
- Marcela Álvarez. (2007). *COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL PRODUCIDOS POR LAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* Y *Porphyridium cruentum**. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1142/1/175011.pdf>
- Mayer, A. M. S., & Hamann, M. T. (2005). Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiov. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 140(3–4), 265–286. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.04.004>
- Mayorga, C., & Manso, L. (2017). Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador Raceway en condiciones de laboratorio. *Revista De Iniciación Científica*, 3, 85–91. <http://revistas.utp.ac.pa/index.php/ric/article/view/1702>
- Megahed, M. E. (2020). Genetic selection for improved disease resistance in aquaculture with special reference to shrimp and tilapia breeding programs in Egypt. *Journal of Applied Aquaculture*, 32(4), 291–340. <https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1697783>
- Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E., & de Kinkelin, P. (1997). *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. In *Diseases of Aquatic Organisms - DISEASE AQUAT ORG* (Vol. 30). <https://doi.org/10.3354/dao030199>
- Michelson, W., da Silva, M. L. B., Matthiensen, A., Silva, E., Pilau, E. J., de Oliveira Nunes, E., & Soares, H. M. (2021). Microalgae produced during phycoremediation of swine wastewater contains effective bacteriostatic compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Chemosphere*, 283(May). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131268>
- Mitra, S., Rauf, A., Tareq, A. M., Jahan, S., Emran, T. Bin, Shahriar, T. G., Dhama, K., Alhumaydhi, F. A., Aljohani, A. S. M., Rebezov, M., Uddin, M. S., Jeandet, P., Shah, Z. A., Shariati, M. A., & Rengasamy, K. R. (2021). Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. *Food and Chemical Toxicology*,

154(April), 112328. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112328>

- Morales, E. (2012). *Manual de laboratorio: Algas en la Biotecnología*.
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2017). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34(1–2), 129. <https://doi.org/10.26807/remcb.v34i1-2.240>
- Morcelli, A., Cassel, E., Vargas, R., Rech, R., & Marcílio, N. (2021). Supercritical fluid (CO₂+ethanol) extraction of chlorophylls and carotenoids from *Chlorella sorokiniana*: COSMO-SAC assisted prediction of properties and experimental approach. *Journal of CO₂ Utilization*, 51(May), 101649. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2021.101649>
- Naviner, M., Berge, J. P., Durand, P., & Le Bris, H. (1999). Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 174(1/2), 15–24. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00513-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00513-4)
- Neto, A. M. P., Sotana de Souza, R. A., Leon-Nino, A. D., da Costa, J. D. ar. A., Tiburcio, R. S., Nunes, T. A., Sellare de Mello, T. C., Kanemoto, F. T., Saldanha-Corrêa, F. M. P., & Giancesella, S. M. F. (2013). Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. *Renewable Energy*, 55, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.01.019>
- Novoa, J. (n.d.). *Caracterización taxonómica y molecular de las especies de microalgas presentes en el lago Yahuarcocha para su potencial uso comercial*. Universidad Técnica del Norte.
- Nzayisenga, J. C., Farge, X., Groll, S. L., & Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>
- Olivares-Fuster, O., Klesius, P. H., Evans, J., & Arias, C. R. (2008). Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. *Journal of Fish Diseases*, 31(4), 277–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00900.x>
- Ortega Asencios, Y., Barreiro Sánchez, F., Bueno Mendizábal, H., Huancaré Pusari, K., Ostos Alfonso, H., Manchego Sayán, A., Pereira Figueiredo, M. A., Gómez Manrique, W., de Andrade Belo, M. A., & Sandoval Chaupe, N. (2016). First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, 4, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.002>
- Osman, K. M., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Dawoud, T. M., Moussa, I. M. I., Ibrahim, M. D. S., Hessain, A. M., Orabi, A., & Fawzy, N. M. (2017). Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1289-8>
- Palang, I., Hirono, I., Senapin, S., Sirimanapong, W., Withyachumnarnkul, B., & Vanichviriyakit, R. (2020). Cytotoxicity of *Streptococcus agalactiae* secretory

- protein on tilapia cultured cells. *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1229–1236. <https://doi.org/10.1111/jfd.13230>
- Panghal, M., Kaushal, V., & Yadav, J. (2011). In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-21>
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Pascoal, D. R. C., Velozo, E. S., Braga, M. E. M., Sousa, H. C., Cabral-Albuquerque, E. C. M., & Vieira de Melo, S. A. B. (2020). Bioactive compounds of *Copaifera* sp. impregnated into three-dimensional gelatin dressings. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(6), 1537–1551. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00797-2>
- Patrick Murray, Ken Rosenthal, M. P. (2005). Microbiología Médica. In S.A. Elsevier España: Vol. Sexta Edic.
- Pereira, U. P., Mian, G. F., Oliveira, I. C. M., Benchetrit, L. C., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140(1–2), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.025>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pérez, J. P., Muñoz, A. A., Figueroa, C. P., & Agurto-Muñoz, C. (2021). Current analytical techniques for the characterization of lipophilic bioactive compounds from microalgae extracts. *Biomass and Bioenergy*, 149(March). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106078>
- Phuoc, N. N., Linh, N. T. H., Crestani, C., & Zadoks, R. N. (2021). Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534(October 2020), 736256. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736256>
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- Pratt, R., Daniels, T. C., Eiler, J. J., Gunnison, J. B., Kumler, W. D., Oneto, J. F., Strait, L. A., Spoehr, H. A., Hardin, G. J., Milner, H. W., Smith, J. H., & Strain, H. H. (1944). CHLORELLIN, AN ANTIBACTERIAL SUBSTANCE FROM CHLORELLA. *Science (New York, N.Y.)*, 99(2574), 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.99.2574.351>
- Preena, P. G., Dharmaratnam, A., & Swaminathan, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance analysis of Pathogenic Bacteria Isolated from Freshwater Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Kerala, India. *Current Microbiology*, 77(11), 3278–3287. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02158-1>

- Pulido, A. (2004). Principales patologías de origen infeccioso de las especies piscícolas cultivadas en Colombia. *Grupo de Investigación En Patobiología Veterinaria*, 5.
- Pumchan, A., Krobthong, S., Roytrakul, S., Sawatdichaikul, O., Kondo, H., Hirono, I., Areechon, N., & Unajak, S. (2020). Novel Chimeric Multiepitope Vaccine for Streptococcosis Disease in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57283-0>
- Qu, W., Loke Show, P., Hasunuma, T., & Ho, S. H. (2020). Optimizing real swine wastewater treatment efficiency and carbohydrate productivity of newly microalga *Chlamydomonas* sp. QWY37 used for cell-displayed bioethanol production. *Bioresource Technology*, 305(January), 123072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123072>
- Ragland, S. A., & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, 13(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>
- Rao, M., Kumar, S. H., Kumar, S., Bedekar, M. K., Tripathi, G., & Kooloth Valappil, R. (2021). Microbiological investigation of Tilapia lake virus-associated mortalities in cage-farmed *Oreochromis niloticus* in India. *Aquaculture International*, 29(2), 511–526. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00635-9>
- Ray, P., Lakshmanan, V., Labbé, J. L., & Craven, K. D. (2020). Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 11(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622926>
- Rey, A., Lg, P., Mf, A., J, F., & Iregui, C. (2007). *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. In *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia: Vol. Rev. Med.*
- Richmond, A. (2003). Biological Principles of Mass Cultivation. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 125–177). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch8>
- Richmond, A. (2005). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (A. Richmond (ed.)). Blackwell Science Ltd.
- Rodrigues, D. B., Menezes, C. R., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2015). Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. *Food Research International*, 77, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027>
- Rojas, V., Rivas, L., Cárdenas, C., & Guzmán, F. (2020). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245804>
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C., & Morales, E. (2008). Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 421–429. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.5596>
- Rothen, J., Sapugahawatte, D. N., Li, C., Lo, N., Vogel, G., Foucault, F., Pflüger, V., Pothier, J. F., Blom, J., Daubenberger, C., & Ip, M. (2020). A simple, rapid typing

- method for *Streptococcus agalactiae* based on ribosomal subunit proteins by MALDI-TOF MS. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65707-5>
- Ryan, R. C. G. eds. S. (2003). Medical microbiology 2003. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Sacaquispe Contreras, R. E., & Velásquez Pomar, J. (2002). *Manual de procedimientos anual para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf
- Salomón, M. (2015). *Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción de biomasa en microalgas*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5644/1/122855.pdf>
- Salto Rosero, N., Torres Corral, Y., Fernández Álvarez, C., Aguilera Guirao, A., Seoane Prado, R., & Santos, Y. (2020). Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry for the identification of *Streptococcus mutans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10601–10612. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10980-7>
- Samadhiya, K., Ghosh, A., Kashyap, M., Anand, V., & Bala, K. (2021). Bioprospecting of native algal strains with unique lipids, proteins, and carbohydrates signatures: A time dependent study. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 0–2. <https://doi.org/10.1002/ep.13735>
- Samah Oda, Hossam Tohamy, R. M. (2016). Pathological Alterations in Nile Tilapia Experimentally Infected with *Streptococcus iniae* and *Candida albicans*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(4), 953–959. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16>
- Sánchez, L. (2019). *Estudios sobre la utilización de biomasa algal como materia prima alternativa para la producción de bioetanol*.
- Sanmukh, S. (2014). Bioactive Compounds Derived from Microalgae Showing Antimicrobial Activities. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 03(03), 3–6. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000224>
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J., & Ibáñez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1213–1218. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.012>
- Schumann, P., & Maier, T. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry applied to classification and identification of bacteria. In *Methods in Microbiology* (1st ed., Vol. 41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>
- Seo, S. H., Srivastava, A., Han, M. S., Lee, H. G., & Oh, H. M. (2019). Maximizing biomass and lipid production in *Ettlia* sp. by ultraviolet stress in a continuous culture. *Bioresource Technology*, 288(May), 121472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121472>
- Shaima, A. F., Mohd Yasin, N. H., Ibrahim, N., Takriff, M. S., Gunasekaran, D., &

- Ismaeel, M. Y. Y. (2021). Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9). *Saudi Journal of Biological Sciences*, xxx. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.069>
- Shameem M., S., Mayavan, K., & Venkatachalam, R. (2021). Influence of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles (QMSNs) on immunity and diseases resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Aquaculture*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.2000921>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/md14040081>
- Singh, A., Kushwaha, A., Goswami, S., Tripathi, A., Bhasney, S. M., Goswami, L., & Hussain, C. M. (2022). *Chapter 15 - Roadmap from microalgae to biorefinery: A circular bioeconomy approach* (C. M. Hussain, S. Singh, & L. B. T.-E. T. to A. Z. W. Goswami (eds.); pp. 339–360). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85403-0.00006-2>
- Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73–95. <https://doi.org/10.1080/07388550500248498>
- Siringi, J. O., Turoop, L., & Njonge, F. (2021). Growth and biochemical response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to spirulina (*Arthrospira platensis*) enhanced aquaponic system. *Aquaculture*, 544(June), 737134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737134>
- Skorupskaite, V., Makareviciene, V., Sendzikiene, E., & Gumbyte, M. (2019). Microalgae *Chlorella* sp. cell disruption efficiency utilising ultrasonication and ultrahomogenisation methods. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2349–2354. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01761-5>
- Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, 8(4), 1213–1262. <https://doi.org/10.3390/md8041213>
- Solís-Salinas, C. E., Patlán-Juárez, G., Okoye, P. U., Guillén-Garcés, A., Sebastian, P. J., & Arias, D. M. (2021). Long-term semi-continuous production of carbohydrate-enriched microalgae biomass cultivated in low-loaded domestic wastewater. *Science of the Total Environment*, 798, 149227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149227>
- Sørensen, U. B. S., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I., & Kilian, M. (2010). Emergence and Global Dissemination of Host-Specific *Streptococcus agalactiae* Clones. *MBio*, 1(3), e00178-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00178-10>
- Soto, E., Wang, R., Wiles, J., Green, C., Plumb, J., Hawke, J., & Soto, E. (2015). Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf coast, Latin America, and Thailand. *Journal of Aquatic Animal Health*, 27(2), 123–134. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032439>
- Srinivasakumar, K., & Rajashekhar, M. (2009). In vitro studies on bactericidal activity and sensitivity pattern of isolated marine microalgae against selective human

- bacterial pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*, 2.
<https://doi.org/10.17485/ijst/2009/v2i8/29503>
- Suasnavas, J., Flores, R., & Echeverría, I. (2017). *microalgas usando cepas ATCC Resumen Evaluation of the antibacterial activity of microalgae extracts using ATCC strains Abstract Parte experimental*. 6(01), 57–65.
- Sukhavachana, S., Tongyoo, P., Massault, C., McMillan, N., Leungnaruemitchai, A., & Poompuang, S. (2020). Genome-wide association study and genomic prediction for resistance against *Streptococcus agalactiae* in hybrid red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Aquaculture*, 525(January), 735297.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735297>
- Tan, J. Sen, Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1), 116–129.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>
- Tavakoli, S., Hong, H., Wang, K., Yang, Q., Gahruie, H. H., Zhuang, S., Li, Y., Liang, Y., Tan, Y., & Luo, Y. (2021). Ultrasonic-assisted food-grade solvent extraction of high-value added compounds from microalgae *Spirulina platensis* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. *Algal Research*, 60(April), 102493. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102493>
- Thai Agricultural Standard. (2010). *Diagnosis of Streptococcosis in Tilapia National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards* (First edit). Royal Gazette.
- Timira, V., Meki, K., Li, Z., Lin, H., Xu, M., & Pramod, S. N. (2021). A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for proteins release from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–17.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1873734>
- Tramper, J., Battershill, C., Brandenburg, W., Burgess, G., Hill, R., Luiten, E., Müller, W., Osinga, R., Rorrer, G., Tredici, M., Uriz, M., Wright, P., & Wijffels, R. (2003). What to do in marine biotechnology? In *Biomolecular engineering* (Vol. 20, Issues 4–6, pp. 467–471). [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00077-7](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00077-7)
- Trewavas, E., & History, B. M. (Natural. (1983). *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis, and Danakilia* / (Vol. 1983). British Museum (Natural History). <https://www.biodiversitylibrary.org/item/215113>
- van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-smidt, P., Brisse, S., & Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(SUPPL. 3), 1–46.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>
- Vila, J. (2012). Procedimientos en Microbiología Clínica. In *Human and Veterinary Medicine* (Vol. 4, Issue 2).
- Viso, A. C., Pesando, D., & Baby, C. (1987). Antibacterial and Antifungal Properties of Some Marine Diatoms in Culture. *Botanica Marina*, 30(1), 41–46.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1515/botm.1987.30.1.41>
- Wamala, S. P., Mugimba, K. K., Mutoloki, S., Evensen, O., Mdegela, R., Byarugaba, D.

- K., & Sørum, H. (2018). Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0080-x>
- Wang, Y.-H., Su, L.-H., Hou, J.-N., Yang, T.-H., Lin, T.-Y., Chu, C., & Chiu, C.-H. (2010). Group B streptococcal disease in nonpregnant patients: emergence of highly resistant strains of serotype Ib in Taiwan in 2006 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2571–2574. <https://doi.org/10.1128/JCM.00810-10>
- Wayne, P. (2014). *Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 24th informational supplement* (Issue January).
- Wicki, Gustavo A., N. G. (2018). Estudio de Desarrollo y Producción de Tilapia. *Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 3–3. <https://doi.org/10.2307/j.ctt20krzg8.3>
- Yanong, R. P. E., & Francis-floyd, R. (2013). Streptococcal Infections of Fish. *University of Florida*, 1–5. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Ye, X., Li, J., Lu, M., Deng, G., Jiang, X., Tian, Y., Quan, Y., & Jian, Q. (2011). Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*, 77(4), 623–632. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0365-4>
- Yessica Ortega, A., Frank Barreiro, S., Gina Castro, S., Karina Huancaré, P., Alberto Manchego, S., Belo, M. A. A., Figueiredo, M. A. P., Manrique, W. G., & Sandoval, C. N. (2017). Beta-haemolytic streptococci in farmed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, from Sullana-Piura, Peru. *Revista MVZ Cordoba*, 22(1), 5653–5665. <https://doi.org/10.21897/rmvz.925>
- Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., Khan, M. M., & Aragaw, T. (2021). Optimization of microwave-assisted carbohydrate extraction from indigenous *Scenedesmus* sp. grown in brewery effluent using response surface methodology. *Heliyon*, 7(5), e07115. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07115>
- Yuasa, K., Kitancharoen, N., Kataoka, Y., & Al-Murbaty, F. A. (1999). *Streptococcus iniae*, the Causative Agent of Mass Mortality in Rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 87–93. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1999\)011<0087:SITCAO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1999)011<0087:SITCAO>2.0.CO;2)
- Zambrano, L., Martínez-meyer, E., Menezes, N., & Peterson, A. T. (2006). *Invasive potential of common carp (Cyprinus carpio) and Nile tilapia (Oreochromis niloticus) in American freshwater systems. 1910*, 1903–1910. <https://doi.org/10.1139/F06-088>
- Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L. A., & Queiroz, M. I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*, 101(18), 7107–7111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>
- Zhang, Z., Sun, D., Wu, T., Li, Y., Lee, Y., Liu, J., & Chen, F. (2017). The synergistic energy and carbon metabolism under mixotrophic cultivation reveals the coordination between photosynthesis and aerobic respiration in *Chlorella*

zofingiensis. *Algal Research*, 25(April), 109–116.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.007>

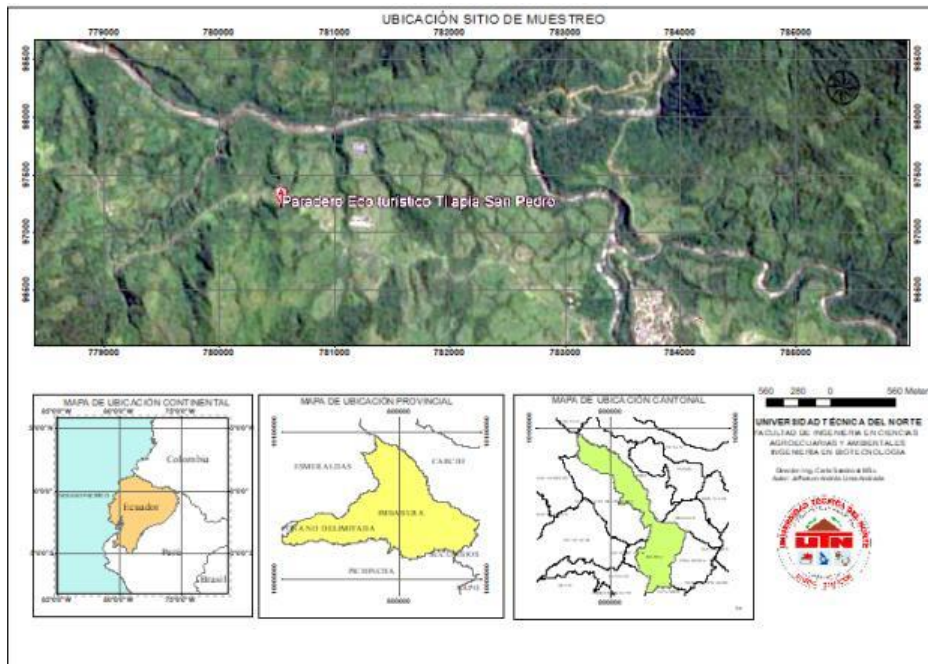
Zhao, G., Chen, X., Wang, L., Zhou, S., Feng, H., Chen, W. N., & Lau, R. (2013).
Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for
yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 128, 337–344.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.038>

Zilberg, D., Tal, A., Froyman, N., Abutbul, S., Dudai, N., & Golan-Goldhirsh, A.
(2010). Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for streptococcosis in
tilapia. *Journal of Fish Diseases*, 33(4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01129.x>

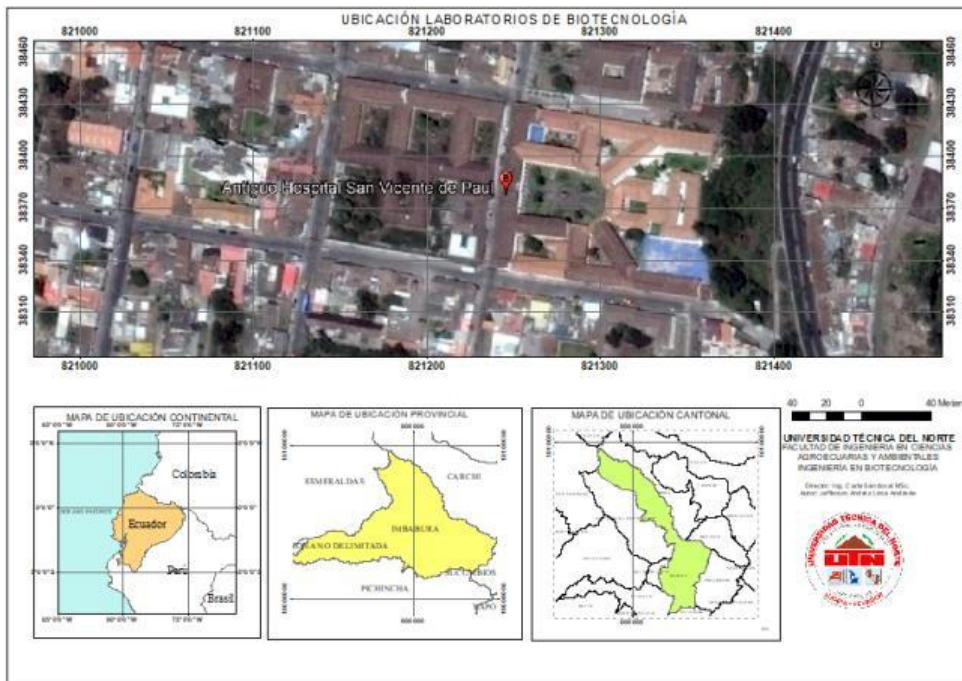
Zuriaga-Agustí, E., Bes-Piá, A., Mendoza-Roca, J. A., & Alonso-Molina, J. L. (2013).
Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR
activated sludge flocs in view of improving EPS determination. *Separation and
Purification Technology*, 112, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.048>

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de muestreo de Tilapias.



Anexo 2. Ubicación de laboratorios de Biotecnología.



Anexo 3. Formulación de Medio Murashige y Skoog para microalgas.

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)	Solución Stock	Concentración (ml. L ⁻¹)
KNO3	5.0	Nitratos	10
KH2PO4	0.1	Sulfatos	10
NaHCO3	0.3	Haloides	10
Agar	12.0	P, Bo, Mo	10
		Fe Na EDTA	10

Anexo 4. Composición de medio comercial.

Compuesto	%	ppm
Nitrógeno (N)	10.0	-
Fósforo (P O)	4.0	-
Potasio (K O)	7.0	-
Magnesio (Mg O)	0.2	-
Azufre (S)	0.8	-
Manganeso (Mn)	-	17
Hierro (Fe)	-	140
Cobre (Cu)	-	25
Zinc (Zn)	-	5
Boro (B)	-	22
Molibdeno (Mo)	-	3

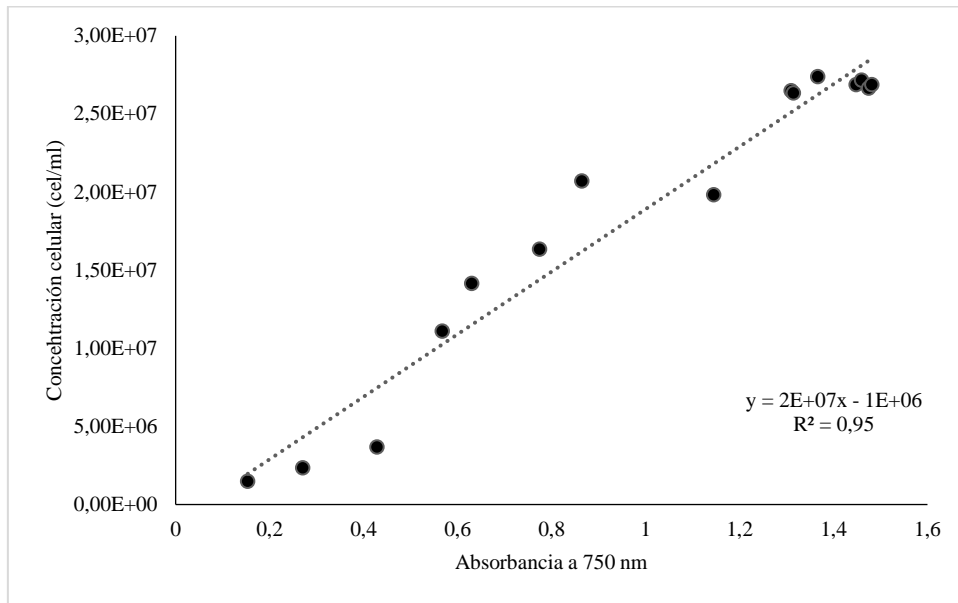
Anexo 5. Selección de peces enfermos.



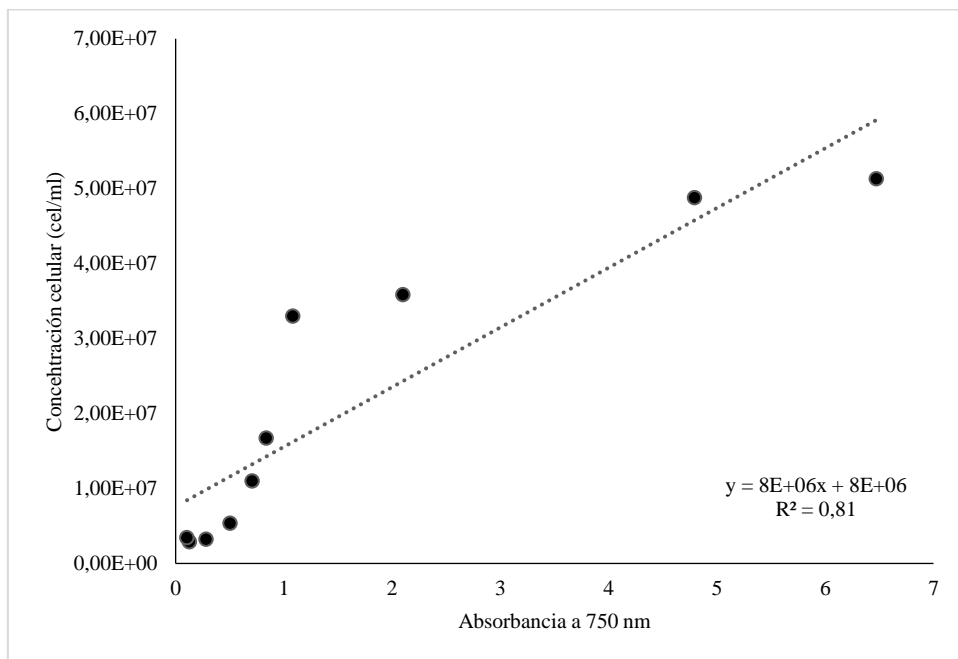
Anexo 6. Frotis del ojo y opérculo de la tilapia.



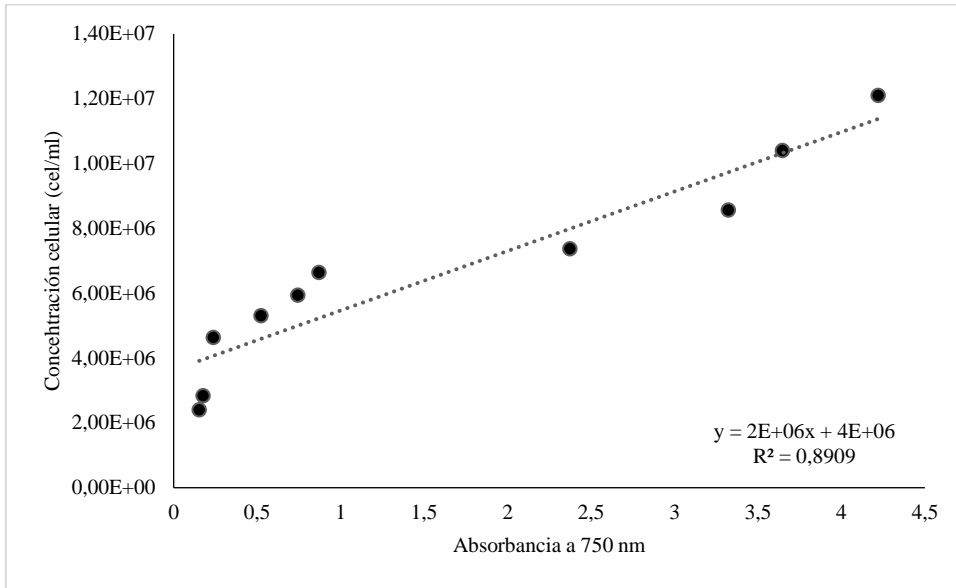
Anexo 7. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de *Chlamydomonas agloiformis*.



Anexo 8. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de *Pectinodesmus pectinatus*.



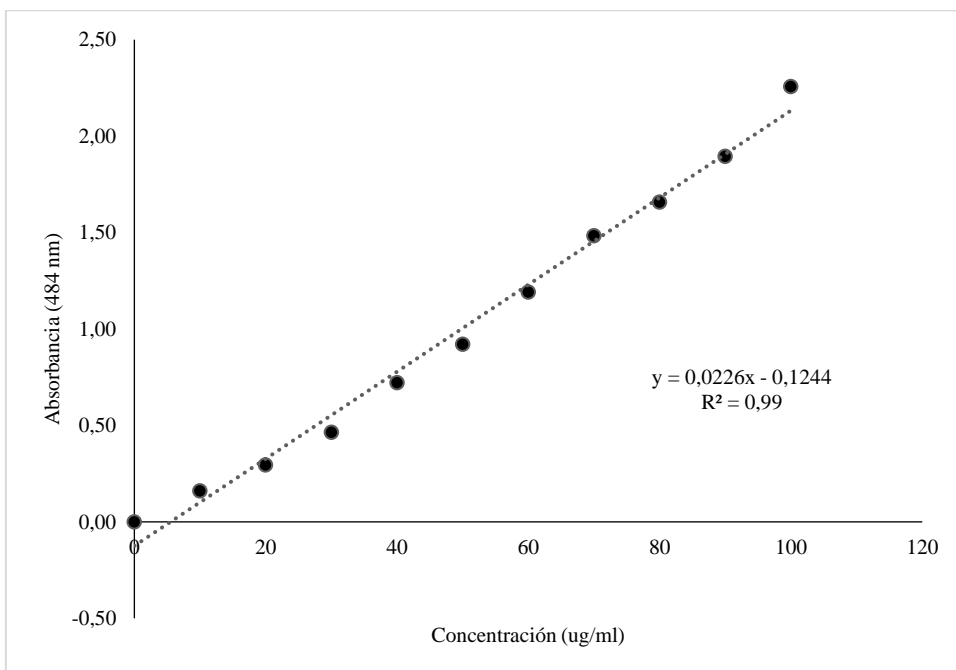
Anexo 9. Relación de Densidad celular vs Absorbancia de *Ettlia pseudoalveolaris*.



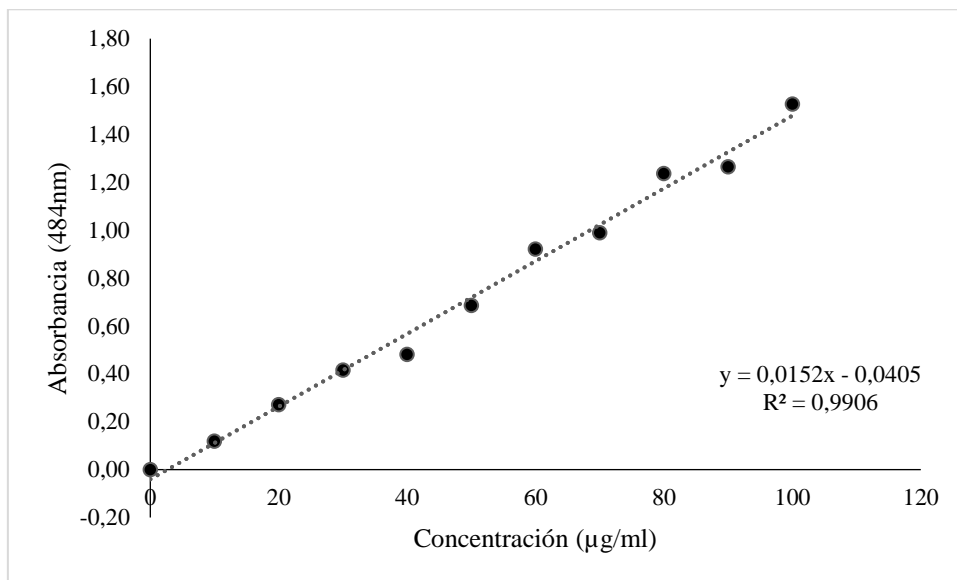
Anexo 10. Biomasa y rendimiento de especies de microalga estudiadas.

Microalga	Rendimiento	
	Biomasa (g)	Biomasa/sustrato (%)
<i>Chlamydomona agloiformis</i>	0.45	30
<i>Ettlia pseudoalveolaris</i>	0.97	64.2
<i>Pectinodesmus pectinatus</i>	0.93	61.7

Anexo 11. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos totales en el sobrenadante.



Anexo 12. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos totales en la muestra sonicada.



Anexo 13. Códigos iniciales y finales que se obtuvieron a partir del cultivo de tejidos de tilapia.

Códigos Iniciales	Códigos Finales (muestras puras)
T1-O1	T1-R3-Rs (1.1)
T1-O2	T1-R3-Col (1.2)
T1-O3	T1-R3-Lech (1.3)
T1-Op1	T1-Cbr2-Rs1
T1-Op2	T2-O1-Rs1
T1-Op3	T2-R1-Rs1
T1-R1	T2-Cbr1 (1)(N)
T1-R2	T2-Cbr1 (1)(B)
T1-R3	T2-Cbr1 (2) (N)
T1-Cbr1	T2-Cbr2-Rs1
T1-Cbr2	
T1-Cbr3	
T2-O1	
T2-O2	
T2-O3	
T2-Op1	
T2-Op2	
T2-Op3	
T2-R1	
T2-R2	

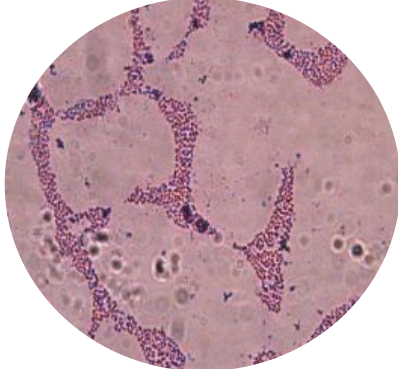
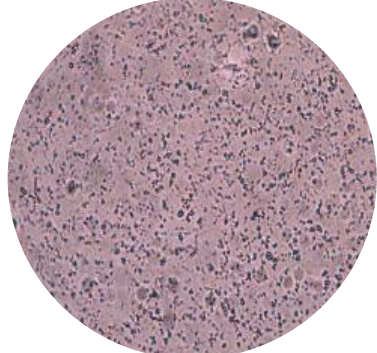

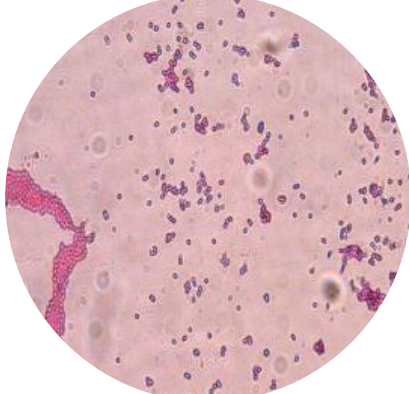
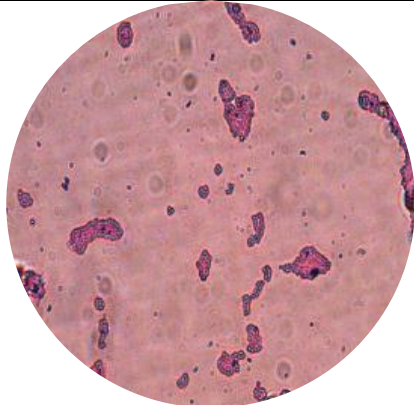
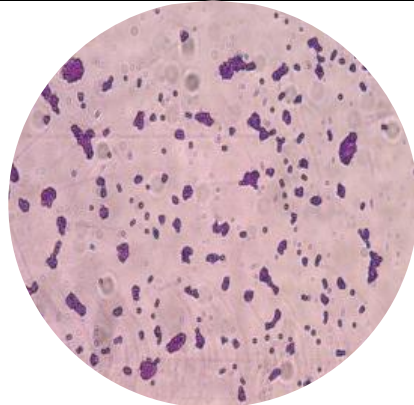
T2-R3

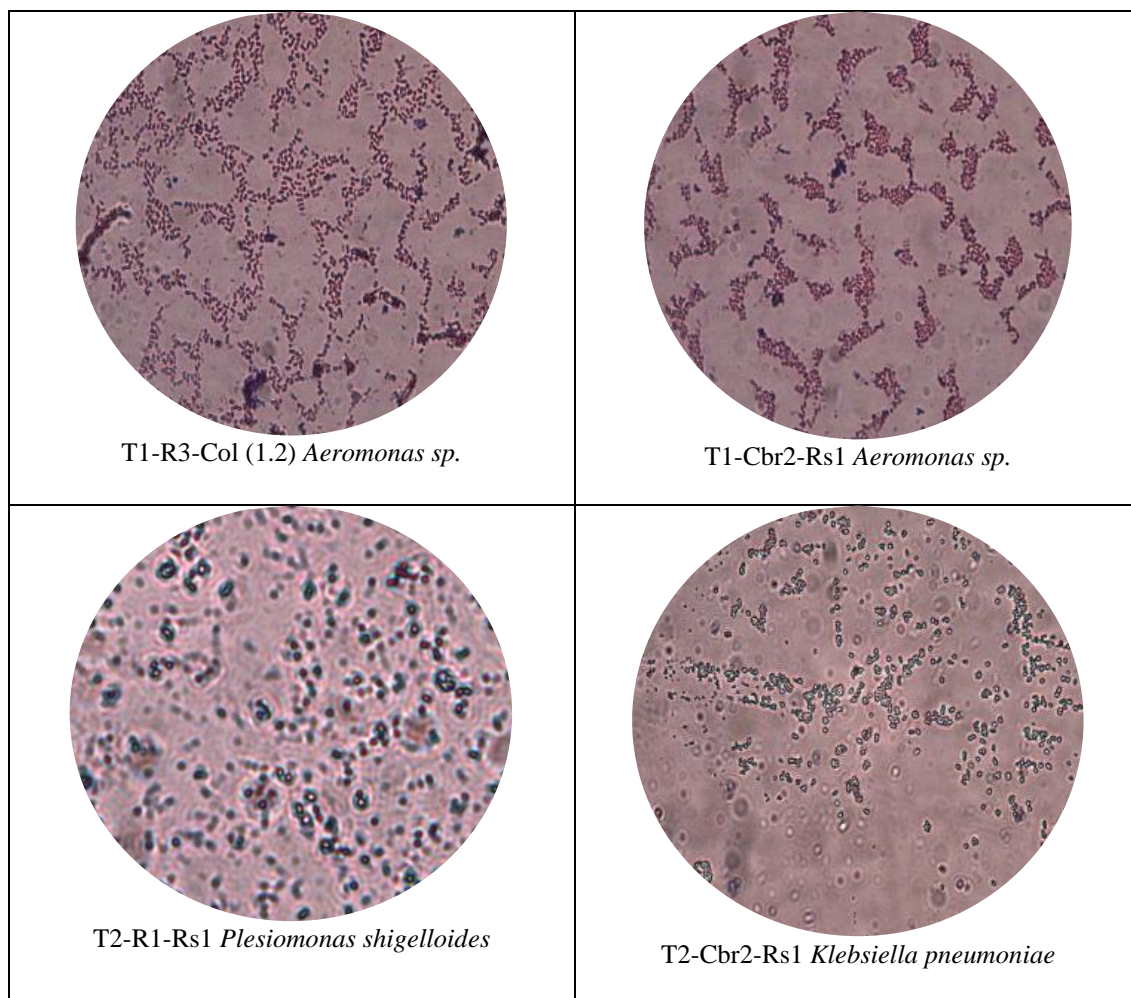
T2-Cbr1

T2-Cbr2

T2-Cbr3

Anexo 14. Especies patógenas aisladas de tejidos de tilapias enfermas.

ESPECIES AISLADAS DE TILAPIAS ENFERMAS	
 <p>T1-R3-Rs (1.1) <i>Aeromonas</i> sp.</p>	 <p>T1-R3-Lech (1.3) <i>Plesiomonas shigelloides</i></p>
 <p>T2-O1-Rs1 <i>Klebsiella pneumoniae</i></p>	 <p>Cbr1 (1)(N) <i>Candida albicans</i></p>
 <p>T2-Cbr1 (1)(B) <i>Staphylococcus aureus</i></p>	 <p>Cbr1 (2) (N) <i>Staphylococcus equorum</i></p>



Anexo 15. Halos de inhibición de los extractos de microalga.

Especie de Microalga	Tipo de Extracto	Diámetro de halos de inhibición (mm)
<i>E. pseudoalveolaris</i>	Crudo	0 ± 0
	Extracelular	0 ± 0
	Intracelular	27,51 ± 0.85
<i>C. agloeformis</i>	Crudo	0 ± 0
	Extracelular	0 ± 0
	Intracelular	27,65 ± 2.07
<i>P. pectinatus</i>	Crudo	0 ± 0.00
	Extracelular	7,32 ± 0.81

Intracelular	31,71 ± 2.81
--------------	--------------



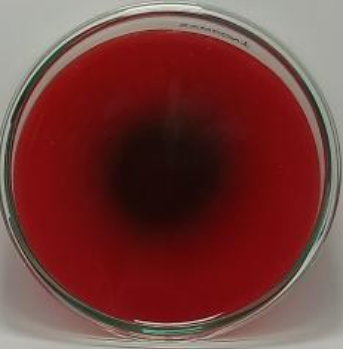
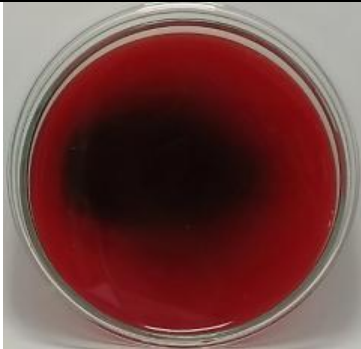
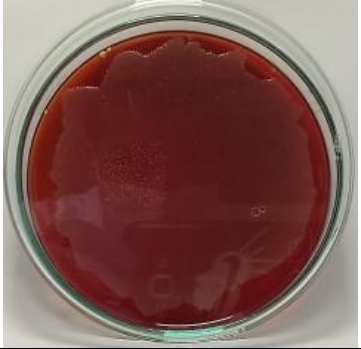

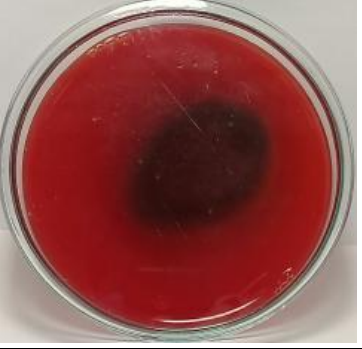

Anexo 16. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos de microalga.


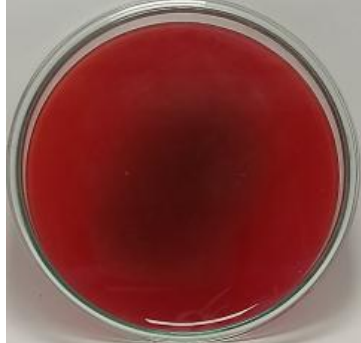
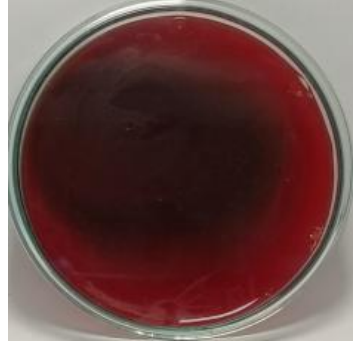
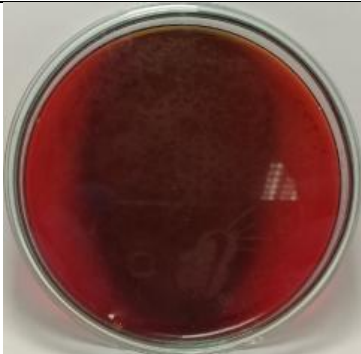
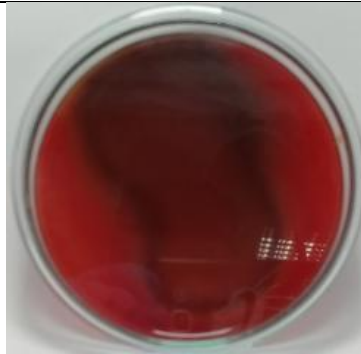
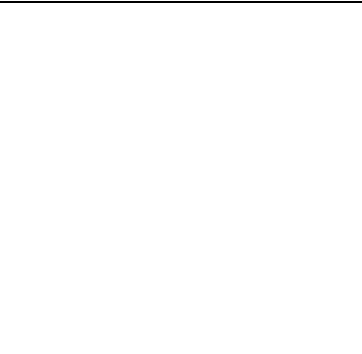

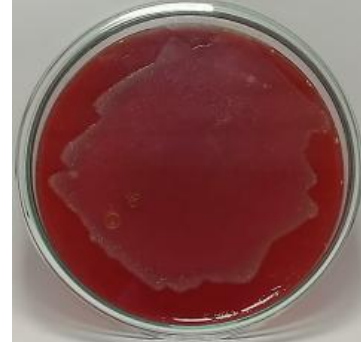




Microalga	Tipo de extracto	CMI (%)	CMB (%)
<i>E. pseudoalveolaris</i>	Intracelular	25	50
<i>C. agloeformis</i>	Intracelular	25-12.5	25
<i>P. pectinatus</i>	Intracelular	12.5-6.25	12.5
<i>P. pectinatus</i>	Extracelular	50	90

Anexo 17. Datos de absorbancia y crecimiento en placa de los distintas concentraciones de extracto de microalga.

Microalga	Tipo de extracto	Concentración (%)	Absorbancia	Crecimiento en placa
<i>E. pseudoalveolaris</i>	Intracelular	90	0±0	No
		50	0±0	No
		25	0±0	Si
		12.5	0.52±0.004	Si
		6.25	2.37±0.36	-
		Control	5.32±0.14	-
		<i>C. agloeformis</i>	Intracelular	90
50	0±0			No
25	0±0			No
12.5	2.43±0.17			Si
6.25	3.78±0.11			-
Control	5.32±0.03			-
<i>P. pectinatus</i>	Intracelular			90
		50	0±0	No
		25	0±0	No
		12.5	0±0	No
		6.25	1.95±0.18	Si
		3.125	4.4±0.09	-
		Control	5.41±0.1	-
<i>P. pectinatus</i>	Extracelular	90	0±0	No
		50	0±0	Si
		25	0.84±0.06	Si
		12.5	1.59±0.19	Si
		6.25	2.10±0.07	-
		Control	5.22±0.03	-

Anexo 18. Crecimiento en placas con extracto de microalgas a distintas concentraciones.

CRECIMIENTO EN PLACAS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE MICROALGA		
Extracto Intracelular de <i>Chlamydomonas agloeiformis</i>		
		
12.5 %	25 %	50 %
		
90%		
Extracto intracelular de <i>Ettlia pseudoalveolaris</i>		
		
12.5 %	25 %	50 %
		
90 %		
Extracto Intracelular de <i>Pectinodesmus pectinatus</i>		

		
6.25 %	12.5 %	25 %
		
50 %	90 %	
Extracto Extracelular de <i>Pectinodesmus pectinatus</i>		
		
12.5 %	25 %	50 %
		
90 %		
Controles de crecimiento		

