

Aislamiento e identificación de bacterias presentes en cultivos de microalgas marinas. Actividad antibacteriana de algunas de las especies encontradas

Isolation and identification of bacteria present in marine microalgae cultures. Antibacterial activity of some of the species found

Joicye Hernández,¹ Sylvia Leal,¹ G. Margarita Lugioyo,²
Sandra Loza,² Rafael Curbelo,³ Valia María Caballero,⁴
Eudalyz Ortiz,⁴ Margarita Leonor Morales⁴ y Johanna Kratzer⁵

¹ Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana. Calle 16 No. 114. Playa, La Habana, Cuba, CP: 11300, E-mail: joicye25@gmail.com; sylvia@cim.uh.cu

² Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Ave. 1ra. No. 18406, Rpto. Flores, Playa, La Habana, Cuba.

³ Centro de Producción de Postlarvas Yaguacam, Ministerio de la Industria Alimentaria. Carretera Cienfuegos-Trinidad km 63½, Cienfuegos, Cuba.

⁴ Centro de Bioproductos Marinos, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Loma y Calle 37, Nuevo Vedado, Plaza, La Habana, Cuba.

⁵ Universidad de Ciencias Aplicadas de Weihenstephan, Alemania.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar y determinar la actividad antibacteriana de la microbiota presente en los cultivos de las siguientes especies de microalgas marinas: *Chaetoceros ceratosporum*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira sp.*, *Thalassiosira weissflogii*, *Amphora sp.*, *Navicula sp.* y *Tetraselmis suecica*, especies que se utilizan en la alimentación de animales acuáticos. Se estudiaron las características morfológicas, culturales y tintoriales de las cepas aisladas, así como las características fisiológicas y bioquímicas. Para la clasificación se utilizó el Manual de Bergey (Krieg & Holt, 1984; Sneath *et al.*, 1986). La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en placa donde se empleó el medio de cultivo agar nutriente y bloques de agar con los cultivos a evaluar. Se aislaron e identificaron 70 bacterias, de las cuales el 25,7 % fueron productoras de sustancias antibacterianas. Las cepas con mayores actividades antibacterianas fueron *Bacillus cereus* (en cultivos de *Thalassiosira sp.* y *Tetraselmis suecica*), y *B. megaterium* (en cultivos de *Chaetoceros ceratosporum*) que inhibieron a cuatro de las cepas patógenas ensayadas. Los resultados sugieren que las bacterias aisladas podrían ser aprovechadas como agentes probióticos en el control biológico de patógenos de organismos marinos de interés en maricultura.

Palabras clave: lista de especies; aislamiento; actividad antibacteriana; cultivo de microalgas.

ABSTRACT

In this paper, we report the identification and antibacterial activity of marine bacterial strains associated in the marine microalgal cultures *Chaetoceros ceratosporum*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira sp.*, *Thalassiosira weissflogii*, *Amphora sp.*, *Navicula sp.* and *Tetraselmis suecica*. The antibacterial activity was determined by the diffusion plate method using Nutrient agar and agar blocks with the cultures to study. As result, 70 marine bacterial strains were isolated and identified, the 25,7 % of the bacterial microbiota was able to produce antibacterial substances. The strains with most antibacterial activity were *Bacillus cereus* (*Thalassiosira sp.*), *B. cereus* (*Tetraselmis suecica*), and *B. megaterium* (*Chaetoceros ceratosporum*) that inhibited four of the pathogens strains assayed. The results suggest that the isolated bacteria could be used as probiotics agents for the biological control of pathogens from marine organisms of interest in mariculture.

Key words: check list, isolation, antibacterial activity, microalgae culture.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos sometidos a cultivo, siendo altamente nutritivas y fáciles de ingerir debido al tamaño que poseen (Band, 2008). En los sistemas de producción acuícola es imposible trabajar con cultivos microalgales axénicos, debido a que las células de microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano (Riquelme & Avendaño-Herrera, 2003). De esta forma el alimento utilizado en los sistemas de cultivo es mixto y está compuesto por una especie de microalga y una o varias bacterias asociadas, dependiendo de la especie de microalga cultivada.

El rol de las bacterias que se asocian a los cultivos masivos de microalgas ha sido estudiado, ya que estos cultivos mixtos microalgas-bacterias son fácilmente ingeridos y digeridos por los organismos, provocando mayores crecimientos e incrementando la sobrevivencia de los organismos cultivables. Experiencias que se realizaron en larvas de bivalvos demostraron que las bacterias participan en procesos de digestión de las microalgas mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Prieur *et al.*, 1990). Brown *et al.* (1996) señalan que cuando se alimentan larvas de ostra *Saccostrea commercialis* con mezclas de bacterias y algas, se provoca un incremento en la talla de la concha del 67 %, en comparación con larvas alimentadas solo con microalgas.

La interacción entre estos microorganismos puede tener un papel beneficioso a nivel de procesos digestivos (Eiler *et al.*, 2007), inhibiendo el crecimiento de algunos patógenos (Ringo, 2008; Yang *et al.*, 2009) y/o interactuando en el mantenimiento de la dinámica de la población bacteriana en sistemas de cultivos (Li *et al.*, 2009). También existen trabajos sobre la utilización de microorganismos para controlar las infecciones que se asocian a cultivos larvales de crustáceos, peces y moluscos (Rojas *et al.*, 2008; Tinh *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

En monocultivos microalgales de *Piramimonas virginica*, *Phytomonas sp.*, *Tetraselmis chuii* y *Pseudoisochrysis paradoxa* se describe en su microbiota 30 % de bacterias productoras de sustancias antibacterianas (Riquelme & Avendaño-Herrera, 2003). Esta asociación permitiría mantener un bajo nivel bacteriano en sistemas de cultivos de organismos marinos, que puede utilizarse para prevenir algunas enfermedades y además, porque brindan los requerimientos nutricionales necesarios.

Diversas investigaciones han verificado la potencialidad de bacterias marinas para uso profiláctico en cultivos de organismos acuáticos (Dopazo *et al.*, 1988; Lodeiros *et al.*, 1989; Austin *et al.*, 1995), lo que sugiere su aplicación como biocontroles en epizootias. Lodeiros *et al.* (1991), en su análisis de la actividad antibacteriana de la microbiota asociada a monocultivos de microalgas, indica que estas bacterias productoras de antibióticos podrían ser de utilidad en el biocontrol de patógenos en sistemas de cultivos de importancia comercial.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar las bacterias y determinar la actividad antibacteriana de la microbiota asociada a siete monocultivos de microalgas marinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados microbianos

Los aislados obtenidos fueron tomados de cultivos microalgales, desarrollados en 200 mL, en fase de crecimiento exponencial. Estos cultivos se desarrollaron a partir del cepario del Centro de Producción de Postlarvas de Camarón Yaguacam, del Ministerio de la Industria Alimentaria, en la Provincia de Cienfuegos, Cuba. Se mantuvieron de forma monoalgal con medio Guillard h (Guillard & Ryther, 1962) cuya agua de mar fue previamente filtrada y hervida, se ajustó la salinidad a 35 ‰ y se les suministró iluminación y aireación continua. Las especies correspondieron a: *Chaetoceros ceratosporum*, *C. muelleri*, *Thalassiosira sp.* y *T. weissflogii* (diatomeas planctónicas), *Amphora sp.* y *Navicula sp.* (diatomeas bentónicas) y *Tetraselmis suecica* (flagelado).

Para el análisis microbiológico, se tomaron muestras a las que se les realizó una dilución de 1:10 con agua de mar estéril y se inocularon a razón de 100 µL por placa, que contenían medio Agar Marino 2216E para bacterias marinas heterótrofas (Oppenheimer & ZoBell, 1952). Se dispersó sobre la superficie con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Se realizaron cinco réplicas de cada cultivo, que se incubaron a 30 °C durante 48 h, tiempo que se esperó para contabilizar las colonias, cuyos resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC). A las colonias presentes en los cultivos se les determinaron sus características culturales (forma, tamaño, cromogénesis, opacidad, elevación, superficie, bordes y consistencia) y su frecuencia de aparición. Se eligieron las diez colonias más frecuentes de cada cultivo de microalga, las que fueron aisladas por el método de agotamiento en el mismo medio de cultivo agarizado. Las características macro y microscópicas de las mismas fueron descritas con el empleo del microscopio estereoscópico y del microscopio óptico, según la metodología establecida por

Harrigan & Mc Cance (1968). La verificación de la pureza se realizó mediante criterios morfológicos, culturales y observaciones al microscopio óptico.

Las cepas aisladas se mantuvieron en medio Agar Nutriente (Biocen) por el método de subcultivos. Cuando se apreció crecimiento de la biomasa (\pm 24 h), los mismos fueron cubiertos con aceite mineral estéril. Esta operación se realizó por triplicado para cada uno de ellos. Posteriormente se depositaron y registraron en el cepario del Centro de Investigaciones Marinas. Los cultivos de microalgas fueron realizados en el Centro de Producción de Postlarvas de Camarón Yaguacam, en la provincia de Cienfuegos, Cuba. Los aislamientos e identificaciones fueron realizados en el Centro de Bioproductos Marinos del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, ambos en Cuba.

Análisis taxonómico

Se estudiaron las características morfológicas, culturales y tintoriales de las cepas aisladas de acuerdo con Harrigan & Mc Cance (1968), así como las características fisiológicas y bioquímicas de las cepas (Harrigan & Mc Cance, 1968; Krieg & Holt, 1984; Sneath *et al.*, 1986; Barrow & Feltham, 1993). Para la clasificación se utilizó el Manual de Bergey (Krieg & Holt, 1984; Sneath *et al.*, 1986).

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó por el método de "doble capa", modificado según Nacleiro *et al.*, (1993), el cual consiste, primeramente en cultivar los

aislados microbianos en Agar Nutriente (Biocen) (2 % de NaCl), que se incubaron a 20 °C durante cinco días. Al cabo de este tiempo los cultivos fueron tratados con vapores de cloroformo (45 min) e inmediatamente se agregó una segunda capa de agar semisólido, previamente inoculada con la bacteria patógena en prueba. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 24-30 h. La presencia de un halo de inhibición mayor de 10 mm se tomó como criterio de selección de las especies de microorganismos con actividad antibacteriana.

Para evaluar la capacidad antibacteriana se emplearon las siguientes cepas patógenas: *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 (American Type Culture Collection), *V. campbellii* ATCC 25920, *V. metschnikovii* ATCC 11170, *V. ordalii* NCIMB 2167 (National Collection of Marine and Industrial Bacteria), *V. parahemolyticus* ATCC 17803, *Vibrio splendidus* ATCC 33125 y *V. vulnificus* ATCC 27562, suministradas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Estas siete cepas fueron cultivadas y mantenidas en 10 mL de caldo LB 2 % de NaCl y almacenadas a 4 °C, hasta el momento de su utilización. Todas las cepas fueron activadas previamente a su utilización, cultivándolas por 18 h a 37 °C en agar semisólido LB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 70 representantes, pertenecientes a los géneros *Bacillus sp.* (68,6 %), *Aeromonas sp.* (10 %), *Pseudomonas sp.* (4,2 %), *Micrococcus sp.* (4,2 %), *Staphylococcus sp.* (2,9 %), *Moraxella sp.* (2,9 %), *Pasteurella sp.* (2,9 %), *Burkholderia sp.* (2,9 %) y *Acinetobacter sp.* (1,4 %) (TABLA 1), los cuales finalmente se agruparon en 28 especies (TABLA 2).

TABLA 1. Géneros bacterianos más frecuentes en los cultivos de microalgas estudiados

Clasificación	Am.x	Ch.c	Ch.m	Na.x	Te.s	Th.x	Th.w
<i>Acinetobacter</i> Brisou & Prévot, 1954	-	-	-	-	-	+	-
<i>Aeromonas</i> Stanier, 1943	+	+	+	+	+	-	+
<i>Bacillus</i> Cohn, 1872	+	+	+	+	+	+	+
<i>Burkholderia</i> Yabuuchi <i>et al.</i> , 1993	-	-	+	-	-	-	+
<i>Micrococcus</i> Cohn, 1872	-	-	+	-	+	+	-
<i>Moraxella</i> Lwoff, 1939	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pasteurella</i> Trevisan, 1887	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> Migula, 1894	-	-	+	-	+	+	-
<i>Staphylococcus</i> Rosenbach, 1884	-	-	+	-	-	-	+

(-): género bacteriano ausente, (+): género bacteriano presente. Am.x: *Amphora sp.*; Ch.c: *Chaetoceros ceratosporum*; Ch.m: *Chaetoceros muelleri*; Na.x: *Navicula sp.*; Te.s: *Tetraselmis suecica*; Th.x: *Thalassiosira sp.*; Th.w: *Thalassiosira weissflogii*.

TABLA 2. Composición taxonómica de las bacterias aisladas de los cultivos de microalgas estudiados

Clasificación	Am.x	Ch.c	Ch.m	Na.x	Te.s	Th.x	Th.w
<i>Acinetobacter lwoffii</i> Brisou & Prévot, 1954	-	-	-	-	-	+	-
<i>Aeromonas caviae</i> Popoff, 1984	-	+	-	+	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> Stanier, 1943	+	-	-	-	-	-	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> Snieszko & Friddle, 1953	-	+	-	-	+	-	-
<i>Aeromonas sobria</i> Popoff & Véron, 1981	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus alvei</i> Cheshire & Cheyne, 1885	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus aneurinolyticus</i> Kimura & Aoyama, 1952	+	-	+	-	+	-	+
<i>Bacillus badius</i> Batchelor, 1919	-	+	-	+	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i> Frankland & Frankland, 1887	+	-	+	+	+	+	-
<i>Bacillus circulans</i> Jordan, 1890	-	+	-	-	+	+	-
<i>Bacillus coagulans</i> Hammer, 1915	+	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus firmus</i> Bredemann & Werner, 1933	-	+	-	+	+	-	+
<i>Bacillus lentus</i> Gibson, 1935	+	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus liqueniformis</i> Chester, 1901	+	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary, 1884	+	+	-	+	+	+	+
<i>Bacillus polymyxa</i> Macé, 1889	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> Meyer & Gottheil, 1901	-	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn, 1872	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berlinger, 1915	+	-	-	-	-	+	+
<i>Burkholderia cepacia</i> Yabuuchi <i>et al.</i> , 1993	-	-	+	-	-	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> Cohn, 1872	-	-	+	-	-	-	-
<i>Micrococcus lylae</i> Kloos <i>et al.</i> , 1974	-	-	-	-	+	+	-
<i>Moraxella lacunata</i> Lwoff, 1939	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> Lehmann & Neumann, 1899	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula, 1895	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> Migula, 1895	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Sijderius, 1946	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach, 1884	-	-	+	-	-	-	+

(-): especie bacteriana ausente, (+): especie bacteriana presente.

Am.x: *Amphora sp.*; Ch.c: *Chaetoceros ceratosporum*; Ch.m: *Chaetoceros muelleri*; Na.x: *Navicula sp.*; Te.s: *Tetraselmis suecica*; Th.x: *Thalassiosira sp.*; Th.w: *Thalassiosira weissflogii*.

En todos los cultivos de microalgas se encontró una gran proporción del género *Bacillus sp.*, lo cual pudiera deberse a que estas bacterias son formadoras de esporas, estructura que le confiere una mayor capacidad de adaptación (Sardessai & Bhosle, 2003; Zhuang *et al.*, 2003).

La microbiota bacteriana en los diferentes cultivos que se estudiaron resultó ser poco similar; ello, unido a las diferencias tanto en diversidad como en abundancia, sugiere que cada especie de microalga posee una

microbiota específica. Como ejemplos podemos citar la microbiota del cultivo de *Chaetoceros muelleri*, la cual está constituida por siete géneros diferentes, seguida de *Thalassiosira weissflogii* con cinco y los cultivos de *Thalassiosira sp.* y *Tetraselmis suecica* con cuatro cada uno (TABLA 1), resultados que se confirman con los que obtuvieron Lodeiros *et al.* (1991) y Suminto & Hirayama (1996) en estudios sobre la diversidad bacteriana presente en cultivos de microalgas marinas.

También, Lodeiros *et al.* (1991), aislaron 206 cepas bacterianas representantes de los géneros *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lucibacterium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Moraxella sp.*, *Aeromonas sp.*, *Cytophaga sp.*, *Agrobacter sp.* y *Acinetobacter sp.* a partir de cultivos microalgales de *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *T. suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Nannocloris oculata*, *Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas virginica*, *Phytomonas sp.*, *Platinomonas sp.*, *Isochrysis tahitiana*, *Thalassiosira pseudonana* y *Skeletonema costatum*. Sin embargo, en estudios realizados en cultivos de *Chaetoceros gracilis* por Suminto & Hirayama (1996) la presencia de las cepas *Flavobacterium* DN-10, *Alteromonas* D-4 y D-1, *Micrococcus* DN-11 y DY-7, *Moraxella* DN-18 y DY-12, *Vibrio* DM-6 y DN-5 y *Bacillus* DM-9 y DY-13 favorecen el crecimiento de esta microalga, además de conferirle actividad antibacteriana ante agentes patógenos.

Por otra parte, García & Rodríguez (1987) encontraron los géneros *Moraxella* y *Acinetobacter* en cultivos de *Chaetoceros ceratosporum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chui*, *T. tetrathele*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Thalassiosira sp.*, los cuales constituyen resultados importantes si tenemos en cuenta que estas microalgas sirven de alimento a los estadios larvales del camarón. Estos mismos autores plantean que *Moraxella* ha sido aislada de tejidos y hemolinfa de camarones enfermos y que *Acinetobacter* se ha asociado con la mortalidad de peneidos, como consecuencia de una deficiencia de ácido ascórbico.

Es importante señalar que en los cultivos de *Chaetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis suecica* se identificó el patógeno primario *Aeromonas salmonicida* (McCarthy, 1978). Este microorganismo en ambos cultivos fue el menos frecuente, por lo que se pudiera considerar como contaminante, según planteó Medellín (2003), al encontrar bacterias patógenas con baja frecuencia de aparición en *Tetraselmis suecica*. No obstante, es de mencionar que estudios de taxonomía bacteriana en cultivos de microalgas han logrado identificar hasta nivel de género a *Aeromonas sp.* (Lodeiros *et al.*, 1991; Rico-Mora & Voltolina, 1995) en cultivos de *Skeletonema costatum*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, lo cual pudiera sugerir que estas bacterias forman parte de la microbiota de estas microalgas.

La presencia bacteriana en cultivos de microalgas ha sido objeto de análisis por parte de diversos investigadores. Riquelme *et al.* (1988); Fukami *et al.*, (1997), y Avendaño-Herrera & Riquelme (1999) observaron que las bacterias *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Xanthomona sp.* son promotoras del crecimiento en *Asterionella gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Oscillatoria sp.* y *Nitzschia sp.*, en cambio Sakata (1990); Imai *et al.* (1991) y Fukami *et al.* (1992) demostraron que cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Cytophaga sp.*,

Saprospira sp. y *Flavobacterium sp.* 5N-3 presentaron actividad algicida ante *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Chattonella antiqua* y *C. marina*.

Detección de la actividad antibacteriana

De las 70 cepas evaluadas, 18 (25,7 %) (TABLA 3) fueron capaces de inhibir el crecimiento de, al menos, una de las cepas patógenas ensayadas, 11 (15,7 %) inhibieron entre una y dos cepas, cuatro (5,7 %) inhibieron el crecimiento de tres cepas patógenas y tres (4,3 %) a cuatro de ellas. El resto de las cepas (34), que representó el 48,6 %, no presentó actividad antibacteriana.

Las cepas que mostraron dicha actividad se comportaron del modo siguiente: cuatro cepas positivas frente a *V. vulnificus* ATCC 27562; cinco frente a *V. ordalii* NCIMB 2167; *V. parahemolyticus* ATCC 17803 y *V. splendidus* ATCC 33125; seis frente a *V. metschnikovii* ATCC 11170; siete frente a *V. campbellii* ATCC 25920 y nueve cepas frente a *V. anguillarum* ATCC 19264 (TABLA 3).

Es de destacar que los 18 aislados con actividad antibacteriana pertenecieron al género *Bacillus* (TABLA 3), y que la cepa *B. megaterium* que se encontró en *Chaetoceros ceratosporum*, junto a dos cepas de *B. cereus* que se aislaron de *Thalassiosira sp.* y *Tetraselmis suecica*, fueron las que presentaron mayor capacidad antibiótica, ya que mostraron actividad antibacteriana frente a cuatro cepas indicadoras. Esto coincide con lo planteado por Casula & Cutting (2002), Newai-Fyzul *et al.* (2007) y Li *et al.* (2009) quienes afirmaron que los bacilos esporulados Gram-positivos de origen marino son potentes productores de sustancias biológicamente activas, debido a la capacidad que tienen estos microorganismos de sobrevivir a condiciones adversas.

Otros autores han descrito que las bacterias presentes en los cultivos de *Chaetoceros brevis*, *C. diadema*, *C. lauderi*, *C. protuberans* y *Tetraselmis suecica* son las responsables de producir compuestos con actividad antibacteriana capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrios* patógenos: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fisheri*, *V. parahemolyticus* y *V. salmonicida* (Viso *et al.*, 1987; Austin & Day, 1990; Lodeiros *et al.*, 1991; Austin *et al.*, 1992; Lenz & Bassler, 2007; Venkatesan *et al.*, 2007).

Por otra parte, Schulze *et al.* (2006) aíslan los microorganismos probióticos *Acinetobacter johnsonii* X89775, *Pseudomonas fluorescens* AY628693, *Stenotrophomonas maltophilia* AY367030 y *Pseudomonas putida* AF094745 en cultivos de las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis*, *Isochrysis tahitiana* y *Skeletonema costatum* respectivamente. Este grupo de

investigadores demuestran los diferentes roles que tienen los probióticos en los sistemas de cultivos de organismos marinos como son: incremento y mejoramiento de la nutrición por la incorporación de

nutrientes y enzimas esenciales, obtención directa de materia orgánica transformada por bacterias y producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas.

TABLA 3. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas frente a patógenos

Especies	Origen	V.a	V.c	V.m	V.o	V.p	V.s	V.v
<i>Bacillus alvei</i>	Ch.c	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	Th.x	+++	++	+	-	-	-	+++
<i>Bacillus cereus</i>	Te.s	+	-	-	++	+++	++	-
<i>Bacillus cereus</i>	Ch.m	++	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	Th.x	-	++	+++	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	Th.x	+++	-	-	-	-	++	-
<i>Bacillus firmus</i>	Na.x	++	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	Am.x	-	-	-	++	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	Am.x	++	++	-	-	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i>	Te.s	-	-	++	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	Na.x	-	+++	++	-	-	+++	-
<i>Bacillus megaterium</i>	Ch.c	-	++	+++	-	++	-	+
<i>Bacillus polymyxa</i>	Ch.m	++	-	-	++	-	-	++
<i>Bacillus polymyxa</i>	Th.w	-	++	-	-	-	+++	-
<i>Bacillus smithii</i>	Te.s	++	-	-	++	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	Na.x	-	+++	++	-	-	+++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	Ch.c	-	-	-	++	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Am.x	+++	-	-	-	++	-	-

Diámetro de halos de inhibición (mm): +: 11- 15; ++: >15-20; +++: > 20; -: no inhibición.

V.a: *Vibrio anguillarum* ATCC19264; V.c: *Vibrio campbellii* ATCC 25920; V.m: *Vibrio metschnikovii* ATCC 11170; V.o: *Vibrio ordalii* NCIMB 2167; V.p: *Vibrio parahemolyticus* ATCC 17803; V.s: *Vibrio splendidus* ATCC 33125; V.v: *Vibrio vulnificus* ATCC 27562; Am.x: *Amphora sp.*; Ch.c: *Chaetoceros ceratosporum*; Ch.m: *Chaetoceros muelleri*; Na.x: *Navicula sp.*; Te.s: *Tetraselmis suecica*; Th.x: *Thalassiosira sp.*; Th.w: *Thalassiosira weissflogii*.

La búsqueda y aislamiento de bacterias marinas con actividad antagonista sobre microorganismos patógenos marinos y terrestres se ha desarrollado a partir de diversos hábitats como agua de mar, sedimentos, fitoplancton, entre otros. Estas interacciones antagonistas de tipo bacteria-bacteria, que involucran inhibición del crecimiento, corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la composición de especies bacterianas a nivel de microescala, ya sea mediante la competencia por nutrientes, espacio, luz y/o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios, entre ellos sustancias antibacterianas (Dopazo *et al.*, 1988; Gómez-León *et al.*, 2005; Snoussi *et al.*, 2006; Thompson & Swings, 2006; Urbanczyk *et al.*, 2007; Leyton & Riquelme, 2008).

Además, en los últimos años se ha hecho evidente la creciente resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas a los antibióticos comerciales comúnmente empleados (Urakawa & Rivera, 2006; Ji *et al.*, 2008), por lo que se impone la necesidad de buscar nuevos antibióticos y con ello la exploración de ambientes tradicionalmente no explotados para tales fines, como es precisamente el medio marino (Blunt *et al.*, 2003). El elevado porcentaje de cepas con capacidad antibacteriana que se encontraron en la presente investigación puede ser valorado como un controlador efectivo para mantener los cultivos saludables.

El presente estudio determinó la ubicación taxonómica hasta nivel de especie y la actividad antibacteriana frente a patógenos muy sensibles para la acuicultura de

la microbiota asociada a cultivos de microalgas marinas que se utilizan en la larvicultura de camarón. Estos resultados sugieren que la utilización de estas microalgas pueden mantener un nivel bacteriano bajo en sistemas de cultivo de organismos marinos, previniendo así algunas enfermedades, además de brindar aportes nutricionales. Sin embargo, para determinar la utilidad de uno u otro monocultivo con tal fin, es necesario realizar estudios más exhaustivos, referentes tanto a la potencialidad antibiótica de las bacterias asociadas, como a la proporción de dichas sustancias, sin olvidar la propia producción de antibióticos por las microalgas, la cual ha sido constatada por varios investigadores (Austin *et al.*, 1995; Naviner *et al.*, 1999; Salvensen *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2000; Tendencia & De la Peña, 2003).

REFERENCIAS

- Austin, B. & Day, J. G. (1990). Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio spp.* by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, *90*, 389-392.
- Austin, B., Baudet, E. & Stobie, M. (1992). Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, *15*, 55-61.
- Austin, B., Stuckey, L., Roberston, P., Effendi, I. & Griffith, D. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Journal of Fish Diseases*, *18*, 93-96.
- Avendaño-Herrera, R. & Riquelme, C. E. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research*, *30*, 893-900.
- Band, S. C. (2008). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En B. O. Arredondo & D. Voltolina (Comp.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 1-16). Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria* (3^a ed.). Cambridge, MA: University Press Inc.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. (2003). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *20* (1), 1-48.
- Brown, M. R., Barrett, S. M., Volkmann, J. K., Nearhos, S. P., Nell, G. L. & Allan, G. L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, *143*, 341-360.
- Casula, G. & Cutting, S. M. (2002). Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 2344-2352.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. C., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L. & Toranzo, A. D. (1988). Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, *65*, 97-101.
- Eiler, A., Gonzales-Rey, C., Allen, S. & Bertilsson, S. (2007). Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio spp.* to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Ecology*, *60* (3), 411-418.
- Fábregas, J., Muñoz, A., Otero, A., Barja, J. L. & Romaris, M. (1991). A Preliminary Study on antimicrobial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*, *57* (7), 1377-1382.
- Fukami, K., Nishijima, T. & Ishida, Y. (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on growth of microalgae. *Hidrobiología*, *358*, 185-191.
- Fukami, K., Yuzawa, A., Nishijima, T., Ishida, Y. & Hata, Y. (1992). Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, *58*, 1073-1077.
- García, M. T. & Rodríguez, M. C. (1987). Bacterias Gram negativas en cultivos marinos monoalgales. Boletín Técnico No. 22. Ciudad de La Habana: Empresa Nacional de Acuicultura, Ministerio de la Industria Alimentaria, Cuba.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., Novoa, B. & Figueras, A. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 98-104.
- Harrigan, W. F. & Mc.Cance, M. E. (1968). *Métodos de laboratorios en Microbiología*. España: Academia León Ediciones.
- Imai, I., Ishida, Y., Sawayama, S. & Hata, Y. (1991). Isolation of marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, *57*, 1409.
- Ji, R. X., Zou, W. Z., Hu, S. L. & Yan, Q. P. (2008). Vaccination in three different ways against vibriosis of *Seriola dumerili* caused by *Vibrio hollisae*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *26* (3), 233-237.
- Krieg, N. R. & Holt, J. G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Willkins.

- Lenz, D. H. & Bassler, L. (2007). The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 63 (3), 859-871.
- Leyton, Y. & Riquelme, C. E. (2008). Vibrios in the marine coastal systems. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43 (3), 441-456.
- Li, J., Tan, B. & Mai, K. (2009). Dietary probiotic Bacillus OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291, 35-40.
- Lodeiros, C., Espín, A., Ordaz, Y. & González, C. (1989). Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. *Microbiología Acta Científica Venezolana*, 40, 610-617.
- Lodeiros, C., Campos, V. & Marín, N. (1991). Producción de antibióticos por la flora asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. *Society Natural Science La Salle*, 60, 213-223.
- McCarthy, D. H. (1978). A study of taxonomic status some bacteria currently assigned to the Aeromonas. Disertación doctoral no publicada, Council of National Academic Awards, Reino Unido de la Gran Bretaña.
- Medellín, A. (2003). Estudio de la interacción *Tetraselmis spp.* y las bacterias asociadas a su cultivo. Tesis de Maestría no publicada, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur, México.
- Nacleiro, G., Ricca, E., Sacco, M. & Felice, M. D. (1993). Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 59, 4313-4316.
- Naviner, M., Bergé, J. P., Durand, P. & Le Bris, H. (1999). Antibacterial activity of marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174, 15-24.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyunz, A. A., Mutani, A., Ramsudhag, Brunt, J. & Austin, B. (2007). Bacillus subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1699-1706.
- Olsen, A. I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T. H., Skhermo, J. *et al.* (2000). Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 190, 11-25.
- Oppenheimer, C. H. & ZoBell, C. E. (1952). Maintenance of marine bacteria. *Journal of Marine Research*, 11, 10-18.
- Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J. L., Plusquellec, A. & Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biological Annual Review*, 28, 277-352.
- Rico-Mora, R. & Voltolina, D. (1995). Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae) culture. *Acquacoltura*, 30, 105-109.
- Ringo, E. (2008). The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research*, 39, 171-180.
- Riquelme, C. E., Fumaki, K. & Ishida, Y. (1988). Effects of bacteria on the growth of a marine diatom, *Asterionella glacialis*. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 3, 29-34.
- Riquelme, C. E. & Avendaño-Herrera, R. E. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76 (4), 725-736.
- Rojas, R., Miranda, C. D. & Amaro, A. M. (2009). Pathogenicity of a highly-producing exopolysaccharide Halomonas strain causing epizootics in larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microbial Ecology*, 57 (1), 129-139.
- Sakata, T. (1990). Occurrence of marine *Saprospira sp.* possessing algicidal activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 1165.
- Salvensen, I., Reitan, K. I., Skjermo, J. & Oie, G. (2000). Microbial environment in marine larviculture: Impact of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International*, 8, 275-287.
- Sardesai, Y. & Bhosle, S. (2003). Isolation of an organic-solvent-tolerant cholesterol-transforming *Bacillus* species, BC1, from coastal sediment. *Journal of Marine Biotechnology*, 5 (2), 116-118.
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R. & Miller, K. M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256, 50-73.
- Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Snoussi, M., Chaieb, K. & Bakhrouf, A. (2006). Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery. *Annals of Microbiology*, 56 (4), 289-293.
- Suminto, Y. & Hirayama, K. (1996). Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fish Science Journal*, 62, 40-43.
- Tendencia, E. A. & de la Peña, E. (2003). Investigation of some component of green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture*, 218, 115-119.
- Thompson, F. L. & Swings, J. (2006). *Taxonomy of the vibrios. The biology of vibrios*. (pp. 29-43). Washington, D. C.: American Society of Microbiology.

- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. & Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Journal of Marine Biotechnology*, *10*, 1-12.
- Urakawa, H. & Rivera, I. N. (2006). *Aquatic environment. The biology of vibrios*. (pp. 175-189). Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*, 2823-2829.
- Venkatesan, R., Karthikayen, R. & Periyayagi, R. (2007). Antibacterial activity of the marine diatom, *Rhizosolenia alata* (Brightwell, 1858) against human pathogens. *Research Journal of Microbiology*, *2* (1), 98-100.
- Viso, A. C., Pesando, D. & Baby, C. (1987). Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Botánica Marina*, *30*, 41-45.
- Yang, Y., Iji, P. A. & Choct, M. (2009). Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*, *65*, 97-114.
- Zhou, Z., He, S., Liu, Y., Shi, P., Huang, G. & Yao, B. (2009). The effects of dietary yeast culture or short-chain fructo-oligosaccharides on the intestinal autochthonous bacterial communities in juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *40*, 450-459.
- Zhuang, W., Tay, J., Maszenan, A., Krumholz, L. & Tay, S. (2003). Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Letters in Applied Microbiology*, *36* (4), 51-257.