



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PIGMENTOS Y ÁCIDOS  
GRASOS DE DIATOMEAS Y DINOFLAGELADOS.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Luis Toledo Tellez**

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 6 del Mes de febrero del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### "Actividad antibacteriana de pigmentos y ácidos grasos de diatomeas y dinoflagelados"

Presentada por el alumno:

**Luis Toledo Tellez**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de Tesis



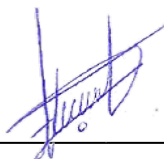
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Co-Directora de Tesis



Dra. Paola Magallón Servín  
Co-Tutora de Tesis



Dr. José Carlos Espinoza Hicks  
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 08 de febrero de 2023

Los Miembros del comité del estudiante Luis Toledo Tellez del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate.
- Filtros utilizados:  
Excluir citas y bibliografía
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla



Citas excluidas 4%  
Bibliografía excluida SIMILAR

### Resumen de Coincidencias

Rank	Source	Words	Copy Date	Similarity
2	Internet	228 palabras	Copiado el 10-Dic-2022 <a href="http://www.solabiaa.org">www.solabiaa.org</a>	1%
3	Internet	47 palabras	Copiado el 18-Oct-2022 <a href="http://repositorio.una.ac.cr">repositorio.una.ac.cr</a>	<1%
4	Internet	21 palabras	Copiado el 01-Dic-2020 <a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a>	<1%
5	Internet	19 palabras	Copiado el 26-Ene-2022 <a href="http://www.edf.org">www.edf.org</a>	<1%
6	Crossref	14 palabras	Andrea Peano, Massimo Beccati, Elisa Chiavassa, Mario Pasquetti. "Evaluation of the antifungal susceptibility of to	<1%
7	Crossref	13 palabras	Shekhar U. Kadam, Brijesh K. Tiwari, Colm P. O'Donnell. "Application of Novel Extraction Technologies for Bioacti...	<1%
8	Internet	13 palabras	Copiado el 11-Nov-2020 <a href="http://doku.pub">doku.pub</a>	<1%
9	Internet	13 palabras	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>	<1%
10	Internet	11 palabras	Copiado el 18-Ene-2022 <a href="http://sistemas.cibnor.mx">sistemas.cibnor.mx</a>	<1%
11	Internet	11 palabras		<1%

### Firmas del comité



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de tesis



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Co-Directora de tesis



Dra. Paola Magallón Servín  
Co-tutora



Dr. José Carlos Espinoza Hicks  
Co-tutor

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Paola Magallón Servín  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutora de Tesis

Dr. José Carlos Espinoza Hicks  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Dra. Paola Magallón Servín  
Dr. José Carlos Espinoza Hicks

### **Jurado de Examen**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Dra. Paola Magallón Servín

### **Suplente**

Dr. José Carlos Espinoza Hicks

## Resumen

Un uso indiscriminado de antibióticos en los sistemas acuícolas marinos es una de las causantes de que las bacterias patógenas presenten multi-resistencia. Los ácidos grasos y pigmentos fotosintéticos se han identificado como compuestos bioactivos con potencial antibacteriano. Los dinoflagelados y diatomeas son microalgas que producen variedad de pigmentos y son productores de ácidos grasos que suelen constituir del 15 al 25% de su biomasa. El objetivo fue evaluar el potencial antibacteriano de extractos de lípidos y pigmentos totales de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*, y las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, contra las bacterias *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los microorganismos se cultivaron en medios específicos y en condiciones de laboratorio. La cuantificación de lípidos totales (LT), ácidos grasos y pigmentos fue realizada por espectrofotometría, cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía de líquidos (HPLC-DAD), respectivamente. La actividad antibacteriana fue evaluada por el método de resazurina. El pigmento que predominó en las cuatro microalgas fue la clorofila *a*, y en las diatomeas se identificó la fucoxantina y en dinoflagelados la peridininina, así como el  $\beta$ -caroteno que se presentó en menor porcentaje. *A. margalefii* tuvo el mayor porcentaje de lípidos totales, así como el de ácidos grasos saturados. *G. catenatum* y *O. aurita* la mayoría de sus ácidos grasos fueron poliinsaturados, y en *N. shiloi* fueron los ácidos grasos monoinsaturados. Los pigmentos de *G. catenatum* inhibieron a *E. coli* en un 28-60%. Los extractos lipídicos de *A. margalefii* y *G. catenatum* inhibieron un 87% y 89% respectivamente a *S. aureus*; los LT de *O. aurita* y *N. shiloi*, inhibieron a *E. coli* en un 50% y 65%; *V. parahaemolyticus* fue inhibida en un 33.6 % con los LT de *A. margalefii*. Se presentó una mayor efectividad de los extractos contra bacterias Gram positivas, lo cual podría estar dado por las diferencias que existen en la estructura y composición de la pared celular de las bacterias.

**Palabras clave:** microalgas, antibacterianos, pigmentos, ácidos grasos.

ORCID: 0000-0002-2351-1378

Vo.Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

## Summary

Indiscriminate use of antibiotics in marine aquatic systems could result in pathogen bacteria showing multi-resistance. Fatty acids and photosynthetic pigments have been identified as potentially antibacterial bioactive compounds. Dinoflagellates and diatoms are microalgae that produce a variety of pigments as well as fatty acids. The latter usually constitute from 15% to 25% of their biomass. The objective was to assess the antibacterial potential of lipid extracts and total pigments from the dinoflagellates *Alexandrium margalefii* and *Gymnodinium catenatum* and from the diatoms *Odontella aurita* and *Nanofrustulum shiloi* against the bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The microorganisms were cultivated in specific media and laboratory conditions. The quantification of Total Lipids (LT), Fatty Acids and pigments was carried out by spectrophotometry, gas chromatography (GC-FID) and liquid chromatography (HPLC-DAD) respectively. Antibacterial activity was assessed by the resazurin method. The predominant pigment in the four microalgae was chlorophyll *a*, in the diatoms fucoxanthin was identified as well as peridinin in dinoflagellates,  $\beta$ -carotene appeared but in a lower percentage. *A. margalefii* had the higher total lipids percentage and saturated fatty acids. About *G. catenatum* and *O. aurita* most of their fatty acids were polyunsaturated. In *N. shiloi* were the monounsaturated fatty acids. The pigments in *G. catenatum* inhibited *E. coli* by 28-60%. The lipid extracts from *A. margalefii* and *G. catenatum* inhibited *S. aureus* by 87% and 89% respectively; the LT in *O. aurita* and *N. shiloi*, inhibited *E. coli* by 50% and 65%; *V. parahaemolyticus* was inhibited by 33.6 % by the LT from *A. margalefii*. There was a better effectivity of the extracts against positive Gram bacteria. Such could be given by the existing differences in structure and composition of the bacteria cell wall.

**Keywords:** microalgae, antibacterial, pigments, fatty acids.

ORCID: 0000-0002-2351-1378

Vo.Bo. Co-Directoras de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

## Dedicatoria

**Mi familia**

**Malkia** 

## **Agradecimientos**

Al CONACyT por la beca 2020/773270 para cursar la Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme llevar a cabo mis estudios en la Institución.

A mi Comité Tutorial: Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz, Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dra. Paola Magallón Servín, y Dr. José Carlos Espinoza Hicks por su apoyo y consejos en el transcurso de la maestría.

Al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas en el cultivo, cosecha y procesamiento de la biomasa de las microalgas.

Al Laboratorio de Alimento vivo: Técnicos Julián Garzón y Gabriel González en el cultivo de las microalgas.

Al Cepario: Técnico Q.F.B Marte Virgen por las cepas de las diatomeas con las que se trabajó.

Al Laboratorio de Microalgas Nocivas: Dr. Francisco Hernández Sandoval en el análisis HPLC-DAD de los pigmentos totales.

Al Laboratorio de Metabolismo de Lípidos: Dra. Elena Palacios y M.C. Olivia Arjona en el análisis de GC-FID de ácidos grasos.

Al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico: Dra. Norma A. Ochoa Álvarez en el trabajo con bacterias y análisis de pruebas antibacterianas.

Al Laboratorio de Especialidades Microbiológicas: Dr. Martín Ramírez en el trabajo con bacterias y análisis de pruebas antibacterianas.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal: M.C. Margarito Rodríguez con sus conocimientos con la técnica de resazurina.

A la M.C. Mélissa Gonçalves en la reactivación y siembra de bacterias.

A la M.C. Marie Grisel por su apoyo en laboratorio.

A mi amiga y compañera de laboratorio la M.C. Mónica B. Félix Castro.

A mi amiga y roomie la M.C. Ilse K. Barraza Soltero.

A mis amigos.

A mi familia.



## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras .....	vii
Lista de tablas .....	viii
Abreviaturas .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Acuicultura e infecciones bacterianas.....	1
1.2 Características generales de las bacterias patógenas marinas.....	1
1.2.1 <i>Vibrio</i> spp.....	2
1.2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	3
1.3 Las microalgas como fuente de compuestos antibacterianos.....	3
1.3.1 Pigmentos fotosintéticos .....	4
1.3.1.1 Clorofilas.....	4
1.3.1.2 Carotenoides .....	5
1.3.2 Lípidos .....	6
1.3.2.1 Ácidos grasos.....	6
1.4 Lípidos y pigmentos en diatomeas y dinoflagelados .....	7
1.4.1 <i>Nanofrustulum shiloi</i> (J.J. Lee, Reimer & McEnery) Round, Hallsteinsen & Paasche, <i>Nannofrustulum shiloi</i> 1999 .....	8
1.4.2 <i>Odontella aurita</i> (Lyngbye) C. Agardh 1832.....	8
1.4.3 <i>Alexandrium margalefii</i> (Balech, 1994).....	9
1.4.4 <i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943) .....	9
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
2.1 Compuestos bioactivos antibacterianos de diatomeas y dinoflagelados.....	11
2.2 Lípidos y ácidos grasos como antibacterianos .....	12
2.3 Pigmentos fotosintéticos como antibacterianos .....	14
2.4 Compuestos antibacterianos utilizados contra <i>V. parahaemolyticus</i> .....	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares .....	18
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
6.1 Material biológico y condiciones de cultivo .....	19
6.1.1 Microalgas .....	19
6.1.2 Bacterias.....	20
6.2 Recuento celular de las microalgas.....	20
6.3 Peso seco total, orgánico e inorgánico de las microalgas.....	20
6.4 Extracción de pigmentos totales.....	22
6.6 Cuantificación de pigmentos por HPLC-DAD .....	23

6.7 Extracción lípidos totales .....	24
6.8 Cuantificación de lípidos totales por métodos espectrofotométricos .....	25
6.9 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID.....	25
6.10 Extracción de lípidos para la evaluación de antibacterianos .....	26
6.11 Extracción de pigmentos para la evaluación de antibacterianos .....	26
6.12 Curvas de crecimiento bacteriano .....	27
6.13 Evaluación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina.....	27
6.14 Análisis estadísticos.....	29
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
7.1 Peso seco total, orgánico e inorgánico de las diatomeas y dinoflagelados.....	30
7.2 Pigmentos totales por espectrofotometría.....	30
7.3 Cuantificación e identificación de pigmentos totales por HPLC-DAD.....	31
7.4 Cuantificación lípidos totales por espectrofotometría .....	32
7.5 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID.....	32
7.6 Curvas de crecimiento bacteriano .....	35
7.7 Evaluación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina.....	37
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
8.1 Pigmentos en <i>O. aurita</i> , <i>N. shiloi</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>A. margalefii</i> .....	40
8.2 Lípidos totales en <i>O. aurita</i> , <i>N. shiloi</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>A. margalefii</i> .....	41
8.3 Ácidos grasos en <i>O. aurita</i> , <i>N. shiloi</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>A. margalefii</i> .....	41
8.4 Propiedades antibacterianas de pigmentos y ácidos grasos .....	44
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>48</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>58</b>
ANEXO A .....	58
ANEXO B.....	59

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de la clorofila (Aramrueang <i>et al.</i> , 2019). .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura de la fucoxantina (Zhang <i>et al.</i> , 2015).....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura de los ácidos grasos (Rustan y Drevon, 2005).....	7
<b>Figura 4.</b> Cadenas de células vivas de <i>Nanofrustulum shiloi</i> observadas a 40 X en el microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR. Fotografía tomada por Brenda Portuguese Solano.....	8
<b>Figura 5.</b> Célula de <i>Odontella aurita</i> observada a 40 X en el microscopio compuesto de luz con contraste de fases y con cámara moticom 2000 (2.0 Pixel USB 2.0). Foto tomada por Marie Grisel (28/4/22).....	9
<b>Figura 6.</b> Célula de <i>Alexandrium margalefii</i> . Micrografía tomada por la Dra. Lourdes Morquecho (CODIMAR). Escala de la barra 10 $\mu\text{m}$ .....	9
<b>Figura 7.</b> Células de <i>Gymnodinium catenatum</i> formando cadenas. Micrografía tomada por la Dra. Lourdes Morquecho (CODIMAR). Escala de la barra 20 $\mu\text{m}$ .. ..	10
<b>Figura 8.</b> Divisiones de cámara Neubauer. ....	27
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas. ....	36
<b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> . La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas. ....	36
<b>Figura 11.</b> Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> . La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas. ....	37

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de trabajo del HPLC-DAD para la determinación de pigmentos. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Características del gradiente de solventes.....	24
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones probadas en las pruebas antimicrobianas realizadas en microplaca con la prueba de resazurina ( $\mu\text{g}$ por pozo en un volumen total de $150 \mu\text{L}$ ).....	29
<b>Tabla 4.</b> Peso seco total, orgánico e inorgánico y porcentaje de cenizas de las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> . Los resultados representan la media $\pm$ desviación estándar.....	30
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>c</i> ( $c_1 + c_2$ ) y carotenos de las diatomeas <i>Nanofrustulum shiloi</i> y <i>Odontella aurita</i> , y los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> . Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar. ....	30
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de pigmentos totales con respecto al peso seco de las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> . Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar. ....	32
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de lípidos totales respecto al peso seco de las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	32
<b>Tabla 8.</b> Composición total de ácidos grasos con respecto al peso seco de las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> . Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar. ....	34
<b>Tabla 9.</b> Porcentajes de inhibición de los extractos de pigmentos totales por el método de resazurina de las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	38
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de inhibición de los extractos totales lípidos totales por el método de resazurina las diatomeas <i>Odontella aurita</i> y <i>Nanofrustulum shiloi</i> , y de los dinoflagelados <i>Alexandrium margalefii</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	39
<b>Tabla A1.</b> Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) del ácido docosaheptaenoico (DHA) en distintas bacterias y solventes utilizados. ....	58
<b>Tabla A2.</b> Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) del ácido eicosapentaenoico (EPA) en distintas bacterias y solventes utilizados. ....	58
<b>Tabla A3.</b> Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de clorofila <i>a</i> en distintas bacterias y solventes utilizados. ....	58
<b>Tabla A4.</b> Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de carotenos en distintas bacterias y solventes utilizados. ....	59
<b>Tabla B1.</b> Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados de la diatomea <i>Odontella aurita</i> del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-". ....	59
<b>Tabla B2.</b> Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados de la diatomea <i>Nanofrustulum shiloi</i> , del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-". ....	60
<b>Tabla B3.</b> Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i> del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-". ....	61

**Tabla B4.** Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados del dinoflagelado *Alexandrium margalefii* del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-". .....62

## Abreviaturas

<b>μg</b>	microgramo
<b>μL</b>	microlitro
<b>μm</b>	micrómetro
<b>μmol</b>	micromol
<b>A</b>	absorbancia
<b>AG</b>	ácidos grasos
<b>AGAI</b>	ácidos grasos altamente insaturados
<b>AGP</b>	ácidos grasos poliinsaturados
<b>AGS</b>	ácidos grasos saturados
<b>AMI</b>	ácidos grasos monoinsaturados
<b>BHT</b>	butil hidroxitolueno
<b>C</b>	centígrado
<b>Cél</b>	célula
<b>Chl</b>	clorofila
<b>CN</b>	caldo nutritivo
<b>DHA</b>	ácido docosahexaenoico
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>EPA</b>	ácido eicosapentaenoico
<b>g</b>	gramo
<b>GC-FID</b>	cromatografía de gases con ionización de flama
<b>GMA</b>	grupo de microbiología ambiental
<b>h</b>	hora
<b>HPLC-DAD</b>	cromatografía líquida de alta eficacia con detector de diodos
<b>HTA</b>	ácido hexadecanoico
<b>L</b>	litro
<b>LT</b>	lípidos totales
<b>m</b>	metro
<b>mg</b>	miligramo
<b>MIC</b>	concentración mínima inhibitoria
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>MUFA</b>	ácidos grasos monoinsaturados
<b>nm</b>	nanómetro
<b>mL</b>	mililitro
<b>MUFA</b>	ácidos grasos monoinsaturados
<b>nm</b>	nanómetro
<b>pg</b>	picogramo
<b>PSC</b>	peso del filtro con la muestra incinerada
<b>PSF</b>	peso seco del filtro sin muestra
<b>PSFM</b>	peso del filtro de muestra
<b>PSI</b>	peso seco inorgánico
<b>PSO</b>	peso seco orgánico
<b>PST</b>	peso seco total

<b>PT</b>	pigmentos totales
<b>PUFA</b>	ácidos grasos poliinsaturados
<b>s</b>	segundos
<b>SAFA</b>	ácidos grasos saturados
<b>T</b>	tiempo
<b>TR</b>	tiempo de retención
<b>TSA</b>	agar soya tripticasa
<b>TSB</b>	caldo soya tripticasa
<b>VF</b>	volumen de muestra filtrado
<b>ω</b>	omega

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Acuicultura e infecciones bacterianas**

La importancia de la industria de la acuicultura ha aumentado en los últimos años, ya que se considera que proveerá de alimento a una población en crecimiento que llegará a 9.8 miles de millones de personas para el año 2050. Esta práctica ha crecido más que cualquier otro sector de producción animal, en respuesta a la contaminación de los mares, la sobrepesca y por efectos del cambio climático que han impactado a las poblaciones de organismos marinos en sistemas naturales (Santos y Ramos, 2018). Por otro lado, el rápido crecimiento e intensificación de los sistemas acuícolas marinos ha afectado la calidad y seguridad de los organismos, aumentando la incidencia de infecciones bacterianas en estanques de criadero, pre-engorda y engorda, provocando diversas enfermedades en peces, moluscos y crustáceos, causando mortalidades masivas y pérdidas económicas considerables (Falaise *et al.*, 2016; Santos y Ramos, 2018; OIE, 2009).

Una solución aparente a este problema ha sido la aplicación de antibióticos en forma de metafilaxis y profilácticos (Carvalho *et al.*, 2012). Por otro lado, con frecuencia se ha realizado de manera indiscriminada, el uso combinado de antibióticos, independientemente de que no haya una aparente infección en los organismos, lo que provoca la selección y proliferación de bacterias resistentes a estos antibióticos (Defoirdt *et al.*, 2011; Reverter *et al.*, 2020).

### **1.2 Características generales de las bacterias patógenas marinas**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre y su tamaño suele ser entre 0.5-3  $\mu\text{m}$ ; algunas especies suelen llegar a los 10  $\mu\text{m}$ . Forman parte de reino procariota y su pared celular, dependiendo de la rigidez, determina la forma celular. Se clasifican como cocos, bacilos y espirilos (Pírez y Mota, 2006). La pared celular les permite llevar a cabo funciones vitales durante su ciclo de vida, al igual se les puede atribuir su capacidad de ser patógenas. Pueden estar clasificadas en Gram positiva y Gram negativa. En las bacterias Gram positivas, la pared celular está constituida principalmente por peptidoglicano (o mureína), que llega a constituir hasta el 90% de los compuestos. Al ser un



compuesto relativamente poroso, la mayoría de las sustancias pueden pasar a través de la pared celular (Bruslind, 2019).

La pared celular de las bacterias Gram negativas son más complejas, ya que están constituidas por una mayor cantidad de componentes. El peptidoglicano constituye entre el 5-10% del total, y este tipo de bacterias tienen una membrana externa, compuesta de una bicapa lipídica, similar a la membrana celular. Esta membrana suele mantener fuera a ciertas moléculas, como son los antibióticos y toxinas (Bruslind, 2019). La mayoría de las bacterias marinas pertenecen a este grupo de las cuales destacan los géneros *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp., y *Pseudomonas* spp. Las bacterias patógenas marinas se pueden encontrar ya sea suspendidas en el agua, asociadas a partículas, en el sedimento del lecho marino o en los cuerpos o células de los organismos marinos (Belkin y Colwell, 2005).

### **1.2.1 *Vibrio* spp.**

El género *Vibrio* son bacterias Gram negativas, con forma de bacilo o curvados, con un tamaño de 0.5  $\mu\text{m}$  por 1.3-3  $\mu\text{m}$ . Son anaerobios facultativos, móviles con un solo flagelo polar. Se distribuyen ampliamente en ambientes acuáticos, crecen en un rango amplio de temperatura (20°C a 40°C) y en condiciones alcalinas. Estos microorganismos se caracterizan por infectar animales marinos, en especial si están bajo condiciones de estrés. Existen 12 especies de *Vibrio* que causan infecciones intestinales en humanos (Farmer y Hickman-Brenner, 2003; Percival y Williams, 2014). *Vibrio* es uno de los principales causantes de enfermedades bacterianas en organismos acuáticos, son clasificados como oportunistas, cuando los hospedadores tienen el sistema inmune comprometido, también en consecuencia del estrés provocado por la intensificación de los sistemas marinos. En camarones las especies causantes de enfermedades son *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *V. splendidus*. Las asociadas a enfermedades en peces son igual *V. anguillarum*, *V. vulnificus* al igual que *V. salmonicida* (Novriadi, 2016).

### **1.2.2 *Vibrio parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria patógena Gram negativa, que suele encontrarse en ecosistemas marinos y estuarinos (Pozo-Miranda y Pinoargote Véliz, 2021). Recientemente se ha reportado que esta bacteria presenta un incremento de resistencia a antibióticos, aumentando el riesgo a la salud causando infecciones gastrointestinales, y también en la industria de la acuicultura al presentarse la especie patógena de *Vibrio* más abundante en sistemas marinos (Mok *et al.*, 2021). Es causante de la necrosis hepatopancreática en camarones (Novriadi, 2016). La presencia de esta enfermedad a causa de *V. parahaemolyticus* ha sido registrada en México desde el 2013 en cultivos de camarón en el noroeste, en estados como Nayarit, Sinaloa y Sonora, provocando pérdidas de 80% en el inicio de los cultivos (Galaviz-Silva, 2021).

### **1.3 Las microalgas como fuente de compuestos antibacterianos**

Las microalgas son un diverso grupo, que incluye las células procariotas como eucariotas microscópicas (2-200  $\mu\text{m}$ ), y en su mayoría son organismos fotosintéticos oxigénicos. Pueden crecer de modo autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Fijan el  $\text{CO}_2$  y utilizan la energía solar para producir biomasa. Son las principales productoras primarias del planeta, responsables de casi la mitad del  $\text{CO}_2$  fijado anualmente. Son de gran importancia ecológica, además de ser la base de la alimentación en la cadena trófica (Witte, 2011; Virgen-Félix y Lora-Vilchis, 2017). Las microalgas en su mayoría se reproducen por fisión binaria (Zachleder *et al.*, 2016).

Las microalgas están clasificadas en más de una docena de grupos basados en su composición de pigmentos fotosintéticos, en los compuestos producidos y almacenados, y en su diversidad estructural. Existen alrededor de 200,000 a millones de especies en el planeta. Poseen una plasticidad metabólica, lo que les permite habitar en una gran diversidad de ambientes, ya sea acuáticos, salobres, terrestres, en la nieve (Singh y Saxena, 2015).

Entre los parámetros más importantes que regulan el crecimiento microalgal se encuentra la calidad y cantidad de nutrientes, luz, pH, turbidez, salinidad, concentración de  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  y temperatura (FAO, 1996). La biomasa microalgal consiste en una importante fuente primaria de

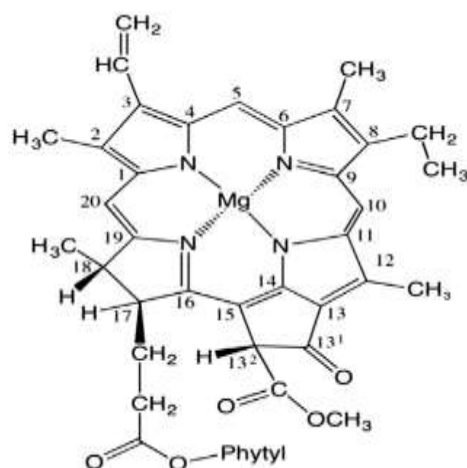
compuestos bioactivos, como carbohidratos, lípidos, proteínas, pigmentos, antioxidantes, etc. Gracias a los avances de las tecnologías de cultivos de microalgas y a su plasticidad metabólica, se pueden someter a diferentes condiciones de cultivo y maximizar la cantidad de compuestos deseados (Jian *et al.*, 2013). Estos metabolitos son un recurso prometedor para diversas aplicaciones en la biotecnología azul (Falaise *et al.*, 2016) así como de gran importancia económica, al ser parte de la alimentación de organismos acuícolas en cultivo (Witte, 2011). Entre los compuestos de importancia para la identificación de nuevos antimicrobianos, se encuentran los pigmentos fotosintéticos y lípidos de diversas microalgas marinas que han mostrado su potencial contra diversas especies de bacterias (Cepas *et al.*, 2021; Grubišić *et al.*, 2022).

### **1.3.1 Pigmentos fotosintéticos**

Los pigmentos de las microalgas son los responsables de la captura de la energía luminosa para ser transferida a los centros de reacción. Están estructurados en forma de complejos antena, los cuales están localizados en los tilacoides de las membranas de los cloroplastos en donde se les localiza. La clorofila *a* es el pigmento fotosintético (por excelencia) común en todas las algas. Las clorofilas presentan un espectro de absorción de luz entre 450-475 nm y 630-675 nm. Sin embargo, las algas presentan también otro tipo de clorofilas y pigmentos accesorios que les permiten un espectro de absorción mayor de la luz, de esta manera pueden abarcar una distribución más profunda en la columna de agua y realizar de manera óptima la fotosíntesis (Dreckmann *et al.*, 2013; Pagels *et al.*, 2020).

#### **1.3.1.1 Clorofilas**

En las microalgas se presentan tres tipos de clorofilas *a*, *b*, *c* ( $c_1$  y  $c_2$ ). La clorofila es una porfirina que contiene un átomo de  $Mg^{+2}$  en el centro del anillo de porfirina que se asocia con lípidos y proteínas hidrofóbicas de las membranas (Fig. 1). Está formada por cuatro anillos pirrólicos, cada uno compuesto por cuatro átomos de carbono y una molécula de nitrógeno. Los cuatro nitrógenos se encuentran en el interior, formando un hueco para un ion, en la mayoría de los casos un ion  $Mg^{++}$ . Las estructuras de la periferia en la clorofila varían (Begum *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Estructura básica de la clorofila (Aramrueang *et al.*, 2019).

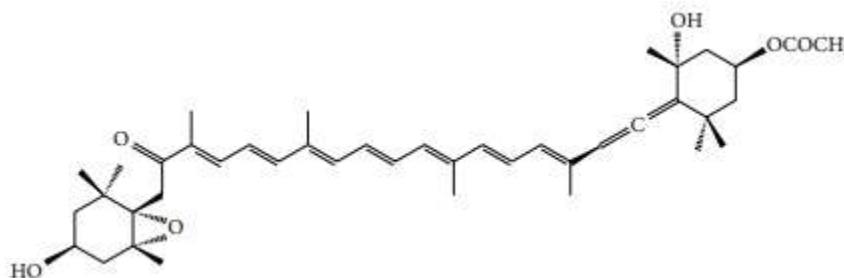
La clorofila *a* absorbe en el rango de luz visible de 432 y 669 nm. La clorofila *b* absorbe a 455 y 644 nm y la clorofila *c* absorbe entre 578-630 nm y 443-450 nm. La clorofila *a* se encuentra en el centro de reacción del aparato fotosintético, en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Las clorofilas están unidos a carotenos, lípidos y lipoproteínas mediante enlaces no covalentes. Debido a su característica hidrofóbica, se extraen mediante solventes orgánicos, como el metanol y la acetona (Yilmaz y Gökmen, 2015).

### 1.3.1.2 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos lipofílicos usualmente de color amarillo, naranja o rojo. Son los pigmentos más diversos que se encuentran en la naturaleza. Son sensibles a la luz, oxígeno y el calor, lo que dificulta su almacenaje y manejo. Sus funciones es absorber la luz y por su naturaleza antioxidante, funcionan como protectores de radicales libres, previenen la peroxidación lipídica y proporcionada estabilidad al aparato fotosintético (Gong y Bassi, 2016). Las microalgas pueden contener entre 5 y 10 carotenoides distintos, y sus bandas de absorción están entre 400 y 540 nm (Arredondo-Vega y Voltolina, 2017).

Son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranilpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes orgánicos apolares. Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo, el  $\beta$ -caroteno (Fig.

2), el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además, oxígeno (por ejemplo, fucoxantina, luteína, otros (Oren, 2011; Moreno *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Estructura de la fucoxantina (Zhang *et al.*, 2015)

### 1.3.2 Lípidos

Los lípidos producidos por las microalgas pueden ser divididos en dos grupos conforme a su estructura: los no polares (acilgliceroles, esteroides, ácidos grasos, ceras y esteril ésteres) y lípidos polares (fosfoglicéridos, glicosilglicéridos y esfingolípidos). Los lípidos toman diferentes roles en el metabolismo y crecimiento de las microalgas. La cantidad de estos lípidos varía entre especies, las condiciones de crecimiento y el ambiente. Se ha reportado que el rango varía entre el 20-50% de su biomasa seca (Chen *et al.*, 2018). También entre los lípidos no polares se encuentran los ácidos grasos libres en una menor cantidad (Mimouni *et al.*, 2018).

#### 1.3.2.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos, con una cadena larga alifática que puede estar saturada o insaturada. Están constituidos por cadenas de 4 a 28 carbonos (Mimouni *et al.*, 2018) (Fig. 3). Dependiendo del número de doble enlaces los ácidos grasos se dividen en saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA con un doble enlace) y poliinsaturados (PUFA, con más de 2 dobles enlaces) (Wang *et al.*, 2017). Los lípidos son almacenados en las algas de distintas formas, dependiendo de la especie y diversos factores. Predominantemente los PUFA comprenden la fracción estructural, a diferencia de los MUFA y los ácidos grasos saturados (SAFA) constituyen los lípidos de almacenamiento (Sajjadi *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Estructura de los ácidos grasos (Rustan y Drevon, 2005)

#### 1.4 Lípidos y pigmentos en diatomeas y dinoflagelados

Las diatomeas (*Bacillariophyceae*) son algas microscópicas que tienen una pared celular conformada por sílice (frústula) y presentan distintivas formas geométricas. Su tamaño celular varía entre 5  $\mu\text{m}$  a 0.5 mm. Pueden ser bentónicas o planctónicas y forman colonias. Las diatomeas son el grupo más diverso, abundante y productivo de los ecosistemas acuáticos, pero también pueden encontrarse en hábitats terrestres. Algunos grupos de diatomeas son capaces de producir hasta un 70% de lípidos de su volumen total (Kale y Karthick, 2015). Los ácidos grasos presentes en este grupo son: el ácido, palmítico y palmitoleico, hexadecanoico, hexadecadienóico, hexadecatrienóico, octadecanoico, octadecenóico, octadecadienóico, octadecatrienóico, eicosatetraenóico, araquidónico, eicosapentaenoico (Kates y Volcani, 1966). Poseen clorofila *a* y *c*, y carotenos como la fucoxantina,  $\beta$ -caroteno, diadinoxantina, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, entre otros (Kuczynska *et al.*, 2015) .

Los dinoflagelados (Dinophyceae) son organismos unicelulares, que pueden tener pared celular llamada teca (tecados) y existen especies desnudas (atecados). Son morfológicamente diversos, tienen estructuras muy particulares que semejan cuernos, alas y otros tipos de estructuras (ornamentos). Las células pueden ser esféricas u ovaladas; varían en tamaño, un promedio de 25 a 35  $\mu\text{m}$  de ancho por 30 a 45  $\mu\text{m}$  de largo. Poseen flagelos lo que favorece la movilidad. Son de naturaleza fototrófica, fagotrófica y mixotrófica. Hay especies que son capaces de formar floraciones algales, en algunos casos, nocivas. Están en hábitats en su mayoría lénticos y también en sistemas salobres y marinos (Hackett *et al.*, 2004; Carty y Parrow, 2015). Se caracterizan por tener ácidos grasos como el ácido palmítico, el octadecatrienóico y el docosahexaenóico. Una característica es que poseen ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (Harrington *et al.*, 1970). Los pigmentos que contienen son la clorofila *a* y *c*<sub>2</sub>, y carotenoides como peridina, diadinoxantina, dinoxantina y  $\beta$ -caroteno (Carty y Parrow, 2015).

Para el presente trabajo se tomaron como modelo de estudio a las diatomeas *Nanofrustulum shiloi* y *Odontella aurita*, y los dinoflagelados *Gymnodinium catenatum* y *Alexander margalefii*.

#### 1.4.1 *Nanofrustulum shiloi* (J.J. Lee, Reimer & McEnery) Round, Hallsteinsen & Paasche, *Nannofrustulum shiloi* 1999

*Nanofrustulum shiloi* es una diatomea que pertenece a la familia Staurosiraceae. Presenta frústula rectangular, que forma colonias entrelazando las espinas marginales; las células tienen un tamaño entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  (Fig. 4) (Sar y Sunesen, 2003; Portuguez, 2020). Este taxón es considerado cosmopolita. Se coloca como una especie eurioica, dado que ha sido encontrada en zonas tropicales y templadas. Es generalmente una especie bentónica, pero puede estar suspendida en la columna de agua por su tamaño (López-Fuerte *et al.*, 2016).



**Figura 4.** Cadenas de células vivas de *Nanofrustulum shiloi* observadas a 40 X en el microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR. Fotografía tomada por Brenda Portuguez Solano.

#### 1.4.2 *Odontella aurita* (Lyngbye) C. Agardh 1832

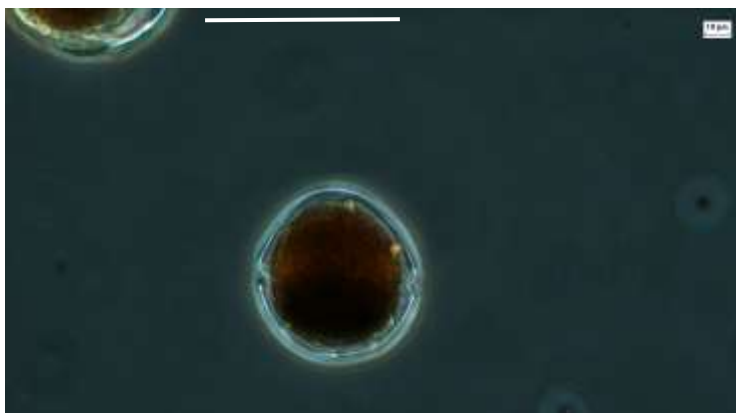
*Odontella aurita* (Familia: Odontellaceae) es una diatomea con una forma similar a una bobina con una longitud de 10-95  $\mu\text{m}$  y son células solitarias (Fig. 5) (Drebes y Schnepf, 1998; Xia *et al.*, 2013a). Se caracteriza por ser una especie marina, nerítica, ticopelágica, eurihalina, euriterma y también como bentónica en agua salobres. Se considera una especie que puede formar floraciones y su distribución se discute como cosmopolita, abundantes en mares árticos y boreales (Ferrario y Sastre, 1990).



**Figura 5.** Célula de *Odontella aurita* observada a 40 X en el microscopio compuesto de luz con contraste de fases y con cámara moticam 2000 (2.0 Pixel USB 2.0). Foto tomada por Marie Grisel (28/4/22).

#### 1.4.3 *Alexandrium margalefii* (Balech, 1994)

*Alexandrium margalefii* (Familia: Pyrocystaceae) es una especie de dinoflagelado tecado, con una forma celular subesférica, con un tamaño de 27-36  $\mu\text{m}$  de largo y 31-40  $\mu\text{m}$  de ancho. No posee ornamentaciones y son células solitarias, no forman cadenas (Fig. 6). Es una especie meroplánctónica, distribuida en aguas templadas y subtropicales (Balech, 1994; Selina y Morozova, 2005; Morquecho *et al.*, 2016).



**Figura 6.** Célula de *Alexandrium margalefii*. Micrografía tomada por la Dra. Lourdes Morquecho (CODIMAR). Escala de la barra 10  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4.4 *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943)

*Gymnodinium catenatum* (Familia: Gymnodiniaceae) es un dinoflagelado con células atecadas, con una forma alargada-ovoide, no muestra ornamentaciones. Tiene un tamaño de 27 a 43  $\mu\text{m}$  de ancho y 34 a 36  $\mu\text{m}$  de largo. Las células vegetativas forman cadenas hasta 32 células en ocasiones hasta 64 (fig. 7). Su ciclo le permite a la microalga alternar entre el hábitat bentónico



y el pelágico. Su distribución es cosmopolita en aguas cálidas y aguas costeras templadas. Ha sido reportada como formadora de florecimientos algales nocivos, al producir toxinas paralizantes (Graham, 1943; Figueroa *et al.*, 2008; Maciel-Baltazar y Hernández-Becerril, 2013).



**Figura 7.** Células de *Gymnodinium catenatum* formando cadenas. Micrografía tomada por la Dra. Lourdes Morquecho (CODIMAR). Escala de la barra 20 µm.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Compuestos bioactivos antibacterianos de diatomeas y dinoflagelados

Los dinoflagelados y diatomeas son microalgas que producen una variedad de pigmentos y son productores de ácidos grasos que suelen constituir del 15 al 25% de su biomasa seca (Mansour *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2017). Estas microalgas constituyen una fuente importante de compuestos antimicrobianos (Lauritano *et al.*, 2016). En el caso de los dinoflagelados presentan una gran variedad de ácidos grasos y pigmentos, como son los ácidos grasos de cadena larga, altamente insaturados (Mansour *et al.*, 1999; Leblond *et al.*, 2003). Asimismo en las diatomeas se ha reportado actividad antibacteriana, al producir toda esta clase de compuestos (Lincoln *et al.*, 1990; Walter y Mahesh, 2000), como lo son el  $\beta$ -caroteno, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico, luteína, zeaxantina, fucoxantina (Yi *et al.*, 2017).

En el caso de las diatomeas, la búsqueda de compuestos antibacterianos inició en la década de los 60's. Los resultados muestran que, en la fase logarítmica de crecimiento, las células acumulan compuestos con actividad antibacteriana. Si bien se obtuvieron extractos totales, se sugirió aislar y purificar estos compuestos, determinar su estructura, realizar estudios toxicológicos y cinéticos antes de una evaluación del potencial clínico (Lincoln *et al.*, 1990).

Jian *et al.* (2013), obtuvieron extractos de la diatomea *Thalassiosira rotula*, utilizando diferentes métodos de extracción y solventes. Evaluaron los extractos antimicrobianos contra bacterias Gram positivas y negativas, algunas provenientes del medio marino. Los resultados probaron que los extractos de cloroformo:metanol de la microalga presentaron actividad antimicrobiana, la cual dependió del método de ruptura física o química de células y los solventes usados para la extracción. Algunos de los extractos lograron inhibir *S. aureus*, *Bacillus pumilus* y *Vibrio harveyi*.

Hemalatha *et al.* (2017), obtuvieron extractos de la diatomea *Odontella aurita* y evaluaron el potencial antimicrobiano contra bacterias patógenas clínicas. Determinaron la concentración mínima inhibitoria concluyendo que los extractos de etanol detuvieron el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas. También al haber usado diferentes solventes, hacen la

observación de la presencia de esta actividad antibacteriana está relacionada con los métodos de extracción.

Pruebas antibacterianas de extractos de dinoflagelados no son tan abundantes. Los reportes están enfocados hacia otro tipo de compuestos. Por ejemplo, de los florecimientos del dinoflagelado *Gyrodinium sp.*, en Puerto Rico, se aisló un compuesto poliéter con propiedades de antibiótico, el cual fue nombrado como Gonodomin. Este compuesto mostró limitada actividad contra bacterias, pero una fuerte acción antifúngica (Sharma *et al.*, 1968). Nagai y colaboradores (1990), probaron 12 compuestos de poliéter que se obtuvieron de cultivos de dinoflagelados, los cuales se evaluaron contra diferentes bacterias patógenas Gram positivas y negativas, que afectan a los humanos. No observaron actividad antibacteriana contra las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus megaterium*.

Lauritano *et al.* (2016), trabajaron con 21 diatomeas y 7 dinoflagelados, y obtuvieron extractos de acetona e hicieron pruebas antibacterianas contra bacterias Gram positivas y negativas. Los ensayos no mostraron una aparente bioactividad contra las bacterias probadas, a excepción de *Skeletonema marinoi* (diatomea) teniendo una alta efectividad contra *S. aureus*.

## **2.2 Lípidos y ácidos grasos como antibacterianos**

Es importante destacar que cada grupo mayor de microalgas tiene ácidos grasos característicos (Behrens *et al.*, 1996). La capacidad que poseen los ácidos grasos en general para intervenir en el crecimiento y la supervivencia de las bacterias se conoce desde hace un tiempo, pero los estudios recientes que describen la relación estructura-función sugieren que esta capacidad está dada por la longitud de la cadena, como también el grado de insaturación (Amaro *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentan mayor potencial antibacteriano, a diferencia de los ácidos grasos saturados que presentan menor actividad antibacteriana. Esta eficacia de estos lípidos está relacionada con su estructura química e influenciada por el pH del medio (Zheng *et al.*, 2005; Pina-Pérez *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020).

Kabara *et al.* (1972), estudiaron las relaciones estructurales de 30 ácidos grasos puros comerciales y fueron probadas sus propiedades bactericidas contra 8 organismos Gram negativos y 12 Gram positivos. Los ácidos grasos que presentaron inhibición contra las bacterias probadas fueron los ácidos grasos saturados: cáprico, láurico, mirístico, palmítico y los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico, principalmente contra organismos Gram positivos.

Walter y Mahesh (2000), probaron extractos de 11 diatomeas marinas cultivadas hasta el inicio de la fase estacionaria y utilizaron diferentes solventes para la obtención de extractos que probaron contra 2 bacterias Gram positivas y 11 Gram negativas. Se observó que los extractos lipídicos mostraron mayor actividad contra las bacterias Gram negativa. La diatomea con superior actividad antibacteriana fue *Thalassiothrix frauenfeldii*.

Mendiola *et al.* (2007), obtuvieron extractos lipídicos de la diatomea *Chaetoceros muelleri* utilizando la técnica de extracción de fluidos supercríticos. Estos extractos fueron probados contra bacterias patógenas para el humano (*S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 11775)), para determinar la concentración mínima inhibitoria. Dichos autores, obtuvieron una correlación entre la actividad antimicrobiana de los extractos y su composición química, y estos relacionaron el contenido de triglicéridos totales y el DPA (ácido docosapentaenóico) como los principales compuestos que controlaron la actividad antimicrobiana. Otros ácidos grasos poliinsaturados en abundancia fueron el EPA y DHA. También Desbois *et al.*, (2008) probaron extractos de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* contra bacterias patógenas del medio marino y nocivas para el humano. Los compuestos antibacterianos identificados fueron: ácido palmítico (saturado) y el ácido graso poliinsaturado ácido hexadecadienóico (HTA) que tuvieron una respuesta activa contra bacterias Gram positivas, y en el caso de HTA siendo inhibitoria contra patógenos marinos Gram negativos. Desbois y colaboradores (2009) volvieron a trabajar con la misma microalga, contra 7 bacterias marinas, aisladas de peces y moluscos, al igual que contra 6 bacterias dañinas para el humano. El ácido graso aislado utilizado fue el EPA, logrando ser efectivo contra los dos tipos de bacteria.

En el ensayo de bioprospección realizado por Chávez-Cobián (2016), obtuvo extractos de lípidos totales y ácidos grasos de las microalgas *Porphyridium cruentum* y *Dunaliella salina*, que probó contra bacterias marinas Gram negativas del género *Vibrio* sp. Encontró con ambos extractos

de las microalgas, un efecto bacteriostático, ya que inhibió el crecimiento celular de las bacterias.

### **2.3 Pigmentos fotosintéticos como antibacterianos**

Los pigmentos fotosintéticos se han identificado como compuestos bioactivos con potencial antibacteriano, aunque a pesar de su efectividad, hay pocos trabajos de investigación (Konuray y Erginkaya, 2015). Mowbray (1957) reportó la actividad bactericida de la clorofila contra ciertas bacterias Gram positivas, y sin inhibición en bacterias Gram negativas, bajo las condiciones experimentales.

Bruce *et al.* (1967), a partir de *Isochrysis galbana* obtuvieron extractos usando tres diferentes métodos, contra 6 diferentes bacterias (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, *Flavobacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Micrococcus sp.*). Obtuvieron compuestos derivados de la clorofila a con una extracción óptima con acetona, identificando 2 compuestos con actividad antibacteriana.

La fucoxantina es un carotenoide (xantofila) propio de las diatomeas que ha sido analizada su acción antibacteriana. La fucoxantina comercial se probó contra bacterias Gram positivas y negativas, en condiciones aeróbicas, teniendo un mayor impacto en las bacterias Gram positivas (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*) que en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*). Estos resultados sugieren que la fucoxantina no es funcional contra bacterias anaeróbicas estrictas (Karpiński y Adamczak, 2019).

### **2.4 Compuestos antibacterianos utilizados contra *V. parahaemolyticus***

El uso alternativo de compuestos con propiedades antibacterianas contra la bacteria *V. parahaemolyticus* ha sido ya probado, como en el trabajo de Kokou *et al.* (2012). Estos autores, probaron los cultivos de *Chlorella minutissima*, *Tetraselmis chui*, *Nannochloropsis sp.*, *Arthrospira platensis* e *Isochrysis sp.*, contra 5 cepas de *Vibrio*, incluyendo a *V. parahaemolyticus*. Para esto incubaron a las bacterias en los cultivos de las microalgas, encontrando que en todos los cultivos se presentó una inhibición del crecimiento bacteriano.

A partir de extractos con metanol y etanol de *Spirulina platensis* Pradhan *et al.* (2012) realizaron pruebas antibacterianas contra bacterias patógenas Gram negativas obtenidas de peces y mariscos, incluyendo *V. parahaemolyticus*, encontrando una mayor inhibición en extractos de etanol para todas las bacterias probadas.

En el caso de Thanigaivel *et al.* (2014) probaron extractos obtenidos con etanol de la macroalga *Chaetomorpha antennina*, contra aislamientos de *Vibrio* de cultivos de camarón. Utilizaron el método de difusión en agar, mostrando zonas de inhibición en el crecimiento. Al igual encontraron que estas mismas cepas revelaron resistencia a la ampicilina y sensibilidad a la eritromicina.

Soto-Rodriguez *et al.* (2022), trabajaron con cepas de *V. parahaemolyticus* algunas causantes de la enfermedad de necrosis hepatopancreática contra cultivos y extractos de lípidos totales obtenidos con etanol de las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis* sp. y *Thalassiosira weissflogii*. En los dos tipos de ensayos, mostraron efectos bactericidas, el cual dependió de la microalga utilizada y en el caso de un extracto hidrofílico, si se encontró un efecto inhibitor, al realizar un conteo de células viables, para *C. calcitrans*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La producción de organismos por medio de la acuicultura es una de las principales fuentes de ingreso económico y alimenticio de una gran cantidad de países, sin embargo, se presentan constantemente enfermedades. Estas enfermedades son causadas en su mayoría por virus y por bacterias patógenas causando la muerte de individuos, provocando pérdidas monetarias. El uso indiscriminado de antibióticos en los cultivos acuícolas ha incrementado el número de bacterias resistentes a estos, lo que ha obligado a estudiar nuevas fuentes compuestas bioactivos con actividad antibacteriana. Los pigmentos fotosintéticos y los lípidos ya han sido descritos como compuestos antimicrobianos. En el caso de las microalgas son reconocidas como productoras de lípidos y ácidos grasos que suelen constituir del 15 al 25% de su biomasa seca, además de presentar una gran variedad de pigmentos (clorofilas y carotenos). A consecuencia de esto, las microalgas pueden ser una propuesta de fuentes naturales de antibacterianos y producirlas en cantidades substanciales; además que, pueden ser suministradas en su alimentación a los organismos cultivados. Las diatomeas y dinoflagelados utilizados en esta investigación son nativas de la región, lo cual puede solucionar un problema que ya está presente en México.

#### 4. HIPÓTESIS

Debido a que *Alexandrium margalefii*, *Gymnodinium catenatum*, *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, poseen ácidos grasos y pigmentos fotosintéticos, es posible que estos compuestos presenten actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus* bacteria patógena que afecta a los organismos acuícolas.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar el potencial antibacteriano de extractos de lípidos y pigmentos totales de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*, y las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, contra las bacterias *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Extracción, identificación y cuantificación de lípidos y pigmentos de los dinoflagelados *A. margalefii* y *G. catenatum*, y las diatomeas *O. aurita* y *N. shiloi*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de lípidos y pigmentos totales de los dinoflagelados *A. margalefii* y *G. catenatum*, y las diatomeas *O. aurita* y *N. shiloi*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico y condiciones de cultivo

#### 6.1.1 Microalgas

Diatomeas:

Se trabajó con las diatomeas *Nanofrustulum shiloi* (CIB-24) colectada en octubre del 2009 en la Bahía de Balandra, B.C.S. y *Odontella aurita* (CIB-17) en La Ribera B.C.S. (2009). Ambas cepas están depositadas en la Colección de Microalgas del CIBNOR (Lora, 2022). Se cultivaron en el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962) adicionado de 30 mg L<sup>-1</sup> de silicatos. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura 25 ± 1°C, aireación continua, ciclos de luz oscuridad de 12:12 h, intensidad luminosa de 149.5 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y pH 7.7 a 8.

La biomasa de ambas cepas se cosechó al inicio de la fase estacionaria, por centrifugación (Sorvall Legend RT) a los 7 (*N. shiloi*) y 8 días (*O. aurita*), a 3000 rpm, por 10 min, a 10°C en tubos cónicos de 50 mL. Ambas biomasas se lavaron con 20 mL de formato de amonio 0.5 M, para eliminar las sales. El contenido total de las biomasas, se distribuyeron en tubos de vidrio con tapón de rosca, previamente pesados para realizar los análisis bioquímicos. Una parte de las biomasas se colocaron en minitubos eppendorf para obtener los extractos antibacterianos y se mantuvieron a -20°C.

Dinoflagelados:

Se trabajó con los dinoflagelados *Gymnodinium catenatum* (GCQM-2) colectados en la Bahía de Mazatlán en el 2003 y *Alexandrium margalefii* (AMCQ-1) en Bahía Concepción, B.C.S (2000), las cuales están depositadas en La Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) (Morquecho y Reyes-Salinas, 2022). Se cultivaron en el medio GSe de Blackburn *et al.* (2001). Se mantuvieron a una temperatura de 22°C, con un ciclo de oscuridad de 12:12 horas, una salinidad de 30 PSU. Se escalaron hasta matraces de 2 L y se cosecharon en la fase exponencial tardía, 3 semanas (1 x 10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup>). Los cultivos se sedimentaron a 4°C por 24 h y el sobrenadante se eliminó. Se centrifugó (Sorvall ST40-R Thermo Scientific) a una velocidad de 1500 rpm por 10 minutos a 4°C.

La biomasa se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en minitubos eppendorf. Al igual se colocaron en tubos de vidrio con tapón de rosca, para los análisis bioquímicos.

### **6.1.2 Bacterias**

*Vibrio parahaemolyticus* se obtuvo del Módulo de Escalamiento Biológico y del Grupo de Microbiología Ambiental (GMA). La cepa estaba en criopreservación en glicerol y fue reactivada en medio TSB con 2% NaCl incubándola por 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$  y con agitación. Posteriormente se sembró por estría cruzada en medio TSA con 2% NaCl, y se incubó a la misma temperatura. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron cepas de referencia donadas por el Hospital Salvatierra de La Paz, BCS, las cuales se caracterizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico. Estas cepas se sembraron por estría cruzada en agar nutritivo. Las cepas fueron guardadas en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Para las pruebas antimicrobianas las bacterias fueron sembradas en medio de cultivo TSA<sub>50</sub> y CN<sub>50</sub>.

### **6.2 Recuento celular de las microalgas**

Para el recuento celular de los dinoflagelados se utilizó la cámara Sedgwick-Rafter (100 mm de profundidad, con un volumen de 1000  $\mu\text{L}$  para un tamaño celular de 50-500  $\mu\text{m}$ ) al ser células de mayores dimensiones. Se agitó el cultivo para obtener una distribución homogénea. Se tomó 1 mL de muestra en el tiempo 0 ( $T_0$ ) y el día 28 ( $T_{28}$ ) en la fase exponencial tardía, y se colocó en un microtubo, al igual que una gota de lugol, para fijar las células. Se tomó 1 mL el cual se colocó en la cámara y se contó toda la cámara en un microscopio de luz con un objetivo de 10X. Los recuentos celulares se hicieron por triplicado y se expresaron en  $\text{cél mL}^{-1}$ . Para el recuento celular de las diatomeas fue difícil debido a que forman conglomerados y por esta razón en lugar de obtener las  $\text{cél mL}^{-1}$  se utilizaron el peso seco y las cenizas para obtener la biomasa, lo cual se describe en la siguiente sección.

### **6.3 Peso seco total, orgánico e inorgánico de las microalgas**

Para la evaluación de peso seco total y cenizas, se utilizó el protocolo de Sorokin (1973). Se fundamenta en la separación de la biomasa del medio de cultivo, mediante filtración al vacío en membranas de fibra de vidrio (marca VWR 1.2  $\mu\text{m}$  de retención) a peso constante.

Previamente los filtros se lavaron en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en sobres de papel aluminio y se prequemaron a 490°C en la mufla TERLAB (modelo TE-M12D) durante 6 h. Los filtros prequemados se colocaron en la estufa TERLAB (modelo TE-H35D) 1 h a 65°C. Después de ese tiempo, se pusieron en el desecador durante 1.5 h y se pesaron en la balanza analítica marca OHAUS Pioneer (modelo PA 114). El proceso se repitió hasta asegurarse que se logró el peso constante de los filtros.

Para determinar el peso seco, se tomaron 20 mL del cultivo de las cepas, tanto al inicio ( $T_0$ , días) como al final de la fase exponencial (*N. shiloi*  $T_7$  y *O. aurita*  $T_8$ ; *G. catenatum*  $T_{21}$  y *A. margalefii*  $T_{21}$ ) y se filtraron al vacío en las membranas de fibra de vidrio a peso constante. Se lavaron con 20 mL formato de amonio 0.5 M, y se colocaron en la estufa a 65°C durante 24 h. Posteriormente se colocaron en el desecador durante 1.5 h y se pesaron en la balanza analítica. Esta operación se repitió hasta obtener el peso constante. Para el cálculo se utilizó la fórmula:

$$PST = \frac{(PSFM - PSF)}{VF} \quad (1)$$

Dónde:

PST: peso seco total ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PSFM: peso del filtro con muestra (mg)

PSF: peso seco del filtro sin muestra (mg)

VF: volumen de muestra filtrado (L)

Para la obtención del peso inorgánico (cenizas), los filtros con la biomasa seca se incineraron en la mufla (TerLab) durante 6 h a 490°C. Después, se colocan en la estufa a 65°C por 1 h, en el desecador por 1.5 h y se pesan en la balanza analítica. El proceso se repitió hasta obtener el peso constante. Para calcular el peso inorgánico (cenizas) se utilizó la siguiente fórmula:

$$PSI = \frac{(PSC - PSF)}{VF} \quad (2)$$

Dónde:

PSI: peso seco inorgánico (cenizas) ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PSC: peso del filtro con la muestra incinerada (mg)

PSF: peso seco del filtro sin muestra (mg)

VF: volumen de muestra filtrado (L)

Para calcular el porcentaje de cenizas, se consideró la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \left( \frac{PST - PSO}{PST} \right) \times 100 \quad (3)$$

Dónde:

PST: peso seco total ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PSO: peso seco orgánico ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Finalmente, para calcular el peso orgánico, se utilizó la siguiente fórmula:

$$PSO = PST - PSI \quad (4)$$

Dónde:

PSO: peso orgánico ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PST: peso seco total ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PSI: peso seco inorgánico ( $\text{mg L}^{-1}$ )

#### 6.4 Extracción de pigmentos totales

Todo el procedimiento de extracción de pigmentos totales se realizó en la campana de extracción (BecoMar). Se colocó para diatomeas entre 241-516 mg y para dinoflagelados 121-375 mg de biomasa fresca en tubos de vidrio con tapón de rosca y protegidos de la luz, y se les agregó 3 mL de acetona al 100% grado HPLC. Posteriormente se agitaron en un mezclador vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560), se sonicaron (VWR, modelo 97043-964) por tres ciclos consecutivos durante 15 min en baño de hielo, y se reposaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para permitir la extracción total de los pigmentos. Al día siguiente se repitió el proceso de agitación y sonicado. Posteriormente se centrifugaron los tubos con las muestras, a 3000 rpm, por 10 min, a  $10^{\circ}\text{C}$ . Los pigmentos se obtuvieron del extracto de acetona, el cual se colocó en un tubo de vidrio protegido por la luz. A la pastilla celular se le volvió a agregar acetona al 100% grado HPLC, repitiéndose los pasos anteriores hasta lograr la extracción total de pigmentos.

## 6.5 Cuantificación de pigmentos totales por espectrofotometría

Los extractos totales de pigmentos se diluyeron con acetona al 100% grado HPLC hasta lograr que las lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda quedaran dentro del rango de absorbancia menor a 1. Las lecturas de absorbancias se realizaron en el espectrofotómetro marca HACH (modelo DR5000), a través de un barrido espectral de 400 a 700 nm. A partir de las lecturas de absorbancias obtenidas, se calcularon las concentraciones de clorofila *a*, *c* y carotenos totales. Para la cuantificación de los pigmentos, se aplicaron las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickland y Parsons (1972), respectivamente.

$$\text{Chl } a = 11.47 \times A_{664} - 0.4 \times A_{630} \quad (5)$$

$$\text{Chl } c = 23.5902 \times A_{630} - 7.8516 \times A_{647} - 1.5214 \times A_{664} - 1.7443 \times A_{691} \quad (6)$$

$$\text{Carotenos totales} = 10 \times A_{480} \quad (7)$$

Las concentraciones se expresaron en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y en aquellas muestras que se diluyeron, se multiplicó por el factor de dilución.

## 6.6 Cuantificación de pigmentos por HPLC-DAD

Previamente a inyectar los extractos de pigmentos de las diatomeas y dinoflagelados se realizó la curva de calibración con 7 estándares-DHI (Chl *a*, Chl *c* ( $c_1+c_2$ ), fucoxantina, peridinina, diadinoxantina, dinoxantina y  $\beta$ -caroteno). Se colocaron en viales 1 mL las diluciones de los extractos de pigmentos. Las alícuotas pertenecientes a los extractos fueron inyectadas en un HPLC-DAD (1260 II Infinity, Agilent Technologies), de acuerdo con Vidussi *et al.* (1996). Las condiciones de trabajo del HPLC y las características del gradiente de los solventes utilizados se muestran en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Condiciones de trabajo del HPLC-DAD para la determinación de pigmentos.

Columna fase inversa (5 $\mu$ m, 150 nm x 4.6 nm)	
Tiempo de corrida	19 min
Tiempo de parado	1.5
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Presión de bomba	300 bares
Longitud de onda del detector	DAD 440 nm

**Tabla 2.** Características del gradiente de solventes.

Gradiente	Solvente A	Solvente B
0 min	75 %	25%
1 min	50%	50%
15 min	0%	100%
18 min	0%	100%
19 min	75%	25%

**Solvente A:** metanol/ acetato de amonio (70:30). **Solvente B:** metanol grado HPLC

### 6.7 Extracción lípidos totales

El método utilizado para la cuantificación de lípidos totales está basado en la formación de una mezcla de una fase de cloroformo, metanol y agua (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O) (1:2:0.6) la que asegura la extracción de la mayoría de los lípidos, incluyendo a moléculas que estén ligadas. Se utilizó el método de (Bligh y Dyer, 1959). Se adicionaron 3 mL de la mezcla CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (1:2:0.6) y 5  $\mu$ L del antioxidante butil hidroxitolueno (BHT) (1 mg L<sup>-1</sup> en CHCl<sub>3</sub>) en un tubo de vidrio con tapón de rosca limpio, que contiene biomasa fresca de las cepas, diatomeas entre 182-478 y dinoflagelados entre 181-332 g. Los tubos se colocaron en el sonicador por 15 min en baño de hielo (tres ciclos) y se guardaron a -20°C protegidos de la luz durante 24 h para asegurar la extracción completa de los lípidos. Pasado el tiempo, se volvió a sonicar en baño de hielo durante 15 min (tres ciclos) y se añadió 1 mL de CHCl<sub>3</sub> y 1.2 mL de agua destilada. Se centrifugaron a 3000 rpm a 10°C durante 15 min. El extracto cloroformo: lípidos se recuperó con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo, el cual se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se guardó en congelador a -20°C.

## 6.8 Cuantificación de lípidos totales por métodos espectrofotométricos

Para la cuantificación de lípidos totales se empleó el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). El tubo con los lípidos totales en sequedad, se le agregó 1 mL de cloroformo. Se tomó 0.05 mL de extracto de lípidos totales y se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso. Se le añadieron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, los tubos se sellaron con papel aluminio y se cerraron con sus tapas. La mezcla se calentó a 200°C por 15 min. Posteriormente, los tubos se sacaron y se dejaron 10 min a temperatura ambiente. Ya fría la muestra, se agregaron 3 mL de agua destilada y se agitó en el vortex, verificando que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica. La curva de calibración se realizó utilizando tripalmitina como estándar en un rango de concentración de 30 a 180 mg mL<sup>-1</sup>. Las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro a 375 nm. El equipo se calibró con un blanco de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que se trató de igual manera que las muestras.

## 6.9 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID

A partir de los lípidos totales obtenidos anteriormente, se realizó la extracción de los ácidos grasos, a través de la reacción de metanólisis (derivatización), adicionando 2.5 mL de la mezcla HCl:CH<sub>3</sub>OH (5:95) (Sato y Murata, 1988). Se utilizaron 5 µL del estándar interno el C23:0 (2 mg mL<sup>-1</sup> en CHCl<sub>3</sub>). Las muestras se colocaron en un baño maria a 85°C por 2.5 h. Pasado ese tiempo, los tubos se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los metil-ésteres obtenidos durante la reacción, se extrajeron con 1.5 mL de hexano grado HPLC, agitándolos en vórtex. Con una pipeta Pasteur limpia se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo. La mezcla anterior se lavó agregando 1.5 mL de hexano grado HPLC y nuevamente se agitó en vórtex. Se separó la fase superior con pipeta Pasteur y se colocó en el tubo anterior. Se inyectó un volumen conocido de cada muestra en el equipo de cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna capilar DB-23 (20%-Cianopropil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud x 0.25 µm de espesor de película x 0.25 mm de diámetro interno, utilizando helio alta pureza como gas acarreador a un flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup>, una rampa de temperatura de 100-220°C. La identificación se realizó comparando el tiempo de retención con los estándares y la cuantificación en base al estándar interno añadido a las muestras (Arjona *et al.*, 2008).



Previamente se inyectó la curva de calibración utilizando una mezcla comercial de ácidos grasos metilados (Sigma T6543, ácido tricosanóico). La identificación se realizó por comparación del tiempo de retención (TR) de la mezcla de estándares comerciales con respecto al de las muestras de microalgas. Para cuantificar los ácidos grasos de las muestras se hace una regresión lineal de las curvas de calibración de cada uno de los ácidos grasos comerciales. Se calcula la pendiente (m) de la ecuación ( $Y = mx + b$ ) que corresponde al factor de corrección que se utilizó para la cuantificación de cada uno de los ácidos grasos de las muestras.

#### **6.10 Extracción de lípidos para la evaluación de antibacterianos**

Para este proceso se utilizó la técnica extracción de lípidos totales, por el método Bligh y Dyer (1959), a partir de aproximadamente 500 mg de biomasa fresca de cada microalga. Se agregaron 5 mL la mezcla de cloroformo: metanol: agua (1:2:0.6), luego se homogenizó con un vórtex y se sonicó por tres ciclos de 15 min, en un baño de hielo. Se dejó en extracción toda la noche a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , protegidos de la luz. Se volvió a homogenizar y sonicar en 3 ocasiones (15 min), para luego añadir 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  y 1.2 mL de agua destilada. Se centrifugaron a 3000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El extracto de cloroformo: lípidos se recuperó con una pipeta Pasteur, colocándolo en un tubo nuevo. Obtenido el extracto se concentró con nitrógeno gaseoso, lo cual ayudó a descartar los solventes. Para la utilización del extracto para las pruebas antibacterianas se disolvió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 3% en medio TSB<sub>50%</sub>.

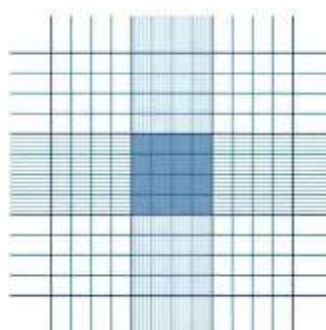
#### **6.11 Extracción de pigmentos para la evaluación de antibacterianos**

A 500 mg de biomasa fresca se le agregaron 5 mL de acetona al 100% grado HPLC. Se homogenizó con un vórtex y se sonicó durante 15 min (3 ciclos) en baño de hielo, dejándolos reposar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para una extracción completa. Al día siguiente, se repitió el proceso de agitar y sonicar, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Se recuperó el extracto total de pigmentos, en un tubo nuevo con una pipeta Pasteur, protegiéndolo de la luz. Se repitió el proceso hasta que la biomasa fue incolora. El extracto se concentró con nitrógeno gaseoso, para las pruebas antibacterianas se disolvió en 1 mL DMSO al 3% en medio TSB<sub>50%</sub>.

## 6.12 Curvas de crecimiento bacteriano

Se preparó inóculo de las bacterias *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las cuales se sembraron en un tubo con medio TSB (2% NaCl) o caldo nutritivo, y se incubaron toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 15 min. Se desechó el sobrenadante, y la pastilla celular se resuspendió en 10 mL de solución salina al 2% (se repitió el proceso en dos ocasiones). Se ajustó la suspensión bacteriana a 0.4 de densidad óptica.

De esta suspensión bacteriana se tomaron 100  $\mu\text{L}$ , y se inocularon un tubo con 10 mL de los medios al 50% (por triplicado). Por cada tubo se inoculó un pocillo de la microplaca para hacer lecturas en los tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h a 600 nm (Multiskan GO). En los tiempos 0, 6, 22 y 24 h se tomó un 1 mL del cultivo en crecimiento para hacer recuentos en la cámara Neubauer, en el microscopio con laminillas de fases (Leica DM LS2). Contando 9 recuadros del centro, esto por triplicado (Fig. 8).



**Figura 8.** Divisiones de cámara Neubauer.

$$\text{Células mL}^{-1} = \text{número promedio de células por cuadro} \times 25 \times 10^4 \quad (8)$$

## 6.13 Evaluación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina

La evaluación de actividad antibacteriana se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), en microplacas de 96 pocillos, para cada uno de los extractos de las diferentes microalgas. En cada pozo por cuadruplicado se agregó un volumen de 150  $\mu\text{L}$  de los extractos a evaluar, se utilizaron diferentes concentraciones (Tabla 3), iniciando de una concentración en el caso de lípidos totales de 490  $\mu\text{g}$  de EPA/DHA y en los pigmentos

totales una concentración de 700 µg de Chl *a*/carotenos, estos valores se calcularon a partir de los MIC de literatura relacionada (ANEXO A) a pruebas antibacterianas y los resultados obtenidos en la cuantificación de lípidos por GC-FID y pigmentos por HPLC-DAD.

Los extractos se resuspendieron en medio TSB<sub>50%</sub>, con DMSO 3%. A los pozos con *V. parahaemolyticus* se le adicionó NaCl para obtener una concentración de 2%. Los inóculos se sembraron (TSB<sub>50%</sub>) un día antes, para que estuvieran en fase exponencial, para volverlo a sembrar (4-5 h) y poder utilizarlos a una DO específica (*V. parahaemolyticus*: 0.0013, *E. coli*: 0.008 y *S. aureus*: 0.011), estando el inóculo bacteriano a  $1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Se agregaron 20 µL de inóculo bacteriano por pozo. Como control positivo se utilizó el Ampicilina (SIGMA, A0166) 100 µg mL<sup>-1</sup>. Como control negativo se utilizó una microplaca con el mismo orden de carga de los extractos, sin inóculo bacteriano.

Las microplacas fueron incubadas a 35°C por 18 h. Una vez concluido el tiempo de incubación, se utilizó como indicador a la resazurina, la cual en un ambiente sin crecimiento celular cambia de color morado a azul (se oxida), cuando hay crecimiento torna a un color rosa (se reduce) a partir de la respiración aeróbica de las bacterias. Se agregó a cada pozo 10 µL de resazurina (0.15 mg mL<sup>-1</sup>), pasado 20 min se leyó la fluorescencia a una excitación de 560 nm y una emisión 590 nm. Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó (Thermo scientific/varioskan lux) (Reyes *et al.*, 2020):

$$(\%) = 100 - \frac{\text{Tratamiento}}{\text{Testigo de crecimiento}} * 100 \quad (9)$$

**Tabla 3.** Concentraciones probadas en las pruebas antimicrobianas realizadas en microplaca con la prueba de resazurina ( $\mu\text{g}$  por pozo en un volumen total de  $150 \mu\text{L}$ ).

Pigmentos totales ( $\mu\text{g}$ )	Lípidos totales ( $\mu\text{g}$ )
490	700
245	350
122.5	175
61.25	88
30.63	44
15.31	22
7.66	11

**Nota:** pigmentos totales ( $\mu\text{g}$  de Chl *a*/carotenos); lípidos totales ( $\mu\text{g}$  de EPA/DHA). Datos tomados de la literatura (ANEXO A)

#### 6.14 Análisis estadísticos

En todos los resultados se calcularon medias y la desviación estándar, a partir de las réplicas realizadas. En los resultados de cuantificación de ácidos grasos y pigmentos se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos, al ser  $P$  mayor a 0.05, Confirmada la normalidad se realizó una prueba ANOVA de una vía. En los datos que fueron menor a 3 grupos, se aplicó una prueba T para diferenciar medias. En los casos que no hubo normalidad en los datos, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos se aplicó prueba *a posteriori* de pareado de Tukey para encontrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre microalgas. Se utilizó el programa estadístico PAST4.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Peso seco total, orgánico e inorgánico de las diatomeas y dinoflagelados

En los cultivos de *O. aurita* el promedio de peso seco total, peso seco inorgánico y peso seco orgánico, al igual que cenizas fue similar a los cultivos de *N. shiloi*, correspondientes a la fecha de cosecha en la fase estacionaria. Los dinoflagelados tuvieron un menor PST que las diatomeas. *G. catenatum* mostró el menor PST de las microalgas analizadas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Peso seco total, orgánico e inorgánico y porcentaje de cenizas de las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar.

Clave	PST (mg mL <sup>-1</sup> )	PSI (mg mL <sup>-1</sup> )	PSO (mg mL <sup>-1</sup> )	% cenizas
<i>O. aurita</i>	0.528 $\pm$ 0.08	0.181 $\pm$ 0.04	0.347 $\pm$ 0.05	34.05 $\pm$ 2.86
<i>N. shiloi</i>	0.522 $\pm$ 0.14	0.178 $\pm$ 0.05	0.343 $\pm$ 0.1	34.57 $\pm$ 4.98
<i>A. margalefii</i>	0.293 $\pm$ 0.08	0.1 $\pm$ 0.01	0.193 $\pm$ 0.02	34.3 $\pm$ 2.56
<i>G. catenatum</i>	0.156 $\pm$ 0.04	0.054 $\pm$ 0.03	0.103 $\pm$ 0.07	34.05 $\pm$ 1.45

PST: peso seco total, PSI: peso seco inorgánico, PSO: peso seco orgánico.

### 7.2 Pigmentos totales por espectrofotometría

Los valores más altos de clorofila *a*, clorofila *c* y carotenos fueron obtenidos por *O. aurita*, así como, los promedios más bajos los mostró *N. shiloi*. La clorofila *a* fue el pigmento que se encontró en mayor cantidad en las dos diatomeas, seguido por los carotenos y la clorofila *c*. Para *G. catenatum* y *A. margalefii* los carotenos fueron los pigmentos predominantes, seguidos de la clorofila *a* y la clorofila *c* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentraciones de clorofila *a*, clorofila *c* (*c*<sub>1</sub> + *c*<sub>2</sub>) y carotenos de las diatomeas *Nanofrustulum shiloi* y *Odontella aurita*, y los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar.

Clave	Clorofila <i>a</i> (μg mL <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>c</i> ( <i>c</i> <sub>1</sub> + <i>c</i> <sub>2</sub> ) (μg mL <sup>-1</sup> )	Carotenos (μg mL <sup>-1</sup> )
<i>N. shiloi</i>	17.446 $\pm$ 10.53	2.57 $\pm$ 3.47	12.35 $\pm$ 8.11
<i>O. aurita</i>	63.53 $\pm$ 10.77	34.912 $\pm$ 8.48	51.54 $\pm$ 12.34
<i>A. margalefii</i>	35.19 $\pm$ 4.01	20.98 $\pm$ 6.82	36.94 $\pm$ 9.83
<i>G. catenatum</i>	24.63 $\pm$ 17.17	18.23 $\pm$ 14.05	26.19 $\pm$ 9.83

### 7.3 Cuantificación e identificación de pigmentos totales por HPLC-DAD

Los pigmentos se cuantificaron ( $\text{ng mg}^{-1}$  peso seco), y se calcularon porcentajes relativos para cada microalga (Tabla 6). La clorofila *a* se identificó en todas las microalgas, fue el pigmento que se encontró en mayor concentración. En *A. margalefii* se presentó en mayor concentración, y para *N. shiloi* se cuantificó en menor concentración de las cuatro microalgas. No se encontró una diferencia significativa entre la concentración de este pigmento en las 4 microalgas. La clorofila *c* también se encontró en todas las microalgas. Ambos dinoflagelados mostraron un mayor porcentaje que en las dos diatomeas, sin encontrar una diferencia significativa en los valores obtenidos.

La fucoxantina fue cuantificada en las diatomeas, hallándose en un mayor porcentaje en *N. shiloi*, estando en mayor concentración que la clorofila *c*. Asimismo, la peridina característica de los dinoflagelados estuvo en un mayor porcentaje en *G. catenatum*, teniendo un porcentaje más alto que la clorofila *c*, para ambos la prueba *t* no mostró diferencias significativas. Otro caroteno que se encontró fue la dinoxantina se encontró en mayor concentración en *G. catenatum*, siendo *N. shiloi* y *O. aurita* el porcentaje más bajo. Para estos valores no se encontró una diferencia significativa.

*N. shiloi* presentó el mayor porcentaje de diadinoxantina, mientras que el menor porcentaje lo mostró *A. margalefii*. Los valores presentaron una diferencia significativa de *N. shiloi* con respecto a las otras microalgas. En el caso del  $\beta$ -Caroteno se encontró en mayor cantidad en *N. shiloi*, mientras que la microalga que presentó la menor cantidad fue *A. margalefii*, no encontrándose diferencias significativas entre las microalgas. Este fue el pigmento que se encontró en menor porcentaje comparado con los otros pigmentos.

**Tabla 6.** Porcentaje de pigmentos totales con respecto al peso seco de las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar.

Pigmento	<i>N. shiloi</i>	<i>O. aurita</i>	<i>A. margalefii</i>	<i>G. catenatum</i>	P-value
Clorofila <i>a</i>	37.9 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	62.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	64.2 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	52.8 $\pm$ 20.9 <sup>a</sup>	0.16
Clorofila <i>c</i> ( <i>c</i> <sub>1</sub> + <i>c</i> <sub>2</sub> )	15.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	15.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	19.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	17.7 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	0.07
Fucoxantina	31.4 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	-	-	2.7
Peridinina	-	-	10.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 16.8 <sup>a</sup>	2.7
Dinoxantina	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.09
Diadinoxantina	8.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	4.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.02
$\beta$ -Caroteno	2.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	0.08

Entre microalgas por cada pigmento se realizaron pruebas ANOVA (chl *c* (*c*<sub>1</sub>+*c*<sub>2</sub>) y  $\beta$ -Caroteno). Kruskal-Wallis (chl *a*, dinoxantina y diadinoxantina) y pruebas T (fucoxantina y peridinina), al igual que una prueba *a posteriori* de pareado de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas entre microalgas.

#### 7.4 Cuantificación lípidos totales por espectrofotometría

Para las microalgas evaluadas *A. margalefii* fue la que tuvo un mayor porcentaje de lípidos totales, respecto al peso seco (48%  $\pm$  9.7), siendo *N. shiloi* la microalga que presentó el menor porcentaje de lípidos totales (Tabla 7).

**Tabla 7.** Porcentaje de lípidos totales respecto al peso seco de las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*.

Clave	Lípidos totales (%)
<i>N. shiloi</i>	29.9 $\pm$ 5
<i>O. aurita</i>	35 $\pm$ 3.8
<i>A. margalefii</i>	48.5 $\pm$ 9.7
<i>G. catenatum</i>	30.6 $\pm$ 12.4

#### 7.5 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID

Los ácidos grasos (AG) de *A. margalefii*, *G. catenatum*, *O. aurita* y *N. shiloi* se organizaron en saturados (AGS), monoinsaturados (AMI), poliinsaturados (AGP) y altamente insaturados (AGAI). El perfil de ácidos grasos para las cuatro microalgas se encuentra en la Tabla 8.

En el dinoflagelado *A. margalefii* los ácidos grasos en mayor proporción fueron los AGS (44.3%  $\pm$  2.06), seguido por los AGP (37.9%  $\pm$  2.87), y de estos últimos el 34.7%  $\pm$  2.89 son AGAI. En el dinoflagelado *G. catenatum* los AGP se encontraron en mayor porcentaje (56.83%  $\pm$  3.8), siendo

el  $53.45\% \pm 3.81$  correspondiente a los AGAI. *A. margalefii* fue la microalga con una mayor cantidad de AGS ( $44.3\% \pm 2.06$ ), seguida de *G. catenatum* ( $37.7\% \pm 3.69$ ), mostrándose diferencias estadísticas significativas entre estos dinoflagelados, comparados con las diatomeas *N. shiloi* y *O. aurita*.

En la diatomea *O. aurita* el mayor porcentaje de AG fueron los AGP ( $45.53\% \pm 2.2$ ), siendo el  $42.66\% \pm 2.3$  de los AGAI. En *N. shiloi* predominaron los AMI ( $47.58\% \pm 2.2$ ), mientras que los AGS ( $31.22\% \pm 1.3$ ) se encontraron en menor concentración, y los AGP fueron los que presentaron un menor porcentaje ( $21.2\% \pm 3.5$ ), siendo el  $15.93\% \pm 3.39$  de los AGAI.

El ácido graso saturado que se encontró en mayor concentración en las cuatro microalgas fue el ácido palmítico (16:0). El AG láurico (12:0) solamente se identificó en las diatomeas en una baja concentración.

En los AMI los AG 14:1 $\omega$ -8 y 15:1 $\omega$ -8 solamente se hallaron en *G. catenatum*. Para las diatomeas el AMI en mayor cantidad fue el AG palmitoleico (16:1 $\omega$ -7), y en los dinoflagelados fue el ácido graso vaccénico (18:1 $\omega$ -7). El 20:1 $\omega$ -9 fue AMI único de *N. shiloi* en cantidades mínimas, al igual esta microalga fue la que presentó una mayor cantidad de AMI totales ( $47.58\% \pm 2.2$ ). Asimismo, se identificó una diferencia estadística significativa entre todas las microalgas para los AMI.

El AGP en un mayor porcentaje en el caso de las diatomeas fue el ácido linoleico (18:2 $\omega$ -6), que no se encontró en *A. margalefii* o *G. catenatum*. Los dinoflagelados el principal AGP fue el 18:5 $\omega$ -3, que fue único para estas dos microalgas. El porcentaje más alto de AGP se detectó en *G. catenatum* y considerablemente menor en *N. shiloi*, mostrando una diferencia significativa en los valores entre las cuatro microalgas.

Los AG 20:3 $\omega$ -6 y ácido estearidónico (20:4 $\omega$ -6) correspondientes a AGAI se localizaron únicamente en las dos diatomeas. El AG 21:4 $\omega$ -6 solo se encontró en *N. shiloi*, y el AG 21:5 $\omega$ -6 se presentó en todas las microalgas excepto en *A. margalefii*. Los porcentajes de EPA (20:5 $\omega$ -3) en *A. margalefii* y *N. shiloi* fueron similares, sin embargo, se presentaron diferencias significativas comparándolas con *G. catenatum* y *O. aurita*. Referente al DHA (22:6 $\omega$ -3) todas las



microalgas presentaron diferencias estadísticas significativas donde *G. catenatum* y *A. margalefii* mostraron una elevada proporción de estos AG comparados con las diatomeas *N. shiloi* y *O. aurita*.

**Tabla 8.** Composición total de ácidos grasos con respecto al peso seco de las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar.

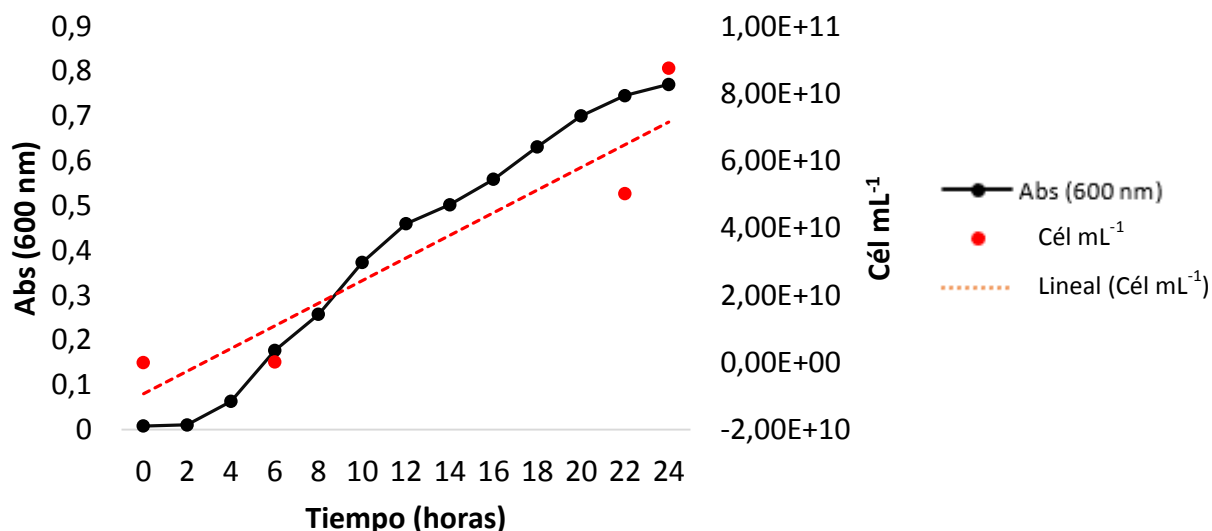
AG	<i>A. margalefii</i>	<i>G. catenatum</i>	<i>O. aurita</i>	<i>N. shiloi</i>	Valor de p
<b>AGS</b>					
12:0	-	-	0.07 $\pm$ 0.1	0.06 $\pm$ 0.1	
13:0	0.9 $\pm$ 0.1	0.51 $\pm$ 0.1	0.45 $\pm$ 0.2	0.32 $\pm$ 0.04	
14:0	2.8 $\pm$ 0.5	2.88 $\pm$ 0.2	11.03 $\pm$ 0.9	1.79 $\pm$ 0.2	
15:0	0.2 $\pm$ 0.04	0.1 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.2	0.38 $\pm$ 0.2	
16:0	23.9 $\pm$ 2.1	26.19 $\pm$ 2.2	14.59 $\pm$ 1.5	25.89 $\pm$ 1.2	
17:0	0.2 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.1	0.11 $\pm$ 0.02	
18:0	4.9 $\pm$ 0.6	2.17 $\pm$ 0.6	0.84 $\pm$ 0.4	1.71 $\pm$ 0.5	
20:0	1.4 $\pm$ 0.3	0.56 $\pm$ 0.4	0.29 $\pm$ 0.2	0.21 $\pm$ 0.03	
22:0	2.4 $\pm$ 1.3	1.45 $\pm$ 0.8	0.34 $\pm$ 0.1	0.44 $\pm$ 0.1	
24:0	7.5 $\pm$ 2.3	3.75 $\pm$ 1.1	0.33 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	
$\Sigma$ AGS	44.3 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	37.7 $\pm$ 3.69 <sup>b</sup>	28.85 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>	31.22 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	3.2 $\times 10^{-06}$
<b>AMI</b>					
14:1 $\omega$ -8	-	0.3 $\pm$ 0.03	-	-	
15:1 $\omega$ -8	-	0.6 $\pm$ 0.1	-	-	
16:1 $\omega$ -9	1 $\pm$ 0.1	0.66 $\pm$ 0.1	0.36 $\pm$ 0.1	0.48 $\pm$ 0.02	
16:1 $\omega$ -7	2.7 $\pm$ 0.4	0.57 $\pm$ 0.01	23.99 $\pm$ 0.4	41.69 $\pm$ 1.8	
16:1 $\omega$ -5	1 $\pm$ 0.2	0.19 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.21 $\pm$ 0.03	
18:1 $\omega$ -9	3.7 $\pm$ 0.4	1.31 $\pm$ 0.1	0.35 $\pm$ 0.5	1.79 $\pm$ 0.4	
18:1 $\omega$ -7	8.5 $\pm$ 0.8	1.64 $\pm$ 0.2	0.41 $\pm$ 0.1	3.28 $\pm$ 0.4	
20:1 $\omega$ -7	0.2 $\pm$ 0.2	0.07 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.1	-	
20:1 $\omega$ -9	-	-	-	0.07 $\pm$ 0.03	
22:1 $\omega$ -9	0.7 $\pm$ 0.3	0.16 $\pm$ 0.1	0.08 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.03	
$\Sigma$ AMI	17.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	5.48 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	25.61 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	47.58 $\pm$ 2.2 <sup>d</sup>	9.3 $\times 10^{-14}$
<b>AGP</b>					
18:2 $\omega$ -6	0.3 $\pm$ 0.1	-	1.54 $\pm$ 0.3	3.95 $\pm$ 0.1	
18:3 $\omega$ -6	-	0.08 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.1	0.54 $\pm$ 0.2	
18:3 $\omega$ -3	2.6 $\pm$ 0.1	1.13 $\pm$ 0.1	0.14 $\pm$ 0.1	0.14 $\pm$ 0.1	
18:5 $\omega$ -3	6.6 $\pm$ 1.4	4.4 $\pm$ 1.1	-	-	
20:2 $\omega$ -6	0.3 $\pm$ 0.1	0.15 $\pm$ 0.03	-	0.22 $\pm$ 0.1	
$\Sigma$ AGP	37.9 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	56.83 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>	45.53 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	21.2 $\pm$ 3.5 <sup>d</sup>	1.52 $\times 10^{-08}$
<b>AGAI</b>					

20:3 $\omega$ -6	-	-	0.26 $\pm$ 0.1	0.41 $\pm$ 0.1	
20:4 $\omega$ -6	-	-	4.24 $\pm$ 0.4	4.25 $\pm$ 1.2	
<b>20:5<math>\omega</math>-3 (EPA)</b>	9.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	14.59 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	32 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	10.27 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	1.9 $\times 10^{-09}$
21:4 $\omega$ -6	-	-	-	0.07 $\pm$ 0.02	
22:5 $\omega$ -6	-	0.42 $\pm$ 0.2	0.06 $\pm$ 0.1	1.07 $\pm$ 0.1	
<b>22:6<math>\omega</math>-3 (DHA)</b>	18.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	34.05 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	6.35 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	2 $\times 10^{-03}$
$\Sigma$ AGAI	34.7 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>	53.45 $\pm$ 3.81 <sup>b</sup>	42.66 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>	15.93 $\pm$ 3.39 <sup>d</sup>	9 $\times 10^{-09}$

Entre microalgas por cada pigmento se realizaron pruebas ANOVA (AGS, AMI, AGP, EPA y AGH), Kruskal-Wallis (DHA) al igual que una prueba *a posteriori* de pareado de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas entre microalgas. Notas: Ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AMI), poliinsaturados (AGP), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y altamente insaturados (AGAI). Los AGAI forman parte de los AGP.

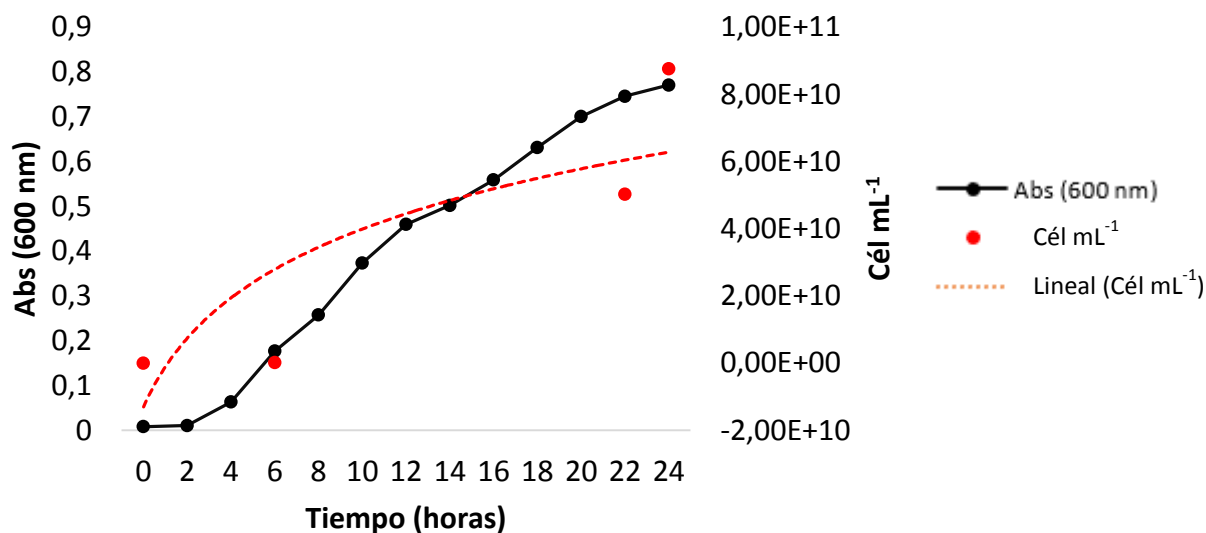
## 7.6 Curvas de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento de las bacterias se realizaron con los datos de absorbancia y el tiempo (h), al igual que con los recuentos celulares (cél mL<sup>-1</sup>), colocando líneas de tendencia a partir de los datos recabados (Figs. 9, 10 y 11). Para *V. parahaemolyticus* se inició de una DO de 0.008, teniendo la fase de aceleración a las 2 h, con una densidad óptica de 0.01 de absorbancia, siendo que la fase estacionaria inició a las 22 h con una absorbancia de 0.74., correspondiente a  $5.03 \times 10^{10}$  células mL<sup>-1</sup>, y la máxima densidad óptica fue de 0.770 en la última lectura. En *V. parahaemolyticus* el primer recuento T<sub>0</sub> fue de  $5.91 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>, en el T<sub>6</sub> de  $1.24 \times 10^8$  y la máxima densidad celular se encontró en el T<sub>24</sub> con  $8.75 \times 10^{10}$  células mL<sup>-1</sup>.



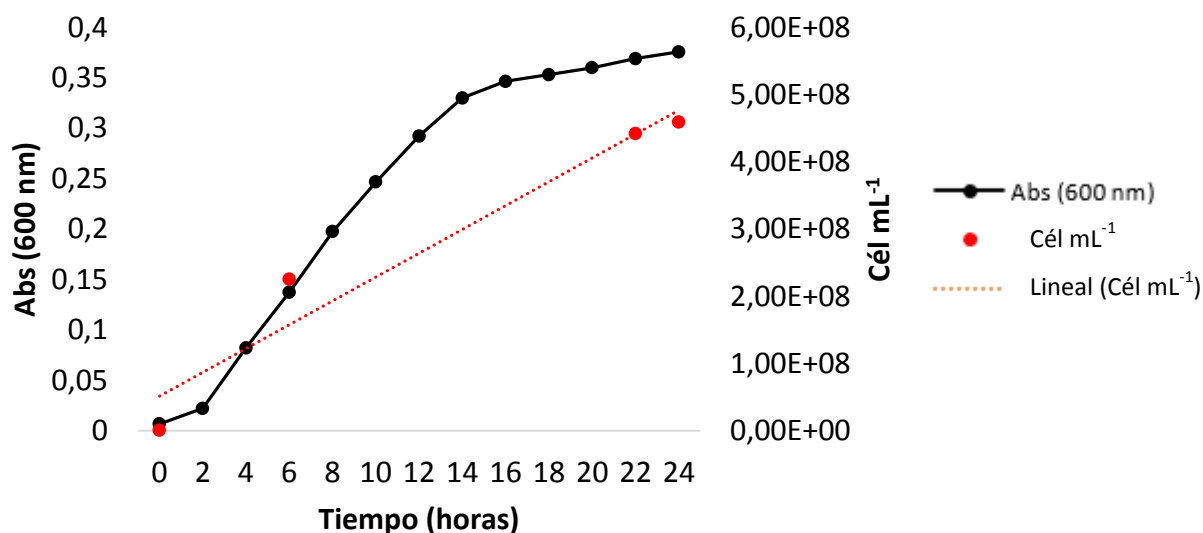
**Figura 9.** Curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*. La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas.

*E. coli* inició con una densidad óptica de 0.004 abs. La curva mostró dos fases de crecimiento a las 2 h (0.02 abs) y 12 h (0.33 abs), para finalmente llegar a la etapa estacionaria a las 22 h con una abs de 0.6, teniendo  $2.95 \times 10^{10}$  cél mL<sup>-1</sup>. *E. coli* se inició con  $4.8 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, el segundo recuento igualmente a  $T_6$  resultó en  $1.18 \times 10^8$  y en  $T_{24}$  de  $5.027 \times 10^{10}$ .



**Figura 10.** Curva de crecimiento de *Escherichia coli*. La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas.

En el caso de *S. aureus* a partir de una densidad óptica de 0.007 abs, presentó su fase de crecimiento a las 2 h y el inicio de la fase estacionaria a las 14 h, con una máxima absorbancia de 0.376, siendo la bacteria que tuvo un menor crecimiento. La bacteria que tuvo una mayor densidad a  $T_0$  fue *S. aureus* con  $8.87 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, después a  $T_6$  se contó  $2.25 \times 10^8$  y el último recuento a  $T_{24}$  fue de  $4.59 \times 10^8$ .



**Figura 11.** Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*. La curva con puntos representa la densidad óptica del promedio de 4 réplicas independientes. La línea quebrada representa la línea ajustada del recuento celular (puntos rojos) del promedio de 3 réplicas.

### 7.7 Evaluación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina

En las pruebas antibacterianas donde se utilizaron los pigmentos totales, solamente *G. catenatum* presentó actividad contra *S. aureus*. La concentración que tuvo un mayor porcentaje de inhibición fue a 44 µg de Chl *a*/ carotenos. El antibiótico utilizado (amoxicilina) tuvo un porcentaje alto de inhibición ( $88 \% \pm 5.8$ ) respecto a los resultados obtenidos con los extractos de microalgas y tuvo inhibición en las tres cepas de bacterias utilizadas (Tabla 9).

**Tabla 9.** Porcentajes de inhibición de los extractos de pigmentos totales por el método de resazurina de las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*.

Chl <i>a</i> / carotenos ( $\mu$ g)	<i>O. aurita</i>			<i>N. shiloi</i>			<i>A. margalefii</i>			<i>G. catenatum</i>			Amoxicilina		
	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83.9	85.4	94.6
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28.1	0			
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55.5	0			
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60.8	0			
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0			
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.1	0			

Notas: <sup>Ec</sup> *Escherichia coli*; <sup>Sa</sup> *Staphylococcus aureus*; <sup>Vp</sup> *Vibrio parahaemolyticus*. Control positivo: amoxicilina

Todas las microalgas presentaron inhibición para las bacterias probadas al usar los extractos de lípidos totales. *O. aurita* para *E. coli* el mayor porcentaje de inhibición fue a una concentración de 490  $\mu$ g de DHA/EPA (50% de inhibición), aunque en todas las concentraciones hubo inhibición, el menor fue porcentaje fue de 39.6%. En el caso de *S. aureus* igualmente en todas las concentraciones hubo inhibición, la más alta fue en concentraciones más bajas, siendo a 7.66  $\mu$ g de DHA/EPA la que inhibió en mayor porcentaje (83%). *V. parahaemolyticus* su crecimiento fue inhibido a dos concentraciones, siendo la máxima de 22.5% (Tabla 10).

*N. shiloi* presentó inhibición en *E. coli* siendo el valor más alto 65.2% y el más bajo de 34.2%. Para *S. aureus* los porcentajes de inhibición fueron bajos siendo el mayor de 32.4 %, el valor más bajo que mostró fue de 7.8%. En cambio, solo se encontró para *V. parahaemolyticus* una inhibición del 31% (Tabla 10).

Los lípidos totales de *A. margalefii* tuvieron un rango de 64.9 a 52.9% de inhibición para *E. coli*. En el caso de *S. aureus* se mantuvo entre 86.3 y 76.7%. También para esta microalga la inhibición fue baja para *V. parahaemolyticus*, teniendo solo un valor de inhibición de 33.6% a una concentración de 245  $\mu$ g de DHA/EPA (Tabla 10).

*G. catenatum* inhibió a *E. coli* en todas las concentraciones, teniendo el mayor porcentaje 76% a una concentración de 490 µg de DHA/EPA y siendo la más baja 57.8% a 30.63 µg de DHA/EPA. Para *S. aureus* la inhibición máxima fue mayor con 88.5%, teniendo la más baja 48.6% a una concentración de 490 µg de DHA/EPA. La inhibición máxima para *V. parahaemolyticus* fue de 15.5%. La amoxicilina inhibió a las tres bacterias con un porcentaje alto  $94.7 \pm 1.4$  (Tabla 10).

**Tabla 10.** Porcentajes de inhibición de los extractos totales lípidos totales por el método de resazurina las diatomeas *Odontella aurita* y *Nanofrustulum shiloi*, y de los dinoflagelados *Alexandrium margalefii* y *Gymnodinium catenatum*.

DHA/EPA (µg)	<i>O. aurita</i>			<i>N. shiloi</i>			<i>A. margalefii</i>			<i>G. catenatum</i>			Amoxicilina		
	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp	Ec	Sa	Vp
490	50	5.4	0	65.2	25.9	0	64.9	49.3	0	76	48.6	15.5	95.8	95.3	93.1
245	49.1	16.8	7.3	48.1	7.8	31	56.2	83.1	33.6	61.6	61	0			
122.5	39.6	42.1	0	45	16.1	0	59.8	84.2	0	58.3	74.2	0			
61.25	42.9	65.1	0	34.8	22.4	0	56	76.7	0	62.8	88.5	0			
30.63	46.9	79.7	22.5	46	32.4	0	57.4	86.9	0	57.8	59.4	0			
15.31	46.4	81.5	0	47.3	24.1	0	52.9	86.3	0	59.1	88.1	9.1			
7.66	43.5	83	0	47.5	21.7	0	64.1	84.8	0	61.4	86.6	0			

Notas: <sup>Ec</sup> *Escherichia coli*; <sup>Sa</sup> *Staphylococcus aureus*; <sup>Vp</sup> *Vibrio parahaemolyticus*. Control positivo: amoxicilina

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Pigmentos en *O. aurita*, *N. shiloi*, *G. catenatum* y *A. margalefii*

Existen diferentes parámetros ambientales que regulan la producción de los pigmentos en microalgas, como el fotoperiodo, pH, salinidad y disponibilidad de nutrientes, principalmente el nitrógeno (Begum *et al.*, 2016; Sahin *et al.*, 2019).

Los pigmentos que son típicos de las diatomeas son las clorofilas *a*,  $c_1$  y  $c_2$ , al igual que carotenoides como la fucoxantina y la diadinoxantina. Keerthi *et al.* (2013), registraron en cepas de *Odontella aurita* como sus principales pigmentos a la Chl *a* ( $59.67 \mu\text{g mL}^{-1}/59.67\%$ ) y la fucoxantina ( $52.29 \mu\text{g mL}^{-1}/52.29\%$ ), valores similares a los que se obtuvieron en la presente investigación. Asimismo, observaron diferencias en los valores cuantitativos obteniendo en mayor cantidad la diadinoxantina (10.5%), seguida de clorofila *c* ( $c_1 + c_2$ ) (6.6%), y  $\beta$ -caroteno (5.3%).

Valores para *Nanofrustulum shiloi* fueron reportados por Portuguez (2020), en el que la clorofila *c* representó el 39% del total de los pigmentos, seguido por la fucoxantina con 3% y una baja concentración de Chl *a* con 17%, así como la presencia de feoforbidos, los cuales son productos de la oxidación de la clorofila *a*. Normalmente la presencia de los productos de oxidación de la Chl *a* se pueden deber a la manipulación de la biomasa al momento de cosecharla y/o durante el proceso de extracción. Porque en el caso de la investigación de Grubišić *et al.* (2022) reportaron una concentración en mg por  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso seco de Chl *a* (131.07), fucoxantina (39.54) y de  $\beta$ -caroteno (0.36), los cuales son valores que se asemejan a lo encontrados en la presente investigación.

Para el dinoflagelado *G. catenatum* se ha reportado como el principal pigmento a la Chl *a*, seguido por el complejo de clorofila *c* ( $c_1 + c_2$ ) y carotenos como la peridinina, diadinoxantina y en menor proporción el  $\beta$ -caroteno, los cuales fueron pigmentos que se encontraron en el perfil realizado en la presente investigación. No se identificó la fucoxantina, pero algunos reportes la han identificado, a pesar de ser característica de las diatomeas (Proença *et al.*, 2001; Carreto, 2001; Montoya *et al.*, 2006).

Para el género *Alexandrium* se tiene registros para *A. tamarense* en los cuales se han descrito la composición de su perfil de pigmentos, siendo el principal la Chl *a* con 53.25%, coincidiendo con los valores del presente trabajo, y el segundo pigmento en proporción que reportaron fue la peridina con 28.25%, seguido por el complejo de clorofila *c* ( $c_1+c_2$ ) con un 10.44% y siendo el  $\beta$ -caroteno el que tiene el menor porcentaje (0.66%) (Chee Yew Leong y Taguchi, 2004). En la presente investigación el principal caroteno fue la diadinoxantina, el cual se ha reportado que en dinoflagelados corresponde entre el 20 al 30% de los carotenoides totales (Demers *et al.*, 1991).

### **8.2 Lípidos totales en *O. aurita*, *N. shiloi*, *G. catenatum* y *A. margalefii***

Se conoce que la cantidad de lípidos está relacionada a la fase de crecimiento en la que se encuentra la microalga, siendo el inicio de la fase estacionaria en la que se encuentra la mayor cantidad, que es cuando el nitrógeno del medio empieza a escasear (Wang *et al.*, 2013). El nitrógeno en las microalgas afecta directamente el metabolismo de las proteínas y de los lípidos, y en algunos casos también la ausencia de silicatos y azufre puede provocar un aumento en el contenido total de lípidos (Roleda *et al.*, 2013).

Upadhyay *et al.* (2017) reportaron un máximo de 23.7% de lípidos totales para *O. aurita*, el cual es porcentaje más bajo de lo calculado en el presente trabajo. Del mismo modo para *N. shiloi* se ha reportado valores inferiores a los obtenidos, con un 19% de lípidos totales (Portuguez, 2020). También se ha reportado un valor más cercano con 24.3% (Demirel *et al.*, 2016). Se han encontrado valores que coinciden con los reportados en la presente investigación con un porcentaje de lípidos totales para especies del género *Gymnodinium*, siendo de 29.6% (Mansour *et al.*, 2003).

### **8.3 Ácidos grasos en *O. aurita*, *N. shiloi*, *G. catenatum* y *A. margalefii***

Pasquet *et al.* (2014), caracterizaron los ácidos grasos de *O. aurita*, y reportaron valores similares a los obtenidos en la presente investigación. Identificaron el ácido mirístico (14:0) siendo en 12.51 % de los AGS, así como el ácido palmítico (16:0) con un porcentaje de 15.84% y el ácido esteárico (18:0) con 0.89%. También identificaron que la suma de AGS es de 29.95%



(ANEXO B, Tabla B1). En el caso de los AMI cuantificaron el AG 16:1 $\omega$ -7 con un 25.44% y el 18:1 $\omega$ -9 con un 2.78%, un valor superior al reportado en la presente investigación, obteniendo un total de AMI de 28.22%. También reportaron 4 ácidos grasos poliinsaturados, el 18:4 $\omega$ -3 con 0.66%, este ácido graso no fue encontrado en la caracterización del perfil de ácidos grasos que realizamos. El resto de los ácidos grasos que encontraron pertenecen a los AGH, y fueron el 20:4 $\omega$ -6 (4.78%), el EPA con 18.31%, y el DHA (1.85%) siendo un valor más bajo de lo encontrado en el presente trabajo. Se ha reportado que *O aurita* puede estar constituida por hasta un 28% total de ácido grasos (Xia *et al.*, 2013b). También Guihéneuf *et al.* (2010), obtuvieron valores similares para los AGS (30.1%), en los AMI (32.6%) fueron valores más altos y para los AGP (32.8%) fue un porcentaje más bajo al reportado en los resultados en el presente trabajo. En el perfil que obtuvieron de ácidos grasos también identificaron el 18:4 $\omega$ -3. En cuanto al EPA y el DHA fueron valores inferiores, con 25.6 y 3.8% respectivamente (ANEXO B, Tabla B1).

Para *N. shiloi*, Grubišić *et al.* (2022), realizaron un perfil de ácidos grasos identificando los AGS como el 14:0 (0.66%), 15:0 (0.38%), 16:0 (30.79%) y 17:0 (0.57%). Teniendo un total de AGS de 34.84%, los cuales son valores similares a los obtenidos en la presenta investigación. Al igual que en la cantidad de AMI (46.08%), cuantificando el 16:1 $\omega$ -7 (41.57%) como el más representativo al igual que en el presente trabajo. Se cuantificó en el trabajo mencionado al igual que la presente investigación el 20:1 $\omega$ -9 (0.14%), que únicamente fue identificado en *N. shiloi*. La cantidad de AGP asimismo fue semejante con 21.57%. El 20:3 $\omega$ -6 que se caracterizó exclusivamente en diatomeas, también lo cuantificaron con un 2.41%. Reportaron valores de EPA (6.79%) y el DHA (0.47%), los cuales igualmente son similares a los reportados en el perfil de realizado en la presente investigación (ANEXO B, Tabla B2).

Del mismo modo Portuguesez (2020) para *N. shiloi* cuantificó varios AGS como el 14:0 (3.8%), 15:0 (0.4%), 18:0 (0.4%) y siendo el de mayor cantidad el 16:0 (21%), semejante al cuantificado en el presente trabajo. El 15:1 $\omega$ -7 un AMI igualmente fue el que se cuantificó en mayor cantidad con 25%, a diferencia del 16:1 $\omega$ -6 (0.2%), que no fue identificado. Para el porcentaje de EPA que reportaron de 17% fue notoriamente superior, al reportado en el presente trabajo. La representación de AGS, AMI y AGP, no fue similar, ya que cuantificaron una menor cantidad de AGS con solo un 25.6, en consecuencia, una mayor cantidad de AMI (36.3%) y AGP (38.2%)

(ANEXO B, Tabla B2).

Hallegraeff *et al.* (1991), a partir de cultivos realizaron el perfil de ácidos grasos del dinoflagelado *G. catenatum*, calcularon una suma total de AGS de 36.1%, similar a la presente investigación. Para este tipo de ácidos grasos, también identificaron el 14:0 (3.75%), 15:0 (0.2%), 16:0 (30.35%) que igualmente fue el que se encontró en mayor cantidad. Para los AMI cuantificaron el 16 $\omega$ -7 (4.75%), 18:1 $\omega$ -9 (3.65%) similar a la presente investigación. En cambio, para los AGP tuvieron un número similar, con 52.15% e identificando tres AGP los cuales no salieron en la composición total de AG, estos fueron el 16:4 $\omega$ -3 (3.45%), 18:4 $\omega$ -3 (0.45%) y en un mínimo porcentaje el 22:2 $\omega$ -6 (0.1%). En el caso del EPA cuantificaron 14.5% y el DHA fue inferior al obtener 25.15%. Mansour *et al.* (2003), reportaron el siguiente perfil de ácidos grasos: AGS, 14:0 (1.0%), 15:0 (0.5%), 16:0 (23.4%), 18:0 (1.7%) e igualmente en la suma total de estos con un 26.7 %. Cuantificaron solo dos AMI, el 18:1 $\omega$ -9 con 3.4% siendo un bajo porcentaje de los lípidos totales, al igual que en la presente investigación. La cantidad de AGP fue superior con 63.8 %. Pero encontrando porcentajes EPA (9.9%) y DHA (27.8%). A destacar en su perfil identificaron dos ácidos grasos, que no se cuantificaron en el presente estudio el 18:4 $\omega$ -3 (3.8%) y el 28:8 $\omega$ -3 (1.8%) (ANEXO B, Tabla B3).

Se han realizado perfiles para especies del género *Alexandrium*, como los descritos por Usup *et al.* (2008) quienes cuantificaron los AG de *A. affine*, identificando los AGS 14:0 (0.55%), 16:0 (18.89%), 18:0 (8.07%), con valores similares a la presente investigación, pero una diferencia es que encontraron el 23:0 con 1.39%, un AGS que no fue cuantificado en el presente trabajo. Además, tuvieron un menor porcentaje de estos AGS, al tener un 30.2%. También obtuvieron una cantidad considerablemente superior de AMI (49.80%), destacando el 18:1 $\omega$ -9 (41.18%) y habiendo otro AG que ellos si cuantificaron el 20:1 $\omega$ -9 (8.06%). En consecuencia, también reportaron una menor cantidad de AGP (20.18%). Ellos también describieron el perfil de *A. minutum*, el cual tuvo valores más similares a la especie de *A. margalefii* con la que se trabajó en la presente investigación, al tener un porcentaje para AGS, AMI y AGP de 38.32%, 22.04% y 39.73%, respectivamente. Igualmente Hammann *et al.* (2013), trabajaron con *A. tamarense* y cuantificaron valores similares para los grupos de AG, en AGS cuantificaron 37.5%, en los AMI 23.1% y para los AGP 37.1% (ANEXO B, Tabla B4).

#### 8.4 Propiedades antibacterianas de pigmentos y ácidos grasos

La poca efectividad de los pigmentos como antibacterianos, puede estar relacionada al método de extracción, ya que se han realizado extracciones de pigmentos con diferentes solventes como metanol (polar), propanol (polar), acetona (polar) y cloroformo (no polar), siendo los solventes no polares los que han tenido una menor acción negativa a las propiedades antibacterianas en el proceso de extracción (Olatunde *et al.*, 2018).

En el caso de los pigmentos que tienen una propiedad antibacteriana, se han estudiado los posibles mecanismos que poseen, como modificar la permeabilidad de la membrana, la pérdida del citoplasma y la inhibición para que se forme los ácidos nucleicos (Karpiński y Adamczak, 2019). Además se conoce que la mayor efectividad que se tiene para inhibir a bacterias Gram positivas comparada con las Gram negativas, está dada por las diferencias que existen en la estructura y composición de la pared celular de la bacteria (Karpiński y Adamczak, 2019).

*G. catenatum* fue la única en producir una inhibición antibacteriana, este dinoflagelado es productor de toxinas paralizantes como la saxitoxina y análogos (Oshima *et al.*, 1987; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Hernández-Sandoval *et al.*, 2009). Pero estas toxinas no son solubles en acetona, éter o cloroformo, solamente en agua y metanol, y en menor grado, en etanol (Jackim y Gentile, 1968). Y los métodos de extracción de estas toxinas involucran a ácidos como solventes, como el ácido acético o ácido clorhídrico (Amaya *et al.*, 2021; Podduturi *et al.*, 2021).

En los lípidos como antibacterianos existen reportes de grupos de lípidos que inhiben el crecimiento o provocan la muerte de microorganismos. Esto sucede posiblemente por dos acciones moleculares, la primera es la interacción en sitios específicos en el microorganismo, provocando la pérdida o viabilidad de funciones bioquímicas. Otra explicación es que estas mismas interacciones afecten en su estructura, inhibiendo funciones fisiológicas (Quinn, 2011). En el caso de los ácidos grasos su acción depende en la composición de la pared celular, y este efecto inhibitor incrementa en los ácidos grasos insaturados, con el número de insaturaciones (Thormar, 2011).

Los mecanismos de este efecto antibacteriano pueden estar sujetos a diferentes factores como

la concentración, la bacteria objetivo por sus características fisiológicas y las condiciones en las que interactúa con las células bacterianas, como la temperatura y pH (Desbois, 2012). Existen diferentes mecanismos para este efecto, pueden causar una solubilidad parcial de la membrana celular, provocando la pérdida de las proteínas que, a la vez causa interferencias en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, o la inhibición de la actividad enzimática y absorción de nutrientes, inhibiendo el crecimiento bacteriano (Bergsson *et al.*, 2011; Desbois, 2012). Se ha reportado el ácido araquidónico (20:4 $\omega$ -6) produce cambios morfológicos en bacterias, como la separación interna y externa de las membranas, pérdida de la forma celular y hasta un completa desorganización celular. Otro posible método de acción de los ácidos grasos, en el caso de que ingresen a la célula es la inhibición de la biosíntesis de los ácidos grasos de la bacteria, este es un proceso que no ocurre en los compuestos antibacterianos existentes, y por ende, una mínima posibilidad de resistencia (Churchward *et al.*, 2018).

Estos efectos ocurren con menor concurrencia en bacterias Gram negativas al tener una pared celular más compleja, ya que están constituidas por una mayor cantidad de componentes. El peptidoglicano constituye entre el 5-10% del total. Este tipo de bacterias tienen una membrana externa, compuesta de una bicapa lipídica, similar a la membrana celular. Esta membrana suele mantener fuera a ciertas moléculas, como son los antibióticos y toxinas (Bruslind, 2019). Esta membrana funge como barrera contra sustancias hidrofóbicas, como son los ácidos grasos de cadena larga (Shin *et al.*, 2007). Al igual, en bacterias Gram negativas puede haber la presencia del ácido teicoico que inhibe la acción de los ácidos grasos (Kohler *et al.*, 2009). En cambio, en el caso de las bacterias Gram positivas, al tener varias capas de peptidoglicano, proveen porosidad que le puede permitir a los agente antibacterianos ingresar a través de la pared celular (Alves *et al.*, 2020), lo que podría explicar que en la bacteria Gram positiva *S. aureus* se observaran los porcentajes más altos de inhibición, para los extractos con una mayor cantidad de AGP (*O. aurita*, *A. margalefii* y *G. catenatum*).

Entre las agrupaciones de ácidos grasos se han identificado específicamente los que tienen una respuesta antibacteriana, en los AG de un largo de 6 a 18 carbonos, se ha encontrado que ácido láurico (12:0) exhibe la mayor capacidad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *S.*

*aureus* y una baja respuesta a bacterias Gram negativas como *E. coli*. Este AG se identificó en las diatomeas de la presente investigación. Otros AG que han mostrado actividad antibacteriana han sido el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0); el 16:0 se encontró en un porcentaje representativo. Para los AMI el ácido graso palmitoleico (16:1 $\omega$ -7) es el más activo (Bergsson *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2018; Casillas-Vargas *et al.*, 2021). El ácido linoleico (18:2 $\omega$ -6) ha mostrado un efecto inhibidor de crecimiento en bacterias Gram positivas, pero no en bacterias Gram negativas (Thormar, 2011); también el ácido linolénico (18:3 $\omega$ -3) ha sido de los que se ha encontrado mayor propiedad antibacteriana (Churchward *et al.*, 2018). Para el ácido eicosapentaenóico (EPA) se ha exhibido que reduce el crecimiento de *S. aureus*, así como una disminución o negativa inhibición contra *E. coli*, pero si hay reportes de *P. aeruginosa*. El mecanismo de acción de estos dos ácidos grasos (EPA y DHA) es bloquear los procesos a nivel de membrana (Shin *et al.*, 2007; Ribeiro-Vidal *et al.*, 2020).

## 9. CONCLUSIONES

Se obtuvo el perfil cuantitativo de pigmentos, destacando el alto contenido de clorofila  $\alpha$ , complejo de clorofila  $c1 + c2$ , fucoxantina y diadinoxantina. Presentándose una diferencia significativa para la diadinoxantina en *N. shiloi*, con respecto al resto de las microalgas. Además de que cuantificó los pigmentos característicos de las diatomeas y dinoflagelados (fucoxantina y peridininina).

Las diatomeas fueron las únicas en las que cuantificó al ácido láurico (12:0), el cual hay evidencia de que tiene propiedades antibacterianas. Igualmente, solo se encontró el ácido araquidónico (20:4 $\omega$ -6) en *N. shiloi* y *O. aurita*. En los diferentes grupos principales de ácidos grasos, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes microalgas. Pero, sobresalió un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienen un mayor potencial antibacteriano en bacterias Gram positivas, por la composición de su pared celular.

Los pigmentos liposolubles de *G. catenatum* mostraron un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, siendo la única en mostrar este efecto en *S. aureus*.

La presencia de una gama de ácidos grasos mostró un efecto antibacteriano, mostrando mayor sensibilidad contra la bacteria Gram positiva *S. aureus*, en los extractos de lípidos totales de las microalgas *O. aurita*, *G. catenatum* y *A. margalefii*, que fueron las que presentaron una mayor cantidad de AGP en su perfil de ácidos grasos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ahmadi, A., Shahidi, S.A., Safari, R., Motamedzadegan, A. y Ghorbani-HasanSaraei, A. (2022). Evaluation of stability and antibacterial properties of extracted chlorophyll from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 163: 112980. doi: 10.1016/j.fct.2022.112980.
- Alves, E., Dias, M., Lopes, D., Almeida, A., Domingues, M.D.R. y Rey, F. (2020). Antimicrobial lipids from plants and marine organisms: An overview of the current state-of-the-art and future prospects. *Antibiotics*, 9(8): 1-88. doi: 10.3390/antibiotics9080441.
- Amaro, H., Guedes, A. y Malcata, F. (2011). Antimicrobial activities of microalgae: An invited review. En: Mendez-Villas, A. (ed). *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, pp. 1272-1280.
- Amaya, O., Ruiz, G. y Quintanilla, R. (2021). Método de análisis destinado a la detección de toxinas marinas en productos pesqueros en El Salvador. *Revista Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 5(1): 54-59.
- Aramrueang, N., Asavasanti, S. y Khanunthong, A. (2019). Leafy Vegetables. En: Pan, Z., Zhang, R. y Zicari, S. (eds) *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, Academic press, pp. 245-272. doi: 10.1016/B978-0-12-814138-0.00010-1.
- Arjona, O., Millan, A., Ibarra, A.M. y Palacios, E. (2008). Muscle and roe lipid composition in diploid and triploid scallops. *Journal of Food Lipids*, 15(3): 407-419. doi: 10.1111/j.1745-4522.2008.00128.x.
- Arredondo-Vega, B. y Voltolina, D. (2017). Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. En: Arredondo-Vega B. O, Voltolina D., Zenteno-Zavin T., Arce-Montoya M., Gómez-Anduro G. (eds) *Métodos y Herramientas Anaplíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*, 2.<sup>a</sup> ed. México, pp 75-85.
- Balech, E. (1994). Three new species of the genus *Alexandrium* (Dinoflagellata). *Transactions of the American Microscopical Society*, 113(2): 216. doi: 10.2307/3226651.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J., Gárate-Lizárraga, I., Lechuga-Devéze, C.H., Reinhardt, K. y Luckas, B. (2005). Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae*, 4(1): 21-31. doi: 10.1016/j.hal.2003.10.004.
- Begum, H., Yusoff, F.M.D., Banerjee, S., Khatoon, H. y Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13): 2209-2222. doi: 10.1080/10408398.2013.764841.
- Behrens, P.W., Kyle, D.J. y Corp, M.B. (1996). Microalgae as a source of fatty acids. *Journal of Food Lipids*, 3(4): 259-272. doi: 10.1111/j.1745-4522.1996.tb00073.x.
- Belkin, S. y Colwell, R.R. (2005). *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Springer, United States of America. ISBN: 0-387-23708-9. doi: 10.1007/b102184.
- Bergsson, G., Hilmarsson, H. y Thormar, H. (2011). Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activities of Lipids. En: Thormar, H. (ed) *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, Wiley, p 26. doi: 10.1002/9780470976623.
- Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Haskard, K.A. y Hallegraeff, G.M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40(1): 78-87. doi: 10.2216/i0031-8884-40-1-78.1.

- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917. doi: 10.1139/o59-099.
- Bruce, D.L., Duff, D.C.B. y Antia, N.J. (1967). The Identification of Two Antibacterial Products of the Marine Planktonic Alga *Isochrysis galbana*. *Journal of General Microbiology*, 48(2): 293-298. doi: 10.1099/00221287-48-2-293.
- Bruslind, L. (2019). General microbiology. Oregon State University, Oregon, United States of America. Disponible en: <https://open.oregonstate.edu/generalmicrobiology/>.
- Carreto, J.I. (2001). Pigment profile of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. from a massive bloom in southern Chile. *Journal of Plankton Research*, 23(10): 1171-1175. doi: 10.1093/plankt/23.10.1171.
- Carty, S. y Parrow, M.W. (2015). Dinoflagellates. En: Wehr, J.D. y Sheath, R.G. (eds) *Freshwater Algae of North America*, Elsevier, pp. 773-807. doi: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00017-7.
- Carvalho, E., David, G. y Silva, R. (2012). Health and Environment in Aquaculture. InTech. ISBN: 978-953-51-0497-1. doi: 10.5772/2462
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R.G., Carballeira, N.M. y Sanabria-Ríos, D.J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82(1): 101093. doi: 10.1016/j.plipres.2021.101093
- Chaves, J. (2016). *Actividad antimicrobiana de extractos de microalgas Porphyridium cruentum y Dunaliella salina contra Vibrio parahemolyticus y Vibrio cholerae*. Tesis de Licenciatura. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de La Paz, La Paz.
- Chee Yew Leong, S. y Taguchi, S. (2004). Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: Growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia*, 515(1-3): 215-224. doi: 10.1023/B:HYDR.0000027331.49819.a4.
- Chen, Z., Wang, L., Qiu, S. y Ge, S. (2018). Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. En: Shijian, G., Usack, J. y Ma, B. (eds) *Advances and Challenges at the Waste-to-Bioenergy/Biorefinery Nexus*, *BioMed Research International*, pp. 8-24. doi: 10.1155/2018/1503126.
- Churchward, C.P., Alany, R.G. y Snyder, L.A.S. (2018). Alternative antimicrobials: The properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5): 561-570. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467875.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3): 251-258. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.004.
- Demers, S., Roy, S., Gagnon, R. y Vignault, C. (1991). Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillario-phyceae): A photo-protection mechanism. *Marine Ecology Progress Series*, 76(2): 185-193. doi: 10.3354/meps076185.
- Demirel, Z., Demirkaya, C., Imamoglu, E. y Conk Dalay, M. (2016). Diatom cultivation and lipid productivity for non-cryopreserved and cryopreserved cells. *Agronomy Research*, 14(4): 1266-1273.
- Desbois, A.P. y Lawlor, K. (2013). Antibacterial Activity of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*, 11(11):



- 4544-4557. doi: 10.3390/md11114544.
- Desbois, A.P. (2012). Potential Applications of Antimicrobial Fatty Acids in Medicine, Agriculture and Other Industries. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(2): 111-122. doi: 10.2174/157489112801619728.
- Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L. y Smith, V.J. (2008). Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4): 755-764. doi: 10.1007/s00253-008-1714-9.
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A. y 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*, 11(1): 45-52. doi: 10.1007/s10126-008-9118-5.
- Drebes, G. y Schnepf, E. (1998). Gyrodinium undulans Hulburt, a marine dinoflagellate feeding on the bloom-forming diatom *Odontella aurita*, and on copepod and rotifer eggs. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 52(1): 1-14. doi: 10.1007/BF02908731.
- Dreckmann, K.M., Senties, A. y Núñez, M.L. (2013). Manual de prácticas de laboratorio: Biología de Algas. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.
- Falaise, C., François, C., Travers, M.A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V. y Mouget, J.L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9): 1-27. doi: 10.3390/md14090159.
- FAO. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Disponible en: <http://www.fao.org/3/W3732E/w3732e00.htm#Contents>. [consulta: 6 abril 2021].
- Farmer, J.J. y Hickman-Brenner, F.W. (2003). The Genus *Vibrio* and *Photobacterium*. En: Dworkin, M., Falkow, S. y Rosenberg, E. (eds) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3th Edition, Springer-Verlag, New-York.
- Ferrario, M.E. y Sastre, A.V. (1990). Ultraestructura, polimorfismo y ecología de *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh (Bacillariophyceae) en el estuario del río Chubut, Argentina. *Revista de la Facultad de Oceanografía Pesquera y Ciencias Alimentarias de la Universidad Nacional Federico Villareal*, 2: 98-106.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., Ramilo, I., Pazos, Y. y Moroño, A. (2008). New life-cycle stages of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): Laboratory and field observations. *Aquatic Microbial Ecology*, 52(1): 13-23. doi: 10.3354/ame01206.
- Galaviz-Silva, L. (2021). *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute hepatopancreatic necrosis disease in farming shrimp of Sonora, Mexico and their antibiotic resistance. *Hidrobiológica*, 31(2): 111-123. doi: 10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n2/Galaviz.
- Gong, M. y Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8): 1396-1412. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005.
- Graham, H.W. (1943). *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society*, 62(3): 259. doi: 10.2307/3223028.
- Grubišić, M., Šantek, B., Zorić, Z., Čošić, Z., Vrana, I., Gašparović, B., Čož-Rakovac, R. y Ivančić Šantek, M. (2022). Bioprospecting of Microalgae Isolated from the Adriatic Sea: Characterization of Biomass, Pigment, Lipid and Fatty Acid Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Molecules*, 27(4): 1248. doi: 10.3390/molecules27041248.
- Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. y Tremblin, G. (2010).

- Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(5): 629-638. doi: 10.1007/s10811-010-9503-0.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229-239. doi: 10.1139/m62-029.
- Hackett, J.D., Anderson, D.M., Erdner, D.L. y Bhattacharya, D. (2004). Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 91(10): 1523-1534. doi: 10.3732/ajb.91.10.1523.
- Hallegraeff, G.M., Nichols, P.D., Volkman, J.K., Blackburn, S.I. y Everitt, D.A. (1991). Pigments, Fatty Acids, and Sterols of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum*. *Journal of Phycology*, 27(5): 591-599.
- Hammann, S., Tillmann, U., Schröder, M. y Vetter, W. (2013). Profiling the fatty acids from a strain of the microalgae *Alexandrium tamarense* by means of high-speed counter-current chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1312: 93-103. doi: 10.1016/j.chroma.2013.08.090.
- Harrington, G.W., Beach, D.H., Dunham, J.E. y Holz, G.G. (1970). The Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Dinoflagellates. *The Journal of Protozoology*, 17(2): 213-219. doi: 10.1111/j.1550-7408.1970.tb02359.x.
- Hemalatha, A., Mohammed Esa, S.A.R., Suresh, M., Thajuddin, N. y Anantharaman, P. (2017). Identification of *Odontella aurita* by rbcL gene sequence—a high antibacterial potential centric marine diatom. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 28(5): 655-661. doi: 10.3109/24701394.2016.1166222.
- Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Band-Schmidt, C.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E.J. y Bustillos-Guzmán, J.J. (2009). Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiologica*, 19(3): 245-256.
- Jackim, E. y Gentile, J. (1968). Toxins of a Blue-Green Alga: Similarity to Saxitoxin. *Science*, 162(3856): 915-916. doi: 10.1126/science.162.3856.915.
- Jeffrey, S.W. y Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2): 191-194. doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3.
- Jian, G.Q., Trent, D.A., Wei, Z. y Christopher, F. (2013). Discovery of antimicrobial activities of a marine diatom *Thalassiosira rotula*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(50): 5687-5696. doi: 10.5897/ajmr12.2183.
- Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J. y Truant, J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2(1): 23-28. doi: 10.1128/AAC.2.1.23.
- Kale, A. y Karthick, B. (2015). The diatoms: Big significance of tiny glass houses. *Resonance*, 20(10): 919-930. doi: 10.1007/s12045-015-0256-6.
- Karpiński, T.M. y Adamczak, A. (2019). Fucoxanthin—An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants*, 8(8): 239. doi: 10.3390/antiox8080239.
- Kates, M. y Volcani, B.E. (1966). Lipid components of diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 116(2): 264-278. doi: 10.1016/0005-2760(66)90009-9.
- Keerthi, S., Sujatha, A., Devi, K.U. y Sarma, N.S. (2013). Bioprospecting for nutraceutically useful

- marine diatom, *Odontella aurita* in the South-East Coast of India and medium optimization. *International Journal of Current Science*, 6: 22-28.
- Kohler, T., Weidenmaier, C. y Peschel, A. (2009). Wall Teichoic Acid Protects *Staphylococcus aureus* against Antimicrobial Fatty Acids from Human Skin. *Journal of Bacteriology*, 191(13): 4482-4484. doi: 10.1128/JB.00221-09.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M. y Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10): 1520-1527. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x.
- Konuray, G. y Erginkaya, Z. (2015). Antimicrobial and antioxidant properties of pigments synthesized from microorganisms: The Battle Against Microbial Pathogens, Basic Science. *Technological Advances and Educational Programs*, (17): 27-32. Disponible en: <http://www.microbiology5.org/microbiology5/book/27-33.pdf>.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M. y Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*, 13(9): 5847-5881. doi: 10.3390/md13095847.
- Lauritano, C., Andersen, J.H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K.Ø., Romano, G. y Ianora, A. (2016). Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Frontiers in Marine Science*, 3: 68. doi: 10.3389/fmars.2016.00068.
- Le, P. y Desbois, A. (2017). Antibacterial Effect of Eicosapentaenoic Acid against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*: Killing Kinetics, Selection for Resistance, and Potential Cellular Target. *Marine Drugs*, 15(11): 334. doi: 10.3390/md15110334.
- Leblond, J.D., Evens, T.J. y Chapman, P.J. (2003). The biochemistry of dinoflagellate lipids, with particular reference to the fatty acid and sterol composition of a *Karenia* bloom. *Phycologia*, 42(4): 324-331.
- Lincoln, R.A., Strupinski, K. y Walker, J.M. (1990). Biologically active compounds from diatoms. *Diatom Research*, 5(2): 337-349. doi: 10.1080/0269249X.1990.9705124.
- López-fuerte, F.O., Lora-Vilchis, M.C., Veleza, L., Siqueiros-Beltrones, D.A., Arredondo-Vega, B.O., Virgen-Félix, M. (2016). Primeros registros de *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer & Mcenery) Round, Hallsteinsen & Paasche y *Nitzschia nienhuisii* Sterrenburg & Sterrenburg (Bacillariophyceae; Ochrophyta) en aguas mexicanas en aguas mexicanas. *Oceánides*, 31(1): 35-41.
- Lora-Vilchis, M.C. (2022). Colección de microalgas: Lista de cepas autóctonas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, Méxco. Disponible en: <https://www.cibnor.gob.mx/investigacion/colecciones-biologicas/coleccion-de-microalgas/microalgas-listas-de-cepas>. [consulta: 28 octubre 2022].
- Maciel-Baltazar, E. y Hernández-Becerril, D.U. (2013). Especies de dinoflagelados atecados (Dinophyta) de la costa de Chiapas, sur del Pacífico mexicano. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(2): 245-259. doi: 10.4067/S0718-19572013000200005.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. y Blackburn, S.I. (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry*, 63(2): 145-153. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00052-9.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K., Jackson, A.E. y Blackburn, S.I. (1999). The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 35(4): 710-720. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3540710.x.
- Marsh, J.B. y Weinstein, D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7(4): 574-576.

- Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L. y Wielgosz-Collin, G. (2018). Lipids from microalgae. En: Levine, L.A. y Fleurence, J. (eds) *Microalgae in Health and Disease Prevention, Academic press*, pp. 109-131. doi: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00005-0.
- Mok, J.S., Cho, S.R., Park, Y.J., Jo, M.R., Ha, K.S., Kim, P.H. y Kim, M.J. (2021). Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 171: 112785. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112785.
- Montoya, N.G., Akselman, R., Carignan, M.O. y Carreto, J.I. (2006). Pigment profile and toxin composition during a red tide of *Gymnodinium catenatum* Graham and *Myrionecta rubra* (Lohman) Jankowski in coastal waters off Mar del Plata, Argentina. *African Journal of Marine Science*, 28(2): 199-202. doi: 10.2989/18142320609504147.
- Moreno, R., Gorriti, M., Flores, M. y Albarracín, V. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca (Biología) Serie Microbiología*, 5(5): 94-109.
- Morquecho-Escamilla, L. y Reyes-Salinas, A. (2022). Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. Disponible en: <http://www.cibnor.mx/investigacion/colecciones-biologicas/codimar>. [consulta: 16 de octubre del 2022].
- Morquecho-Escamilla, L., Reyes-salinas, A. y Okolodkov, Y. (2016). Guía taxonómica ilustrada de la Colección de Dinoflagelados (CODIMAR). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México.
- Mowbray, S. (1957). The Antibacterial Activity of Chlorophyll. *British Medical Journal*, 1(5013): 268-270. doi: 10.1136/bmj.1.5013.268.
- Nagai, H., Satake, M. y Yasumoto, T. (1990). Antimicrobial activities of polyether compounds of dinoflagellate origins. *Journal of Applied Phycology*, 2(4): 305-308. doi: 10.1007/BF02180919.
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1): 1-12. doi: 10.20884/1.oa.2016.12.1.24.
- OIE. (2009). Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal. 12a. ed. París, Francia. ISBN: 978-92-9044-757-3.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S. y Vongkamjan, K. (2018). Antioxidant and antibacterial properties of guava leaf extracts as affected by solvents used for prior dechlorophyllization. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5): e12600. doi: 10.1111/jfbc.12600.
- Olatunde, O. O., Tan, S. L Della., Shiekh, K. A., Benjakul, S. y Nirmal, N. P. (2021). Ethanolic guava leaf extracts with different chlorophyll removal processes: Anti-melanosis, antibacterial properties and the impact on qualities of Pacific white shrimp during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 341: 128251. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128251.
- Oren, A. (2011). Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. En: Rainey, F. y Oren, A. (eds) *Methods in Microbiology, Academic press*, pp. 261-282.
- Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G. y Blackburn, S. (1987). Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon*, 25(10): 1105-1111. doi: 10.1016/0041-0101(87)90267-4.
- Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H.M. y Guedes, A.C. (2020). Pigments from microalgae. En: Jacob-Lopes, E., Maroneze, M.M., Queiroz, M.I. y Zepka, L.Q. (eds) *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products, Elsevier*, pp. 465-492. doi: 10.1016/b978-0-12-818536-

0.00018-x.

- Pan, C-Y., Liu, Y-H., Gong, H-Y. y Chen, J-Y. (2017). Transcriptome analysis of the effect of polyunsaturated fatty acids against *Vibrio vulnificus* infection in *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 62: 153-163. doi: 10.1016/j.fsi.2017.01.018.
- Pasquet, V., Ulmann, L., Mimouni, V., Guihéneuf, F., Jacquette, B., Morant-Manceau, A. y Tremblin, G. (2014). Fatty acids profile and temperature in the cultured marine diatom *Odontella aurita*. *Journal of Applied Phycology*, 26(6): 2265-2271. doi: 10.1007/s10811-014-0252-3.
- Percival, S.L. y Williams, D.W. (2014). *Vibrio*. En: Percival, S.L., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M. y Gray, N.F. (eds) *Microbiology of Waterborne Diseases*, Elsevier, pp. 237-248.
- Pina-Pérez, M.C., Rivas, A., Martínez, A. y Rodrigo, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, 235: 34-44. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.033.
- Pírez, M. y Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 23-42.
- Poddaturi, R., Schlüter, L., Liu, T., Osti, J.A.S., Moraes, M de A.B. y Jørgensen, N.O.G. (2021). Monitoring of saxitoxin production in lakes in Denmark by molecular, chromatographic and microscopic approaches. *Harmful Algae*, 101: 101966. doi: 10.1016/j.hal.2020.101966.
- Portuguez, B. (2020). *Bioprospección de la diatomea Nanofrustulum shiloi (Bacillariophyceae), nativa del noroeste de Baja California Sur, México, para uso como alimento alternativo en sistemas acuícolas. Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica.
- Pozo-Miranda, F. y Pinoargote Véliz, S. (2021). Evaluación de extracto etanólico de hojas de tomillo *Thymus vulgaris* como inhibidor de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus*. *CIENCIA UNEMI*, 14(37): 81-91. doi: 10.29076/issn.2528-7737vol14iss37.2021pp81-91p.
- Pradhan, J., Das, B.K., Sahu, S., Marhual, N.P., Swain, A.K., Mishra, B.K. y Eknath, A.E. (2012). Traditional antibacterial activity of freshwater microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. *Aquaculture Research*, 43(9): 1287-1295. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02932.x.
- Proença, L., Tamanaha, M. y Souza, N. (2001). The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in southern Brazilian waters. *Atlântica*, 23: 59-65.
- Quinn, P. (2011). Membranes as Targets of Antimicrobial Lipids. En: Thormar, H. (ed) *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, Wiley, pp. 1-22.
- Ravikumar, S., Uma, G. y Gokulakrishnan, R. (2016). Antibacterial property of halobacterial carotenoids against human bacterial pathogens. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 75(4): 253-257.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H. y Gozlan, R.E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications*, 11(1): 1-8. doi: 10.1038/s41467-020-15735-6.
- Reyes, M., Guerra, K. y Gijón, D. (2020). Plantas aromáticas: Métodos para medir su actividad. Manual de Laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. ISBN: 978-607-7634-22-5.
- Ribeiro-Vidal, H., Sánchez, M.C., Alonso-Español, A., Figuero, E., Ciudad, M.J., Collado, L., Herrera, D. y Sanz, M. (2020). Antimicrobial Activity of EPA and DHA against Oral Pathogenic Bacteria Using an *In Vitro* Multi-Species Subgingival Biofilm Model. *Nutrients*, 12(9): 2812. doi:

- 10.3390/nu12092812.
- Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Leakey, R.J.G., Day, J.G., Bell, E.M. y Stanley, M.S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 129: 439-449. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.043.
- Rustan, A.C. y Drevon, C.A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Science*, 1-7. doi: 10.1038/npg.els.0003894
- Sahin, M.S., Khazi, M.I., Demirel, Z. y Dalay, M.C. (2019). Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia* sp. and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17: 390-398. doi: 10.1016/j.bcab.2018.12.023.
- Sajjadi, B., Chen, W.Y., Raman, A.A.A. y Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97: 200-232. doi: 10.1016/j.rser.2018.07.050.
- Santos, L. y Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2): 135-143. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010.
- Sar, E.A. y Sunesen, I. (2003). *Nanofrustulum shiloi* (Bacillariophyceae) from the Gulf of San Matías (Argentina): Morphology, distribution and comments about nomenclature. *Nova Hedwigia*, 77(3-4): 399-406. doi: 10.1127/0029-5035/2003/0077-0399.
- Selina, M.S. y Morozova, T.V. (2005). First records of dinoflagellates *Alexandrium margalefii* Balech, 1994 and *A. tamutum* Montresor, Beran et John, 2004 in the Seas of the Russian Far East. *Russian Journal of Marine Biology*, 31(3): 187-191. doi: 10.1007/s11179-005-0066-x.
- Sharma, G.M., Michaels, L. y Burkholder, P.R. (1968). Goniiodomin, a new antibiotic from a dinoflagellate. *The Journal of Antibiotics*, 21(11): 659-664. doi: 10.7164/antibiotics.21.659.
- Shin, S.Y., Bajpai, V.K., Kim, H.R. y Kang, S.C. (2007). Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9): 1515-1519. doi: 10.1016/j.lwt.2006.12.005.
- Singh, A.K., Rana, H.K. y Pandey, A.K. (2020). Analysis of chlorophylls. En: Silva, A.S., Nabavi, S.F., Saeedi, M. y Nabavi, S.M. (eds) *Recent Advances in Natural Products Analysis*, pp. 635-650.
- Singh, J. y Saxena, R.C. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. En: Kim, S.K. (ed) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, Academic press, pp. 11-24. doi: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. (ed) *Handbook of phycolgical methods: culture methods and growth measurements*, Cambridge University Press, pp. 321-343.
- Soto-Rodríguez, S.A., Magallón-Servín, P., López-Vela, M. y Nieves Soto, M. (2022). Inhibitory effect of marine microalgae used in shrimp hatcheries on *Vibrio parahaemolyticus* responsible for acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 53(4): 1337-1347. doi: 10.1111/are.15668.
- Strickland, J.D.H. y Parsons, T.R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2da. ed. Fisheries Board of Canada, Ottawa, Canadá.
- Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. y Thomas, J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* against shrimp pathogen

- Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 433: 467-475. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.07.003.
- Thormar, H. (2011). Antibacterial Effects of Lipids: Historical Review (1881 to 1960). En: Thormar, H. (ed) *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, Wiley, pp. 25-45.
- Uçar, Y., Özogul, F., Durmuş, M., Özogul, Y., Köşker, R., Küley, B. y Ayas, D. (2019). Purification of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) From Fish Oil Using HPLC Method and Investigation of Their Antibacterial Effects on Some Pathogenic Bacteria. *Turkish Journal of Maritime and Marine Sciences*, 1: 35-43.
- Upadhyay, S., Lawrence, K., Sudhir, K.S. y Anantharaman, P. (2017). Lipid Screening, Extraction and Production of Biodiesel from Marine Diatom *Odontella aurita*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3): 1259-1269. doi: 10.20546/ijcmas.2017.603.145.
- Usup, G., Hamid, S.Z., Chiet, P.K., Wah, C.K. y Ahmad, A. (2008). Marked Differences in Fatty Acid Profiles of Some Planktonic and Benthic Marine Dinoflagellates from Malaysian Waters. *Phycologia*, 47(1): 105-111. doi: 10.2216/07-55.1.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailliau, C. y Marty, J-C. (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll *a* from divinylchlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18(12): 2377-2382. doi: 10.1093/plankt/18.12.2377.
- Virgen-Félix, M. y Lora-Vilchis, M. (2017). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. y Gómez-Anduro, G.A. (eds) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 2.<sup>a</sup> ed. CIBNOR, México, pp. 33-44.
- Walter, C.S. y Mahesh, R. (2000). Antibacterial and antifungal activities of some marine diatoms in culture. *Indian Journal of Marine Sciences*, 29(3): 238-242.
- Wang, E., Braun, M.S. y Wink, M. (2019). Chlorophyll and Chlorophyll Derivatives Interfere with Multi-Drug Resistant Cancer Cells and Bacteria. *Molecules*, 24(16): 2968. doi: 10.3390/molecules24162968.
- Wang, H.M.D., Li, X.C., Lee, D.J. y Chang, J.S. (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technology*, 244(1): 1407-1415. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.198.
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M. y Hu, Q. (2013). A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*, 129: 289-295. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.062.
- Witte, C-P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3): 431-438. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.010.
- Xia, S., Wan, L., Li, A., Sang, M. y Zhang, C. (2013a). Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(6): 1163-1173. doi: 10.1007/s00343-013-2092-4.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q. y Zhang, C. (2013b). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 11(7): 2667-2681. doi: 10.3390/md11072667.
- Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjolfsson, S. y Fu, W. (2017). Exploring valuable lipids in diatoms. *Frontiers in Marine Science*, 4(1): 1-10. doi: 10.3389/fmars.2017.00017.
- Yilmaz, C. y Gökmen, V. (2015). Chlorophyll. En: Caballero, B., Finglas, P.M. y Toldra, F. (eds) *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier Science, pp. 37-41. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00147-1

- Yoon, B., Jackman, J., Valle-González, E. y Cho, N-J. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1114. doi: 10.3390/ijms19041114.
- Zachleder, V., Bisova, K. y Vitova, M. (2016). The Cell Cycle of Microalgae. En: Borowitzka, M.A., Beardall, J. y Raven, J.A. (eds) *The Physiology of Microalgae*, Springer, pp. 3-46. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2.
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C. y Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 723515. doi: 10.1155/2015/723515.
- Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H. y Kim, W.G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 579(23): 5157-5162. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.028.



## 11. ANEXOS

## ANEXO A

**Tabla A1.** Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) del ácido docosaheptaenoico (DHA) en distintas bacterias y solventes utilizados.

Gram	Género	Especie	MIC	Solvente	Referencias
			$\mu\text{g mL}^{-1}$		
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	500	DMSO	
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1800	DMSO	(Shin <i>et al.</i> , 2007)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1350	DMSO	
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1650	DMSO	
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	1280	DMSO (9.6%)	(Desbois y Lawlor, 2013)
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	500	DMSO (5%)	(Uçar <i>et al.</i> , 2019)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1800	DMSO (5%)	
-	<i>Vibrio</i>	<i>vulnificus</i>	200	DMSO	(Pan <i>et al.</i> , 2017)

**Tabla A2.** Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) del ácido eicosapentaenoico (EPA) en distintas bacterias y solventes utilizados.

Gram	Género	Especie	MIC	Solvente	Referencias
			$\mu\text{g mL}^{-1}$		
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	500	DMSO	
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	2350	DMSO	(Shin <i>et al.</i> , 2007)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1650	DMSO	
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1800	DMSO	
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	1280	DMSO (9.6%)	(Desbois y Lawlor, 2013)
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	500	DMSO (5%)	(Uçar <i>et al.</i> , 2019)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	2350	DMSO (5%)	
-	<i>Vibrio</i>	<i>vulnificus</i>	300	DMSO	(Pan <i>et al.</i> , 2017)
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	640	Etanol	(Le y Desbois, 2017)

**Tabla A3.** Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de clorofila *a* en distintas bacterias y solventes utilizados.

Gram	Género	Especie	MIC	Solvente	Referencias
			$\mu\text{M}$		
			$\mu\text{g mL}^{-1}$		
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>		64	(Wang <i>et al.</i> , 2019)
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>		128	Etanol
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		64	Etanol (Olatunde <i>et al.</i> , 2021)
-	<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>		32	Etanol
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	100		(Ahmadi <i>et al.</i> , 2022)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	100		

**Tabla A4.** Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de carotenos en distintas bacterias y solventes utilizados.

Gram	Género	Especie	MIC	Solvente	Referencias
			$\mu\text{g mL}^{-1}$		
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	256	DMSO	
+	<i>Staphylococcus</i>	<i>pyogens</i>	256	DMSO	(Ravikumar <i>et al.</i> , 2016)
-	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	256	DMSO	

## ANEXO B

**Tabla B1.** Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados de la diatomea *Odontella aurita* del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-".

AG	Presente trabajo	<i>O. aurita</i> (Grubišić <i>et al.</i> , 2022)	<i>O. aurita</i> (Portuguez, 2020)
<b>AGS</b>			
12:0	0.06 ± 0.1	-	-
13:0	0.32 ± 0.04	-	-
14:0	1.79 ± 0.2	0.66	3.8 ± 0.5
15:0	0.38 ± 0.2	0.38	0.4 ± 0.1
16:0	25.89 ± 1.2	30.79	21 ± 1
17:0	0.11 ± 0.02	0.57	-
18:0	1.71 ± 0.5	-	0.4 ± 0.1
20:0	0.21 ± 0.03	-	-
22:0	0.44 ± 0.1	-	-
24:0	0.3 ± 0.1	-	-
ΣAGS	31.22 ± 1.3	34.84	25.6
<b>AMI</b>			
14:1ω-8	-	-	-
15:1ω-8	-	-	-
16:1ω-9	0.48 ± 0.02	-	-
16:1ω-7	41.69 ± 1.8	41.57	32 ± 3
16:1ω-6	-	-	0.2 ± 0.1
16:1ω-5	0.21 ± 0.03	-	0.4 ± 0.1
16:1ω-11	-	-	1.2 ± 0.2
18:1ω-9	1.79 ± 0.4	-	2.5 ± 0.2
18:1ω-7	3.28 ± 0.4	-	-
20:1ω-7	-	-	-
20:1ω-9	0.07 ± 0.03	0.14	-
22:1ω-9	0.07 ± 0.03	-	-

$\Sigma$ AMI	47.58 $\pm$ 2.2	46.08	36.3
<b>AGP</b>			
16:2 $\omega$ -6	-	-	0.3 $\pm$ 0.1
16:2 $\omega$ -4	-	-	1.6 $\pm$ 0.1
16:3 $\omega$ -6	-	-	0.5 $\pm$ 0.2
16:3 $\omega$ -4	-	-	4.6 $\pm$ 0.8
16:4 $\omega$ -3	-	-	0.3 $\pm$ 0.1
18:2 $\omega$ -6	3.95 $\pm$ 0.1	-	4 $\pm$ 1
18:3 $\omega$ -6	0.54 $\pm$ 0.2	-	0.9 $\pm$ 0.3
18:3 $\omega$ -3	0.14 $\pm$ 0.1	-	
18:4 $\omega$ -3	-	-	0.3 $\pm$ 0.1
20:2 $\omega$ -6	0.22 $\pm$ 0.1	-	-
$\Sigma$ AGP	21.2 $\pm$ 3.5	21.57	38.2
<b>AGH</b>			
20:3 $\omega$ -6	0.41 $\pm$ 0.1	2.41	1 $\pm$ 0.3
20:4 $\omega$ -6	4.25 $\pm$ 1.2	-	4.2 $\pm$ 0.4
<b>20:5<math>\omega</math>-3 (EPA)</b>	10.27 $\pm$ 2.3	6.79	17 $\pm$ 2
21:4 $\omega$ -6	0.07 $\pm$ 0.02	-	-
22:5 $\omega$ -6	1.07 $\pm$ 0.1	-	-
<b>22:6<math>\omega</math>-3 (DHA)</b>	0.27 $\pm$ 0.1	0.47	-

**Tabla B2.** Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados de la diatomea *Nanofrustulum shiloi*, del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-".

AG	Presente trabajo	<i>N. shiloi</i> (Pasquet <i>et al.</i> , 2014)	<i>N. shiloi</i> (Guihéneuf <i>et al.</i> , 2010)
<b>AGS</b>			
12:0	0.07 $\pm$ 0.1	-	-
13:0	0.45 $\pm$ 0.2	-	-
14:0	11.03 $\pm$ 0.9	12.51 $\pm$ 0.66	13.8 $\pm$ 1.5
15:0	0.82 $\pm$ 0.2	-	-
16:0	14.59 $\pm$ 1.5	15.84 $\pm$ 0.64	16.9 $\pm$ 0.7
17:0	0.09 $\pm$ 0.1	-	-
18:0	0.84 $\pm$ 0.4	-	3.1 $\pm$ 0.2
20:0	0.29 $\pm$ 0.2	-	-
22:0	0.34 $\pm$ 0.1	-	-
24:0	0.33 $\pm$ 0.2	-	-
$\Sigma$ AGS	28.85 $\pm$ 1.51	29.25 $\pm$ 0.43	33.8 $\pm$ 2.3
<b>AMI</b>			
16:1 $\omega$ -9	0.36 $\pm$ 0.1	-	-
16:1 $\omega$ -7	23.99 $\pm$ 0.4	25.44 $\pm$ 0.23	14.6 $\pm$ 0.6

16:1 $\omega$ -5	0.2 $\pm$ 0.1	-	-
18:1 $\omega$ -9	0.35 $\pm$ 0.5	2.78 $\pm$ 0.41	4 $\pm$ 0.3
18:1 $\omega$ -7	0.41 $\pm$ 0.1	-	-
20:1 $\omega$ -7	0.22 $\pm$ 0.1	-	-
22:1 $\omega$ -9	0.08 $\pm$ 0.05	-	-
$\Sigma$ AMI	25.61 $\pm$ 0.8	28.22 $\pm$ 0.29	18.7 $\pm$ 0.9
<b>AGP</b>			
18:2 $\omega$ -6	1.54 $\pm$ 0.3	-	1.2 $\pm$ 0.4
18:3 $\omega$ -6	0.94 $\pm$ 0.1	-	0.7 $\pm$ 0.2
18:3 $\omega$ -3	0.14 $\pm$ 0.1	-	-
18:4 $\omega$ -3	-	0.66 $\pm$ 0.35	7.2 $\pm$ 0.9
$\Sigma$ AGP	45.53 $\pm$ 2.2	25.60 $\pm$ 1.59	46.1 $\pm$ 1.8
<b>AGH</b>			
20:3 $\omega$ -6	0.26 $\pm$ 0.1	-	-
20:4 $\omega$ -6	4.24 $\pm$ 0.4	4.78 $\pm$ 0.48	0.1 $\pm$ 0.1
<b>20:5<math>\omega</math>-3 (EPA)</b>	32 $\pm$ 2.2	18.31 $\pm$ 1.11	22.6 $\pm$ 0.5
22:5 $\omega$ -6	0.06 $\pm$ 0.1	-	0.9 $\pm$ 0.1
<b>22:6<math>\omega</math>-3 (DHA)</b>	6.35 $\pm$ 0.6	1.85 $\pm$ 0.37	13.4 $\pm$ 0.5

**Tabla B3.** Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-".

AG	Presente trabajo	<i>G. catenatum</i> (Hallegraeff <i>et al.</i> , 1991)	<i>G. catenatum</i> (Mansour <i>et al.</i> , 2003)
<b>AGS</b>			
13:0	0.51 $\pm$ 0.1	-	-
14:0	2.88 $\pm$ 0.2	3.75	1.0 $\pm$ 0.1
15:0	0.1 $\pm$ 0.03	0.2	0.5 $\pm$ 0.1
16:0	26.19 $\pm$ 2.2	30.35	23.4 $\pm$ 0.1
17:0	0.07 $\pm$ 0.02	-	-
18:0	2.17 $\pm$ 0.6	1.6	1.7 $\pm$ 0.1
20:0	0.56 $\pm$ 0.4	0.2	-
22:0	1.45 $\pm$ 0.8	-	-
24:0	3.75 $\pm$ 1.1	-	-
$\Sigma$ AGS	37.7 $\pm$ 3.69	36.1	26.7 $\pm$ 0.1
<b>AMI</b>			
14:1 $\omega$ -8	0.3 $\pm$ 0.03	-	-
15:1 $\omega$ -8	0.6 $\pm$ 0.1	-	-
16:1 $\omega$ -9	0.66 $\pm$ 0.1	-	-
16:1 $\omega$ -7	0.57 $\pm$ 0.01	4.75	-
16:1 $\omega$ -5	0.19 $\pm$ 0.1	-	-

18:1 $\omega$ -9	1.31 $\pm$ 0.1	3.75	3.4 $\pm$ 0.2
18:1 $\omega$ -7	1.64 $\pm$ 0.2	1.5	0.0 $\pm$ 0.1
20:1 $\omega$ -7	0.07 $\pm$ 0.04	-	-
22:1 $\omega$ -9	0.16 $\pm$ 0.1	-	-
$\Sigma$ AMI	5.48 $\pm$ 0.2	10.45	3.4 $\pm$ 0.2
<b>AGP</b>			
16:4 $\omega$ -6	-	3.45	-
18:2 $\omega$ -6	-	4.8	5.1 $\pm$ 0.1
18:3 $\omega$ -6	0.08 $\pm$ 0.03	-	-
18:3 $\omega$ -3	1.13 $\pm$ 0.1	0.8	-
18:4 $\omega$ -3	-	0.45	3.8 $\pm$ 0.1
18:5 $\omega$ -3	4.4 $\pm$ 1.1	2.7	15.5 $\pm$ 0.7
20:2 $\omega$ -6	0.15 $\pm$ 0.03	0.1	-
$\Sigma$ AGP	56.83 $\pm$ 3.8	52.15	63.8 $\pm$ 0.3
<b>AGH</b>			
20:4 $\omega$ -6	-	14.55	-
<b>20:5<math>\omega</math>-3 (EPA)</b>	14.59 $\pm$ 1.7	-	9.9 $\pm$ 0.4
22:5 $\omega$ -6	0.42 $\pm$ 0.2	0.1	-
<b>22:6<math>\omega</math>-3 (DHA)</b>	34.05 $\pm$ 1.5	25.75	27.8 $\pm$ 0.8

**Tabla B4.** Comparación de los ácidos grasos (% ácidos grasos totales) que fueron identificados del dinoflagelado *Alexandrium margalefii* del presente trabajo y de reportes previos. Los ácidos grasos que no fueron cuantificados son señalados con "-".

AG	Presente trabajo	<i>A. affine</i> (Usup <i>et al.</i> , 2008)	<i>A. minutum</i> (Usup <i>et al.</i> , 2008)	<i>A. tamarense</i> (Hamman <i>et al.</i> , 2013)
<b>AGS</b>				
13:0	0.9 $\pm$ 0.1	-	-	-
14:0	2.8 $\pm$ 0.5	0.55 $\pm$ 0.07	2.22 $\pm$ 0.13	12.2
15:0	0.2 $\pm$ 0.04	-	-	0.3
16:0	23.9 $\pm$ 2.1	18.89 $\pm$ 3.4	15.83 $\pm$ 2.37	22.9
17:0	0.2 $\pm$ 0.03	-	-	-
18:0	4.9 $\pm$ 0.6	8.07 $\pm$ 1.13	19.44 $\pm$ 3.69	1.5
20:0	1.4 $\pm$ 0.3	0.56 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.06	-
22:0	2.4 $\pm$ 1.3	0.28 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	-
23:0	-	1.39 $\pm$ 0.09	-	-
24:0	7.5 $\pm$ 2.3	0.28 $\pm$ 0.04	-	0.6
$\Sigma$ AGS	44.3 $\pm$ 2.06	30.02	38.32	37.5
<b>AMI</b>				
16:1 $\omega$ -9	1 $\pm$ 0.1	-	-	-
16:1 $\omega$ -7	2.7 $\pm$ 0.4	-	-	1.3

16:1 $\omega$ -5	1 $\pm$ 0.2	-	-	0.3
16:1 $\omega$ -11	-	-	-	0.4
18:1 $\omega$ -9	3.7 $\pm$ 0.4	41.18 $\pm$ 2.8	22.04 $\pm$ 0.03	17.1
18:1 $\omega$ -7	8.5 $\pm$ 0.8	-	-	4
20:1 $\omega$ -7	0.2 $\pm$ 0.2	-	-	-
20:1 $\omega$ -9	-	8.06 $\pm$ 1.53	-	-
22:1 $\omega$ -9	0.7 $\pm$ 0.3	-	2.78 $\pm$ 0.30	-
$\Sigma$ AMI	17.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	49.80	22.04	23.1
<b>AGP</b>				
18:2 $\omega$ -6	0.3 $\pm$ 0.1	1.02 $\pm$ 1.5	-	0.9
18:3 $\omega$ -3	2.6 $\pm$ 0.1	0.60 $\pm$ 0.11	-	2.3
18:4 $\omega$ -3				9
18:3 $\omega$ -6	-	5.28 $\pm$ 1.00	2.50 $\pm$ 0.32	-
18:5 $\omega$ -3	6.6 $\pm$ 1.4	-	-	11.7
20:2 $\omega$ -6	0.3 $\pm$ 0.1	-	-	-
$\Sigma$ AGP	37.9 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	20.18	39.73	37.1
<b>AGH</b>				
<b>20:5<math>\omega</math>-3 (EPA)</b>	9.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	-	2.78 $\pm$ 0.30	2.8
22:2	-	1.28 $\pm$ 0.19	28.89 $\pm$ 3.75	-
<b>22:6<math>\omega</math>-3 (DHA)</b>	18.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	-	-	10.4