



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE  
BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA  
FACULTAD DE RECURSOS DEL MAR  
DEPARTAMENTO DE  
ACUICULTURA

**EFFECTO DE LA ELECTROLIZACIÓN DEL AGUA DE MAR SOBRE LA  
CONCENTRACIÓN Y ACTIVIDAD BACTERIANA ASI COMO EN EL CULTIVO  
DE LAS MICROALGAS *Isochrysis galbana* (CLON ISO) E *Isochrysis* sp. (CLON  
TISO) Y VIABILIDAD DE BACTERIAS PROBIOTICAS**

---

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE  
BIOLOGO ACUICULTOR**

---

**SUSTENTADO POR EL BACHILLER  
GUSTAVO JULIO VALENCIA CRUZ**

**NVO. CHIMBOTE - PERU**

**2004**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
BIOLOGÍA EN ACUICULTURA

*EFFECTO DE LA ELECTROLIZACION DEL AGUA DE MAR SOBRE LA  
CARGA Y ACTIVIDAD BACTERIANA ASI COMO EN EL CULTIVO DE LAS  
MICROALGAS Isochrysis galbana (CLON ISO) E Isochrysis sp. (CLON TISO)  
ASOCIADA A BACTERIAS PROBIOTICAS*

SUSTENTADO POR EL BACHILLER  
GUSTAVO JULIO VALENCIA CRUZ

APROBADO POR UNANIMIDAD, CON CALIFICATIVO  
DE **EXCELENTE** POR EL JURADO EVALUADOR



Msc. Luis Angel Castro Alvarado  
Presidente



Dr. Manuel Fukushima Nagaoka  
Miembro del Jurado



Msc. Fernando Merino Moya  
Miembro del Jurado



Blgo. Eliana Zefada Mázmele  
Asesor de Tesis

Nvo. Chimbote , Julio de 2004

## INDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
Indice de Figuras.....	iii
Indice de Tablas.....	iv
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	3
III. HIPOTESIS.....	3
II. OBJETIVOS.....	4
III. MARCO TEORICO.....	5
a. Control microbiológico en acuicultura.....	5
b. <i>Isochrysis sp.</i> ....	8
c. Probióticos.....	11
d. Probioticos <i>Vibrio C33</i> y <i>Pseudomona 11</i> . ....	13
e. Electrolización.....	16
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
4.1. Ubicación de la experiencia.....	18
4.2. Electrolización del agua de mar.....	18

4.3. Efecto del proceso de electrolización en la actividad y carga bacteriana del agua de mar. ....	18
4.4. Efecto del agua de mar electrolizada en el crecimiento de <i>Isochrysis sp.</i> (Clon T-iso). ....	20
4.5. Efecto del agua de mar electrolizada en la viabilidad de bacterias probióticas en cultivos de <i>Isochrysis galbana</i> . ....	21
4.6. Análisis estadístico. ....	22
V. RESULTADOS. ....	23
5.1. Electrolización del agua de mar. ....	23
5.2. Efecto del proceso de electrolización en la actividad y carga bacteriana del agua de mar. ....	23
5.3. Efecto del agua de mar electrolizada en el crecimiento de <i>Isochrysis sp.</i> ....	28
5.4. Efecto del agua de mar electrolizada en la viabilidad de bacterias probióticas en cultivos de <i>Isochrysis galbana</i> . ....	36
VI. DISCUSIÓN. ....	44
VII. CONCLUSIONES. ....	51
VIII. RECOMENDACIONES. ....	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....	53
X. GLOSARIO. ....	72
XI. ANEXO. ....	73

## DEDICATORIA

A mi adorada madre, *Margarita*,  
por todo su amor, esfuerzo y confianza  
por ser la razón que impulso mis  
anhelos de superación

A *Raúl*, mi hermano, por que  
sus logros motivan siempre mis  
deseos de superación.

A *Sonia*, mi gran amor  
por todo su apoyo y comprensión  
por ser la luz en mi camino, la  
dueña de mi corazón.

*Gustavo Julio Valencia Cruz*

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Carlos Riquelme Salamanca por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Antofagasta.
- A mis amigos, Ing. Milko Jorquera, Ing. Alejandro Rojas, Ing. Fernando Silva, Ing. Manuel Zapata y Johanna Muñoz por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo.
- A mi padre Julio Valencia Medina, por todo su apoyo durante la realización de mi tesis.
- Al Msc. Fernando Merino Moya, por brindarme sus conocimientos y amistad, por todo su apoyo durante mi etapa de formación profesional.
- Al Blgo. Pesq. Eliana Zelada Mázmela por todo su apoyo y valioso aporte para la culminación del presente informe.

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ficha técnica de las microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> cepas CCMP1324 y CCMP1323. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Aspectos nutricionales de las microalgas del género <i>Isochrysis</i> sp. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Características bioquímicas y resistencia a drogas de las cepas <i>Vibrio</i> C33 y <i>Pseudomona</i> 11.....	13
<b>Tabla 4.</b> Características físico-químicas del agua de mar electrolizada. ....	24
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza ANOVA para Bacterias totales. ....	24
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Comparación de Tukey para el efecto del agua de mar electrolizada en la carga bacteriana (Bacterias Totales). ....	25
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza ANOVA para la máxima producción celular de las microalgas ISO y TISO. ....	29
<b>Tabla 8.</b> Prueba de Tukey para máxima producción celular de ISO y TISO. ....	30
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza ANOVA para la tasa de crecimiento de las microalgas ISO y TISO. ....	32
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Tukey para la tasa de crecimiento de ISO y TISO. ....	33
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de las bacterias probióticas <i>Vibrio</i> C33 y <i>Pseudomona</i> 11 a las 00 hrs. ....	35
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Tukey para la viabilidad de las bacterias probióticas <i>Vibrio</i> C33 y <i>Pseudomona</i> 11 a las 00 hrs. ....	37
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de las bacterias probióticas <i>Vibrio</i> C33 y <i>Pseudomona</i> 11 a las 96 hrs. ....	39
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Tukey para la viabilidad de las bacterias probióticas <i>Vibrio</i> C33 y <i>Pseudomona</i> 11 a las 96 hrs. ....	40

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Recuento de bacterias totales (DTC), bacterias viables (DVC) y bacterias viables cultivables (CFU). .....	23
<b>Fig. 2.</b> Medias de bacterias totales presentes en el agua de mar electrolizada y neutralizada enriquecida con extracto de levadura. ....	26
<b>Fig. 3.</b> Medias de bacterias totales presentes en el agua de mar electrolizada y neutralizada enriquecida con F/2 Fritz en un tiempo inicial 0:0. ....	26
<b>Fig. 4.</b> Curva de crecimiento de las microalgas <i>Isochrysis galbana</i> (Clon ISO) (A) e <i>Isochrysis</i> sp. (Clon TISO) (B). ....	28
<b>Fig. 5.</b> Medias de la máxima producción celular de la microalga ISO cultivada con agua de mar electrolizada. ....	31
<b>Fig. 6.</b> Medias de la máxima producción celular de la microalga TISO cultivada con agua de mar electrolizada. ....	31
<b>Fig. 7.</b> Media de las tasas de crecimiento de la microalga ISO cultivada con agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio. ....	34
<b>Fig. 8.</b> Media de las tasas de crecimiento de la microalga TISO cultivada con agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio. ....	34
<b>Fig. 9.</b> Curva de crecimiento de las bacterias probióticas <i>Vibrio</i> C33 (A) y <i>Pseudomona</i> 11 (B), inoculadas a cultivos de la microalga TISO.....	36
<b>Fig. 10.</b> Medias del probiótico C33 inoculado en cultivos de la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada. ....	38
<b>Fig. 11.</b> Medias del probiótico 11 inoculado en cultivos de la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada. ....	38

<b>Fig. 12.</b> Medias del probiótico <i>Vibrio</i> C33 asociadas a la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada.....	41
<b>Fig. 13.</b> Medias del probiótico <i>Pseudomona</i> 11 asociadas a la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada. ....	41
<b>Fig. 14.</b> Esquema del proceso de electrolización del agua de mar. ....	72
<b>Fig. 15.</b> Sala principal del laboratorio de Ecología Microbiana .....	74
<b>Fig. 16.</b> Sala de microscopía de epifluorescencia. ....	74
<b>Fig. 17.</b> Sistema de filtración de agua de mar. ....	75
<b>Fig. 18.</b> Equipo de electrolización. ....	75
<b>Fig. 19.</b> Cultivo axénico de la microalga <i>Isochrysis</i> sp. ....	76

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de cuatro tratamientos (1, 2, 4 y 8 amperios) de electrolización sobre la carga y actividad bacteriana del agua de mar, así como el efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada sobre el crecimiento de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis* sp. (Clon T-ISO), “in vitro”, y T-ISO en cultivo masivo, asociadas a las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11.

Tanto la carga bacteriana, valorada como el número de bacterias totales (CDT); la actividad bacteriana, valorada en función al conteo directo de células viables (CDV); así como el número de viables cultivables (CFU); disminuyeron significativamente hasta niveles no detectables a partir del tratamiento de 4,0 amperios para los dos primeros casos, y a partir de 1,0 amperio para el siguiente. Luego de 48 hrs de incubación, las muestras enriquecidas con extracto de levadura, y F/2 manifestaron crecimiento bacteriano determinándose los mayores incrementos en los tratamientos menores a 4,0 amperio.

Las tasas de crecimiento de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis* sp. (Clon T-ISO), cultivadas con agua de mar electrolizada, “in vitro”, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto al control, no obstante las mayores densidades celulares se obtuvieron en el control. Así mismo, el agua de mar electrolizada influye significativamente ( $p > 0,05$ ) en la viabilidad de los probióticos, *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11, incorporados a los cultivos “in vitro” de TISO, mostrando menores crecimientos con respecto al control.

## ABSTRACT

The effect of four electrolyzation treatments (1, 2, 4 and 8 amp) was evaluated on the load and bacterial activity of the seawater, as well as the effect of the seawater electrolyzed and neutralized about the growth of the microalgae *Isochrysis galbana* (Clone ISO) and *Isochrysis* sp. (Clone T-ISO), "in vitro", and T-ISO in massive cultivation, associated to the bacteria probiotics *Vibrio* C33 and *Pseudomona* 11.

So much the bacterial load, valued as the number of total bacteria (DTC); the bacterial activity, valued in function to the direct count of viable (DVC); and the number of viable arable (CFU); they diminished significantly until levels non detectible starting from the treatment of 4,0 amperes for the first two cases, and starting from 1,0 amperes for the following one. After 48 incubation hrs, the samples enriched with yeast extract, and F/2 manifested bacterial growth being determined the biggest increments in the smallest treatments to 4,0 amperes.

The rates of growth of the microalgae *Isochrysis galbana* (Clone ISO) and *Isochrysis* sp. (Clone T-ISO), cultivated with seawater electrolyzed, "in vitro", they didn't show significant differences ( $p > 0,05$ ) with regard to the control, nevertheless the biggest cellular densities were obtained in the control. Likewise, the seawater electrolyzed influences significantly ( $p > 0,05$ ) in the viability of the probiotics, *Vibrio* C33 and *Pseudomona* 11, incorporate to the cultivations "in vitro" of TISO, showing smaller growths with regard to the control.

## INTRODUCCION

Ante el crecimiento de la acuicultura, se han desarrollado métodos y sistemas para la producción de semilla de buena calidad (Borowitzka, 1986; Borowitzka & Borowitzka, 1988), integrado en una actividad científico - tecnológica denominada "hatchery". El desarrollo de dicha actividad que continúa expandiéndose a nivel mundial, depende principalmente de la disponibilidad de agua de buena calidad (Bullock *et al.*, 1997), entendiéndose por ésta, como aquella agua en que las características físicas, químicas y microbiológicas estén dentro de los límites permitidos para la especie en cultivo.

Aunque diferentes métodos de desinfección, como el uso de la filtración, radiación ultravioleta, ozono, cloro y antibióticos, son usados en hatcheries con el propósito de un control microbiológico del agua de cultivo, éstos ven limitada su eficiencia debido principalmente a los grandes volúmenes de agua requeridos para los cultivos, así como a los costos de operación. La poca efectividad de los tratamientos de desinfección de agua empleados en hatcheries agravan el problema, al estimular la selección y desarrollo de bacterias patógenas oportunistas en tanques de cultivo (Skjermo *et al.*, 1999); encontrándose entre las principales especies a *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. parahemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, y *A. salmonicida*.

Aún cuando los tratamientos de desinfección del agua de cultivo no son del todo eficientes, diversos investigadores han señalado una alternativa para controlar la composición de la flora bacteriana, la cual resulta en la adición de bacterias deseables (probióticas) a los sistemas de cultivo (Skjermo *et al.*, 1999). Los cultivos microalgales han resultado ser una de las vías potenciales para la incorporación de probióticos a los sistemas de cultivo larval, al

comprobarse que cepas probióticas como *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 no producen efectos deletéreos sobre el crecimiento de las microalgas *Isochrysis* sp. (Clon ISO) y (Clon TISO) (Avendaño, 1997; Silva & Meza, 1999). En este contexto Riquelme *et al.* (1997) señala la importancia de las cepas probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11, al mostrar éstas efectos inhibitorios sobre *V. anguillarum* (VAR), sin tener efectos deletéreos sobre larvas de *Argopecten purpuratus*.

No obstante lo mencionado, en cultivos microalgales masivos los probióticos se verían obligadas a competir con aquellas bacterias que superan los procesos previos de desinfección del agua de cultivo, comprometiendo de esta manera la viabilidad de los probióticos, la eficiencia de la ruta de incorporación de éstos hacia los cultivos larvales y por ende el control microbiológico de los cultivos. Por tal motivo se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de desinfección que permitan evitar y/o controlar la proliferación de bacterias no deseables en cultivos microalgales.

Un método desinfectante, basado en la generación de cloro libre, hipoclorito de sodio y/o ácido hipocloroso mediante tratamientos electrolíticos de soluciones acuosas de NaCl, estudiado durante décadas en los Estados Unidos, Japón y Rusia, ha sido definido como un promisorio mecanismo para la destrucción de microorganismos (Jorquera *et al.*, 2001). Estudios sobre el efecto de tratamientos electrolíticos en sistemas acuícolas han descrito la reducción de sobre un 99% de microalgas, bacterias y virus (Tsuzuki *et al.* 1999; Yoshimizu *et al.*, 1999).

Ante lo expuesto, surge el siguiente problema de investigación:

**PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Cuál será el efecto de tratamientos electrolíticos (1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp.) en la actividad y carga bacteriana del agua de mar, así como en el crecimiento de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis sp.* (Clon TISO) asociadas con las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11?

**HIPOTESIS:**

Al someter el agua de mar a cuatro tratamientos electrolíticos (1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp.) se verán afectadas tanto la carga bacteriana (células totales), así como las bacterias activas (células metabólicamente activas) presentes en el agua de mar, obteniéndose reducciones significativas a partir del tercer tratamiento, lo cual permitirá tener un mayor control microbiológico del agua de mar, electrolizada y neutralizada, empleada para el cultivo de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis sp* (Clon TISO) asociadas con las bacterias probióticas C33 y 11 sin afectar negativamente el crecimiento de las microalgas, así como la viabilidad de las bacterias probióticas C33 y 11 incorporados a los cultivos.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General:**

- Generar información para el uso de tratamientos electrolíticos del agua de mar, orientada al control microbiológico del agua de mar y su posterior aprovechamiento en cultivos microalgales.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar el efecto de cuatro tratamientos electrolíticos del agua de mar, en la actividad y carga bacteriana del agua de mar empleada para el cultivo de microalgas.
- Determinar el efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en la tasa de crecimiento y máxima producción celular de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis sp.* (Clon T-ISO).
- Determinar el efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada sobre la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 incorporadas en cultivos de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) e *Isochrysis sp.* (Clon TISO) cultivadas con agua de mar electrolizada.

## MARCO TEORICO

### **Control microbiológico en Acuicultura:**

En acuicultura, diversas son las estrategias adoptadas por los cultivadores para minimizar el efecto originado por la proliferación de agentes patógenos en el agua de cultivo. Tratamientos basados en el uso de la filtración, radiación ultravioleta, ozono, cloro y antibióticos, entre otros, han sido los más empleados; no obstante los resultados no han sido los más satisfactorios.

La filtración, técnica empleada para la retención de partículas contenidas en el agua de mar, no asegura la retención de todas las bacterias; debido a que la gama de partículas implicadas en este proceso es bastante extensa. Algunas de las células microbianas más grandes superan las 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero en el otro extremo de la escala de tamaños están ciertas bacterias con un diámetro menor de 0,3  $\mu\text{m}$  (Brock, 1998); encontrándose como tamaño frecuente, en la distribución del bacterioplancton de estuarios y aguas costeras, células con una longitud proporcional inferior a 1  $\mu\text{m}$  en diámetro (Douillet & Pickering, 1999). Así, estudios bacteriológicos del efecto de filtración en hatchery, revelaron que el número de bacterias no es alterado y cierto tiempo después estos son más numerosos luego de la filtración a 1  $\mu\text{m}$  que en agua de mar no filtrada (Prierur & Carval, 1979 *in* Douillet & Pickering, 1999).

Así mismo, en acuicultura se emplean tubos de luz ultravioleta alrededor de los cuales se hace circular una película de agua no mayor a 2 cm, con el objeto de asegurar la exposición de toda el agua a los rayos de luz UV, los cuales resultan ser mortales para todos los microorganismos expuestos a ellos durante un período breve de tiempo. Sin

embargo, la turbidez del agua y el crecimiento de algas y bacterias en la cubierta de las lámparas UV limitan severamente la eficiencia de estas (Bullock *et al.*, 1997). Así mismo, Sobsey (1989), señala que una variedad de factores, como la adhesión o la incrustación bacteriana en partículas, pueden proveerles protección contra desinfectantes químicos y agentes no químicos influyendo en la eficiencia de la inactivación bacteriana durante la desinfección del agua.

El uso del ozono ha resultado ser exitoso como desinfectante para sistemas acuícolas de agua dulce. Así, en pruebas realizadas con bacterias patógenas de peces, éstas mostraron un 99% de inactivación a concentraciones de 0,111 mg.l<sup>-1</sup> de oxidantes residuales totales (TROs) para *Enterococcus seriolicida*, 0,063 mg.l<sup>-1</sup> para *Pasteurella piscicida* y 0,064 mg.l<sup>-1</sup> para *V. anguillarum*, por lo que recientemente la ozonización de agua de mar para el cultivo de peces marinos y de acuario ha recibido una considerable atención. Sin embargo, la desinfección con ozono resulta muy costoso debido a: (1) los altos niveles de ozono requeridos para superar la demanda orgánica y de sustancias residuales, los cuales deben ser suficientes para llevar a cabo una reducción significativa de bacterias y virus; y (2) la necesidad de eliminar cualquier residuo sobrante de ozono del agua antes de retornar a los tanques de cultivo (Bullock *et al.*, 1997), debido a su elevada toxicidad.

En un intento para controlar la proliferación bacteriana, aportada principalmente por el alimento, se han usado antibióticos como medida profiláctica convirtiéndose en una estrategia frecuente usada en los cultivos intensivos de larvas marinas. Sin embargo, muchas bacterias han desarrollado fácilmente resistencia frente a los antibióticos, extendiéndose esta resistencia a los ambientes naturales originándose un mayor problema

(Skjermo & Vadstein, 1999). Actualmente los tratamientos químicos usados para el control de epizootias, no son aprobados por la *US Food and Drug Administration* (Bullock *et al.*, 1997), y en Chile está actualmente prohibido el uso del cloranfenicol (Avendaño, 1997). Esto último orienta las investigaciones a la búsqueda de tratamientos alternativos de desinfección del agua de cultivo antes de su uso, los cuales sean más eficientes ante los volúmenes de producción requeridos, permitiendo de esta manera tener un mayor control del ingreso y proliferación de patógenos a los sistemas de cultivo.

Aún cuando los tratamientos de desinfección del agua de cultivo no son del todo eficientes, se suma a estos una alternativa para regular la composición de la flora bacteriana, la cual resulta en la selección de bacterias deseables (maduración microbiológica del agua) o la adición de bacterias deseables (probióticas) a los sistemas de cultivo. Estas últimas son definidas por Fuller (1989 *in* Silva *et al.*, 1999), como aquellos microorganismos que dados como alimento suplementario pueden beneficiar al huésped, mejorando el balance de su microflora intestinal. Esto último se fundamenta en la habilidad que poseen algunas bacterias, componentes de la microflora indígena, de inhibir la colonización y proliferación de bacterias oportunistas y bacterias patógenas obligadas; lo cual permite tener en éstos un importante mecanismo de defensa, particularmente antes que el sistema inmune, de organismos en cultivo, esté plenamente desarrollado (Vanbelle *et al.*, 1990 *in* Skjermo & Vadstein, 1999).

Dentro del espectro de bacterias productoras de sustancias con actividad antimicrobiana han sido reportadas las cepas pertenecientes a los géneros *Alteromonas* (Gauthier & Flateau, 1976; Lodeiros *et al.*, 1988; Barja *et al.*, 1989; Oclarit, 1994; Riquelme *et al.*, 1996), *Vibrio* (Lodeiros *et al.*, 1988; Olssen *et al.*, 1992; Rojas, 1992;

Tamaru *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1997), *Chromobacterium* (Fabregas *et al.*, 1991; Oclarit *et al.*, 1994), *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Alcaligenes*, *Photobacterium*, *Acenitobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella* y los grupos *Corynebacterium-Artrobacter* (Lodeiros *et al.*, 1988; Fabregas *et al.*, 1991).

### ***Isochrysis galbana*:**

Entre la mayor variedad de cultivos de fitoplancton usados en maricultura se encuentran un número de cepas identificadas como pertenecientes al género *Isochrysis* (Parke, 1949); las cuales han sido reportadas como *I. galbana* (Parke, 1949; Green & Pienaar, 1977), *I. maritima* (Billard & Gayral, 1972), reportada esta última como *Chrysotila lamellosa* por Green & Parke (1975), *I. litoralis* (Billard & Gayral, 1972), *Isochrysis* sp. PS11 (Renaud *et al.*, 1995) e *Isochrysis* sp. NT14 (Renaud *et al.*, 1999).

El género *Isochrysis*, clasificado taxonómicamente como clase Prymnesiophyceae (Hibberd, 1976), incluye pequeñas algas (ca. 5-7µm) con dos flagelos iguales, pigmentación chrysophyceae, y sin pared celular. El predominio de una forma palmeloide en las etapas de vida de *I. litoralis* ha originado que esta especie no haya recibido mucha atención para la investigación en maricultura, por lo que el aprovechamiento de estas han sido enfocadas con mayor frecuencia sobre los cultivos suspendidos de microalgas, entre las que destaca la especie *Isochrysis galbana* con sus variedades CCMP1323 e *Isochrysis* sp CCMP1324.

*I. galbana* ha sido la primera especie históricamente usada como alimento vivo en la maricultura de moluscos (Bruce *et al.*, 1940) siendo citada con mayor frecuencia desde entonces. El pequeño tamaño y la carencia de pared celular hacen fácilmente ingeribles y

digeribles a estas células por pequeñas larvas de invertebrados marinos (Walne, 1964; Ukeles, 1975; Babinchak y Ukeles, 1979), siendo empleadas en acuicultura como alimento para animales marinos, en particular estadios larvales y juveniles de moluscos, crustáceos y peces (Molina *et al.*, 1994), debido principalmente a su importancia nutritiva al ser ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), 20:5 (n - 3) y 22:6 (n - 3) los cuales han demostrado ser esenciales para una variedad de moluscos, crustáceos y larvas de peces, así como para otros animales marinos (Brown *et al.*, 1997).

Cuando las cepas CCMP1323 y CCMP1324 del género *Isochrysis* (tabla 1 y 2), han sido comparadas directamente, éstas han demostrado diferencias en características tales como tolerancia a temperatura (Ewart and Pruder, 1981), composición de ácidos grasos, proteínas, carbohidratos (Brown *et al.*, 1989; Brown, 1991; Molina *et al.*, 1992), y valor nutricional para invertebrados marinos (Brown *et al.*, 1989; Okauchi, 1990). Así mismo, investigaciones hechas por Patterson *et al.* (1994) muestran sustanciales diferencias cualitativas en la composición de lípidos – específicamente de esteroides y largas cadenas de alkenones entre *I. galbana* (Clon ISO) y *Isochrysis* sp. (Clon T-ISO). “T-ISO” carece del ácido graso esencial 20:5n-3, mientras que ISO posee tanto el ácido esencial 20:5n-3 y el 22:6n-3 (Brown *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1992).

**Tabla 01.-** Ficha técnica de las microalgas marinas *Isochrysis galbana* cepas CCMP1324 y CCMP1323

Número de cepa	CCMP1324	CCMP1323
Espécies	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Isochrysis galbana</i>
Name authority		Parke
Clase	Prymnesiophyceae	Prymnesiophyceae
Identificada por		Parke,M
Colectada por	Martin,J	
Fecha de colección		
Año de colección		1938
Sitio de colección	Society Islands,Tahiti	Mar.Biol.Sta., Port Erin, Isle of Man,UK
Oceano	Sur Pacífico	Nor Atlantico
Mar		Mar Irish
Nearest continent	Micronesia	Europa
Otra información		saltwater fish pond
Medio de cultivo	f/2-si,AlgaGro	f/2-si,AlgaGro
Temperatura mínima	11 °C	3 °C
Temperature máxima	36 °C	28 °C
Longitud de célula	4 - 8 µm	4 - 6 µm
Ancho de célula	0 - 0 µm	2 - 4 µm
Cepas sinónimas	TISO,NEPCC601	ISO,Cepa"1",NEPCC2
Nombre sinónimos		
Axénico (si/no)	Si	Si
Toxico (solo si)		
Criopreservada (solo si)		Si

**FUENTE: Provasoli-Guillar National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP).**

**Tabla 02.-** Aspectos nutricionales de las microalgas del género *Isochrysis* sp.

Especies	Código de cepa	Calidad nutricional			
		20:4 (n - 6)	20:5 (n - 3)	22:6 (n - 3)	Otros
<i>Isochrysis galbana</i>	CCMP1323	n.d.	n.d.	n.d.	
<i>Isochrysis</i> sp.	CCMP1324	-	-	+++	

**Fuente: Brown et al., 1997. (n.d.: No determinado).**

## PROBIÓTICOS.

El concepto de probiótico fue definido por primera vez por Parker (1974), refiriéndose a ellos como “los organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal”. Fuller (1989) lo define como: “aquel microorganismo vivo que suplementado al alimento afecta benéficamente al hospedador mejorando su balance microbiano intestinal”. En 1992, O’Sullivan *et al.*, reconceptualizan la definición como “aquel monocultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos los cuales aplicados al hombre o a animales (como células secas o como productos fermentados), afecten benéficamente al hospedador por un mejoramiento del equilibrio en la microflora indígena”. Gatesoupe (1999), define el concepto de probióticos como “aquellas células que administradas de tal manera que al ingresar al tracto gastrointestinal se mantengan con vida, con el propósito de mejorar salud”. Gram *et al.* (1999), amplía la definición a “aquel microorganismo vivo que suplementado afecta benéficamente al hospedador por un mejoramiento en el balance microbiano”.

Actualmente, la utilización de bacterias benéficas en la producción de animales terrestres ha sido extensamente estudiada (Conway 1989). Sin embargo, en ambientes marinos sólo recientemente se ha comenzado a considerar el uso de bacterias en vez de quimioterapéuticos en el cultivo de peces (Westerdhal *et al.*, 1991, Bergh 1995, Gatesoupe 1997), crustáceos (Nogami & Maeda 1992) y de moluscos bivalvos (Ruiz *et al.*, 1995, Riquelme *et al.*, 1996a, Riquelme *et al.* 1997). Así, Douillet & Langdon (1993), evaluando el efecto de bacterias marinas sobre larvas de *Crassostrea gigas*, observaron que la adición de un tipo de bacteria (CA2) en los cultivos larvales proporcionó una mayor sobrevivencia y crecimiento con respecto a los cultivos control, en donde las larvas fueron alimentadas solamente con microalgas. En este caso, los autores sugieren que el crecimiento larval puede

ser originado por aspectos nutricionales bacterianos, en función de los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados encontrados en las bacterias inoculadas. Segueineau *et al.* (1993 in Moal *et al.*, 1996), señala que la presencia de bacterias en cultivos larvales puede ser positiva, al constatar que un tipo bacteriano U1, aislado de tanques de larvicultura de *Pecten maximus*, producía ácido pantoténico, una vitamina deficitaria en la dieta microalgal de bivalvos.

Rico-Mora *et al.* (1998), reporta que una bacteria SK-05, aislada de cultivos de *Skeletonema costatum*, tiene acción efectiva al eliminar otras bacterias por exclusión competitiva, al consumir los productos orgánicos excretados por la microalga, inmovilizando el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*, una bacteria patógena para larvas de moluscos y crustáceos, la cual precisa de altas concentraciones de sustrato orgánico para su crecimiento. Lodeiros *et al.* (1991), señalan que el 21% de cepas aisladas de monocultivos microalgales se caracterizan por producir sustancias antibacterianas.

En Chile, el primer probiótico reportado como tal, fue *Alteromonas haloplanktis*, aislado desde gónadas de reproductores de *Argopecten purpuratus* (Riquelme *et al.*, 1996a). Dicha bacteria demostró actividad inhibitoria sobre agentes patógenos como *Vibrio ordalli*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*. En general, la adición de un antagonista bacteriano podría implicar el desplazamiento de bacterias patógenas por la producción de componentes inhibitorios, por relaciones competitivas de espacio, y por una mejor utilización del sustrato (Araya *et al.*, 1999). El mismo autor señala que dichos factores podrían actuar en forma separada o bien interrelacionadas, dando como resultado la colonización del agente probiótico en el tracto digestivo del huésped en forma dominante.

### **Probióticos *Vibrio* sp. C33 y *Pseudomonas* sp. 11:**

El primer reporte de las cepas C33 y 11, como potenciales probióticos, fue hecha por Riquelme *et al.* (1997), las cuales pertenecieron a un conjunto de 11 cepas, con propiedades inhibitorias sobre el patógeno *V. anguillarum*, de un total de 506 cepas aisladas desde un hatchery de ostiones en la III Región de Chile.

Los primeros reportes sobre la identificación genérica de las cepas probióticas C33 y 11 las ubicaban como pertenecientes al género *Vibrio* (Riquelme *et al.*, 1997). Estudios posteriores de identificación (Riquelme *et al.*, 2000a), basados en la secuenciación del 16S rRNA, determinaron que la cepa C33 pertenece al género *Vibrio*, mientras que la cepa 11 está ubicada dentro del género *Pseudomonas*. A lo expuesto, Riquelme *et al.* (2000b) señala que miembros de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido periódicamente recomendados para ser empleados como potenciales probióticos en cultivos de peces, moluscos y crustáceos.

Desde su descubrimiento, ambas cepas han sido motivo de estudio con el objeto de evaluar su potencial aprovechamiento en hatcheries de *Argopecten purpuratus*. Así, Riquelme *et al.* (1997), señalaron la importancia de ambas cepas al determinar el efecto inhibitorio de la cepa C33 sobre el patógeno *V. anguillarum*, así como el efecto protector que brindaba la cepa 11 a larvas de *A. purpuratus* al ser expuestas a dicho patógeno. Así mismo, estudios posteriores, basados en la purificación de los compuestos con actividad antibacteriana producidas por la cepa C33, revelaron que dicha cepa ejercía actividad bacteriostática sobre diversos grupos de microorganismos, relacionados mayormente con vibrios, y que la estructura química de uno de los compuestos con mayor actividad bacteriostática, era similar a un éter-hidroxil aromático (Jorquera *et al.*, 1999).

Posteriormente Avendaño & Riquelme (1999), comprobaron el efecto inocuo de las cepas C33 y 11 sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana*, sosteniendo la posibilidad de incorporar bacterias en cultivos axénicos de microalgas para ser usados como vectores en la introducción de bacterias antagonistas de patógenos en cultivos de especies acuáticas. En este contexto, Riquelme *et al.* (2000), en estudios orientados a evaluar la incorporación selectiva de probióticos por larvas de *A. purpuratus*, determinaron que un período de 6 hrs, eran necesarias para incorporar significativamente la cepa 11 a la microflora de la larva, lo cual no pudo ser apreciado para la cepa C33.

**Tabla 03.-** Características bioquímicas y resistencia a drogas de las cepas C33 y 11.

<b>Características</b>	<b>11</b>	<b>C33</b>
Teñido Gram	-	-
Motilidad	+	+
Oxidasa	+	+
Utilización de citrato	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-
Producción de Indol	-	-
Producción de acetona (VP)	-	+
Beta-galactosidasa (ONPG)	-	-
Arginina dihidrolasa (ADH)	-	+
Lisina decarboxilasa (LDC)	-	-
Ornitina decarboxilasa (ODC)	-	-
Ureasa (URE)	-	-
Triptofano desaminasa (TDA)	-	-
Gelatinasa (GEL)	-	+
Crecimiento en TCBS	+	+

<i>Producción de ácido desde:</i>		
Glucosa	-	+
Manitol	-	+
Inositol	-	-
Rhamnosa	-	-
Sucrosa	-	+
Melobiosa	-	-
Amigdalín	-	-
Arabinosa	-	-
<i>Crecimiento a:</i>		
15°C	+	+
25°C	+	+
42°C	+	+
<i>Crecimiento en:</i>		
0% NaCl	-	-
3% NaCl	+	+
6.5% NaCl	+	+
8% NaCl	+	-
10% NaCl	-	-
<i>Sensibilidad/resistencia a:</i>		
Novomicina	S	S
0/129	S	S
Tetraciclina	S	S
Ampicilina	R	R
Estreptomina	R	S
Ácido oxolónico	R	R
Cloranfenicol	R	S

**Fuente: Riquelme et al. (2000)**

## ELECTROLIZACIÓN.-

La electrólisis viene a ser el proceso por el cual se produce el cambio químico de una sustancia en una celda electrolítica, en la cual una corriente eléctrica dirige la reacción que de otro modo sería no espontánea. Muchas sustancias importantes, incluso el aluminio y el cloro, se producen comercialmente por electrólisis de sales fundidas; donde, las semirreacciones posibles por lo general se limitan a aquellas en las que participan los iones de la sal. Sin embargo, cuando se somete a electrólisis una solución acuosa de un compuesto iónico, se debe considerar la posibilidad de que el agua participe en uno o ambos electrodos.

Cuando se realiza la electrólisis de una solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl), las especies con posibilidad de participar en las semirreacciones son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , obteniéndose especies cloradas como ácido hipocloroso e iones hipoclorito.

El tratamiento electrolítico de soluciones acuosas de NaCl ha sido estudiado durante décadas en países como Estados Unidos, Rusia y Japón. Dicho tratamiento ha sido promovido como un potencial tratamiento de desinfección, al obtenerse como resultado del proceso cloro libre, hipoclorito de sodio y/o ácido hipocloroso. Este tratamiento ha sido definido como un promisorio mecanismo para la destrucción de microorganismos en ambientes médico-dentales e industrial alimentaria (Nikulin, 1977; Wilk *et al.*, 1987; Iwasawa and Nakamura, 1996; Tanaka *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). De igual forma, se ha señalado que la desinfección de agua por tratamientos electrolíticos puede ser beneficioso para el cultivo de peces, incrementando la sobrevivencia y el número de peces que pueden ser confinados en los estanques, además de reducir los costos por antibióticos y el mantenimiento de equipos de bombeo (Anonymous, 2000). Otros estudios han descrito

la reducción de sobre un 99% de microalgas, bacterias y virus en agua, a través del uso de procesos de electrolización (Tsuzuki *et al.*, 1999; Yoshimizu *et al.*, 1999).

El principio de electrólisis de una solución acuosa de NaCl, para la producción de cloro a nivel industrial (Brock, 1998), ha sido tomado en cuenta por algunos investigadores como una técnica de desinfección de aguas residuales a ser empleada en acuicultura. Dicho concepto desarrollado en Japón se fundamenta en que durante la electrólisis del agua de mar, el cloruro de sodio disuelto en el agua es dissociado en iones cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) e iones hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ) cargados negativamente, así como iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) e iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) cargados positivamente, siendo los primeros adsorbidos por el ánodo donde se forman ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e iones hipoclorito; pudiendo dos radicales combinarse para producir el gas cloro. Finalmente, en la sección del cátodo, cada ión sodio cargado positivamente reacciona con un ión hipoclorito para convertirse en hipoclorito de sodio, el cual es cuantificado como cloro libre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Ubicación de la experiencia:

La presente experiencia se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Antofagasta – Chile.

### 2. Electrolización y neutralización del agua de mar:

Para dicho proceso se empleó un electrolizador de agua de mar modelo JIX-40TA (Hoshizaki Electric Company Ltd.) el cual fue suministrado con agua de mar filtrada a 1  $\mu\text{m}$  a un flujo constante de 4  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tratamientos correspondieron a valores de 0,0 (Control), 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amperios, determinándose parámetros como salinidad (‰), mediante el uso de un refractómetro ATAGO; pH, mediante el uso de un pHmetro ORION modelo 410A; Oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mediante el uso de un oxímetro digital HANNA Instruments modelo HI 9142, así como las concentraciones de hipoclorito de sodio medidos como cloro libre ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mediante el uso de un clorímetro digital HANNA Instruments modelo HI 93734. Los Tratamientos fueron neutralizados con tiosulfato de sodio, en razón de 5 moles de  $\text{Na}_2\text{SO}_2\text{O}_3$  por cada 8 moles de  $\text{NaOCl}$ .

### 3. Efecto del proceso de electrolización en la actividad y carga bacteriana del agua de mar:

Para este fin, se tomaron 3 muestras por cada tratamiento de agua de mar electrolizada (1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amperios) y no electrolizada (control), en botellas Schott estériles de 100 ml. Las concentraciones de cloro libre ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), determinadas en los tratamientos de electrolización fueron neutralizadas según el ítem anterior. Para

todos los casos, las muestras de agua de mar tratadas fueron enriquecidas con extracto de levadura y el medio de cultivo comercial para microalgas Fritz F/2 + metasilicato de sodio (Algae Food Fritz Aquaculture, Dallas), e incubadas por 96 horas a 20°C. Alícuotas de 100 µl fueron sembradas en medio tryptone soya agar suplementado con 2%NaCl (Oxoid Co., TSA) e incubadas a 20°C por un periodo de 96 horas, determinándose así el total de bacterias heterótrofas cultivables por recuentos de unidades formadoras de colonias (colony-forming units, CFU).

El recuentos directo de bacterias totales (direct total-cell counting, DTC) y recuento directo de bacterias viables (direct viable-cell counting, DVC), fueron realizados mediante la modificación de la tinción 6 CFDA-DAPI descrita por Yamaguchi *et al.* (1997). Para esto, muestras de 0.8 ml de agua de mar tratadas fueron mezcladas con 0.4 ml de buffer 6 CFDA (0.3 M phosphate buffer pH 8.5; 1,5 mM EDTA). Posteriormente, solución stock de 6 CFDA (6-carboxy fluorescein diacetate) (Sigma Co.; 10 mg ml<sup>-1</sup> in acetona) y DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma Co.; 10 µg ml<sup>-1</sup>) fueron aplicadas sobre las muestras a una concentración final de 150 µg ml<sup>-1</sup> y 1 µg ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego las células fueron atrapadas por filtración sobre filtros negros de policarbonato (Poretics Products Co.; 0.2 µm). Los filtros fueron dispuestos sobre portaobjetos y observados bajo excitación U.V. para la tinción DAPI y excitación BLUE para la tinción 6 CFDA, utilizando un microscopio Olympus BH-2.

#### 4. Efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en el crecimiento de *I. galbana*.

##### (Clon ISO):

Con la finalidad de determinar el efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en el crecimiento de las microalgas *I. galbana* (Clon ISO y Clon TISO) se evaluó el desarrollo de éstas en medios de cultivo preparados con agua de mar electrolizada a 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amperios, previamente neutralizada según item 1. Las muestras de agua de mar tratadas fueron esterilizadas por microfiltración a 0,2 µm en filtros nucleopore, enriquecidas mediante la adición del medio de cultivo comercial estéril Fritz f/2 (Algae Food Fritz Aquaculture, Dallas), y distribuidas (100 ml) en matraces estériles de 250 ml (Duran-Schott Co.). Estos fueron contrastados con un cultivo control, el cual fue preparado con agua de mar microfiltrada a 0,45 µm y esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos. Cada tratamiento y el control contaron con cuatro réplicas.

Los cultivos se desarrollaron por un lapso de 360 horas (15 días) en una sala temperada a 20 °C con una intensidad luminosa de 500 lux y un fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad (12:12). El crecimiento poblacional fue evaluado cada 48 horas mediante el recuento directo de células en una cámara Neubauer y el uso de un microscopio Olympus BH-2 con magnificación de 100 veces. La tasa de crecimiento, expresada como velocidad media de duplicaciones por día, fue determinado mediante la ecuación propuesta por Guillard (Stein, 1979):

$$K = [3,322 / (t_2 - t_1)] * (\log N_2 / N_1)$$

Donde:

$K$  = Velocidad media de duplicación poblacional de la microalga (duplicaciones /día)

$t_1$  = Unidad de tiempo inicial.

$t_2$  = Unidad de tiempo final.

$N_1$  = Número de células por ml en el tiempo inicial.

$N_2$  = Número de células por ml en el tiempo final.

Para descartar alguna participación bacteriana en la experiencia, cada 48 horas se determinó el número de células viables cultivables según la metodología propuesta en el ítem 2.2.

##### **5. Efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11, asociadas a cultivos de *Isochrysis galbana* (Clon ISO):**

Para este fin, se instalaron cultivos microalgales según la metodología descrita en el ítem anterior. A dichos tratamientos fueron incorporados las cepas probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11, desde cultivos bacterianos instalados 24 horas antes. El tamaño de inóculo fue de  $5 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup> para ambas cepas, las cuales fueron determinadas mediante recuento de Breed. La viabilidad de cada cepa fue determinada cada 48 horas, mediante el desarrollo de unidades formadoras de colonias en medio Tryptone Soya Agar suplementado con 2%NaCl (Oxoid Co., TSA). Cada tratamiento y el control contaron con tres réplicas.

## **6. Análisis estadístico:**

Con la finalidad de evaluar las hipótesis nulas y alternativas del presente trabajo de investigación, se realizó el análisis de varianza ANOVA para cada experiencia. Así mismo, se realizaron pruebas de comparación múltiple de Tukey, para determinar si existe diferencias entre los tratamientos empleados en la presente investigación. Dichas pruebas estadísticas fueron realizadas mediante el uso del Software estadístico Statgraphic plus versión 2.1.

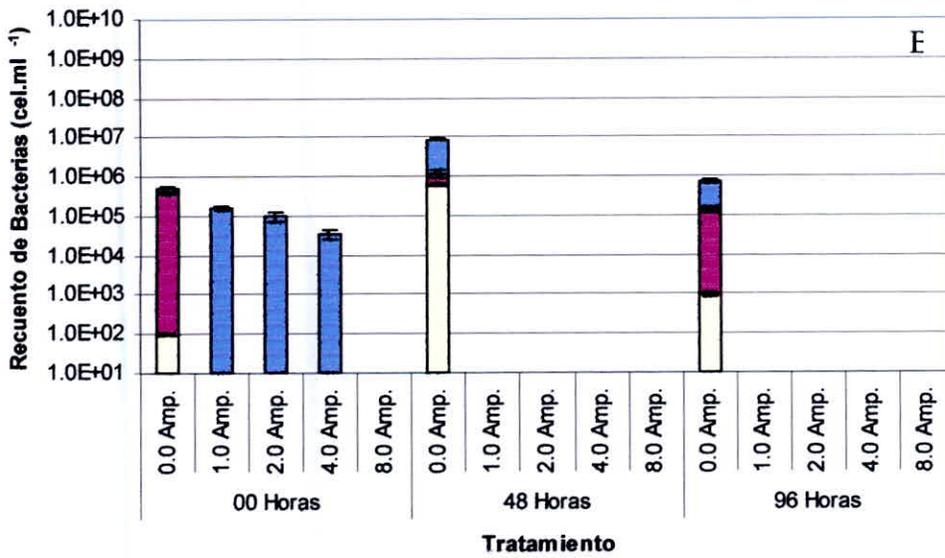
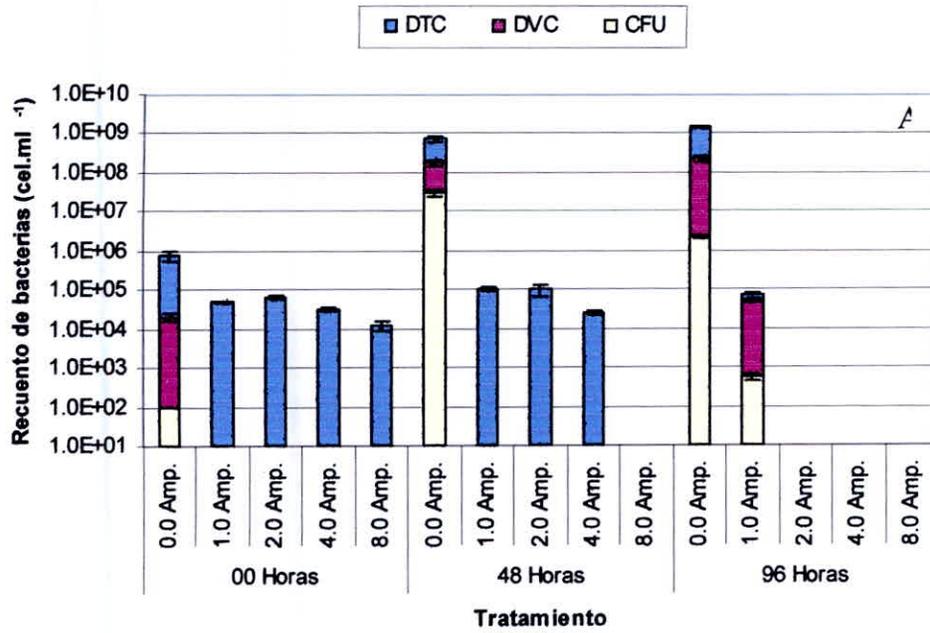
## RESULTADOS

### **Electrolización y neutralización del agua de mar:**

De los parámetros físico-químicos evaluados al agua de mar electrolizada, las variaciones relacionadas a la presencia de cloro libre, oxígeno disuelto y potencial de óxido-reducción (ORP) fueron las más representativas, encontrándose estas entre valores de 0,003 - 38,55 mg.l<sup>-1</sup>; 8,17 - 14,80 mg.l<sup>-1</sup>; 378,3 - 675,9 mV, respectivamente (Tabla 4).

### **Efecto de la electrólisis en la actividad y carga bacteriana del agua de mar:**

La figura 01, muestra claramente que la actividad y carga bacteriana del agua de mar se ven afectados por los tratamientos de electrolización. A diferencia del tratamiento con 0.0 Amp., las bacterias totales (DTC) del agua de mar muestran una disminución estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) al ser tratados con 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp., no detectándose bacterias en el tratamiento de 8.0 amp. de las muestras enriquecidas con Fritz (fig. 1B). De igual manera, los valores de bacterias viables (DVC) y viables cultivables (CFU), en los tratamientos de electrolización, reflejan una reducción hasta niveles no detectables. Luego de 48 y 96 horas de incubación, las muestras tratadas con 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp., enriquecidas con Fritz f/2 (Algae Food Fritz Aquaculture, Dallas), mostraron niveles no detectables de bacterias totales (DTC), viables (DVC) y viables cultivables (CFU); (fig. 1B). No obstante, cuando las muestras son enriquecidas con extracto de levadura, las electrolizadas a 0,0 amp. y 1,0 amp, experimentan un incremento significativo en la actividad y carga bacteriana (fig. 1A).



**Fig. 1.-** Recuento de bacterias totales (DTC), bacterias viables (DVC) y bacterias viables cultivables (CFU) en agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio; a las 00, 48 y 96 horas de incubación en medios enriquecidos con extracto de levadura (A) y F/2 Fritz (B).

**Tabla 04.-** Características físico-químicas del agua de mar electrolizada (ESW: Electrolyzed Sea Water).

TRATAMIENTO	VOLTAJE	AMPERAJE	CLORO LIBRE	OXIGENO DISUELTO	SALINIDAD	pH	ORP	TEMPERATURA
SW 0,0 A (CT)	0,00	0,00	0,03	8,17	35,0	8,29	378,3	19°
ESW 1,0 A	2,00	1,00	2,68	9,13	36,5	8,04	474,9	19°
ESW 2,0 A	2,10	2,00	7,65	9,63	36,5	8,24	640,2	19°
ESW 4,0 A	2,20	4,00	18,66	11,53	35,5	8,35	683,5	19°
ESW 8,0 A	2,40	8,00	38,55	14,80	34,0	8,63	675,9	19°

**Tabla 05** Análisis de varianza ANOVA para Bacterias totales.

ANOVA para medio enriquecido con Extracto de levadura					
F. de valor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
Tratamiento	4	3,06256E12	7,65641E11	209,37	0,0000
Error Exper.	20	7,1367E10	3,65684E9		
Total (Corr.)	24	3,1357E12			

ANOVA para medio enriquecido con F/2 Fritz					
F. de valor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
Tratamiento	4	8,51884E11	2,12971E11	90,76	0,0000
Error Exper.	20	4,69294E10	2,34647E9		
Total (Corr.)	24	8,98814E11			

Valor Tabular  $\{T-1:T(r-1)\} = 2,87$

El análisis de varianza realizado para el efecto del agua de mar electrolizada sobre la carga bacteriana (Bacterias Totales DTC) en un tiempo cero, para ambas experiencias (tabla 5); demuestra que existe una diferencia significativa entre los tratamientos de 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp.; debido a que el  $F_o > F_t$  con un nivel de significancia del 0,95%. Así mismo, el análisis de las medias de bacterias totales (Fig. 2 y 3), mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey (Tabla 6), muestra que las medias de los tratamientos de 1,0 a 8,0 amp. son estadísticamente diferentes al tratamiento de 0,0 amp. para ambas experiencias.

**Tabla 06.-** Prueba de Comparación de Tukey para el efecto del agua de mar electrolizada en la carga bacteriana (Bacterias Totales).

Tukey para medio enriquecido con Extracto de levadura			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogeneos
8,0 Amp.	5	12343,8	X
4,0 Amp.	5	32093,8	X
1,0 Amp.	5	49375,0	X
2,0 Amp.	5	64187,5	X
0,0 Amp. (CT)	5	913437,0	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		-14812,5	114480,0
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		17281,3	114480,0
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		37031,3	114480,0
1,0 Amp. – Control		*-864062,0	114480,0
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		32093,8	114480,0
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		51843,8	114480,0
2,0 Amp. – Control		*-849250,0	114480,0
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		19750,0	114480,0
4,0 Amp. - Control		*-881344,0	114480,0
8,0 Amp. - Control		*-901094,0	114480,0
Tukey para medio enriquecido con F/2 Fritz			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogeneos
8,0 Amp.	5	0,0	X
4,0 Amp.	5	34562,5	XX
2,0 Amp.	5	96281,3	XX
1,0 Amp.	5	155531,0	X
0,0 Amp. (CT)	5	513500,0	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2.0 Amp.		59250,0	91703,5
1,0 Amp. – 4.0 Amp.		*120969,0	91703,5
1,0 Amp. – 8.0 Amp.		*155131,0	91703,5
1,0 Amp. – Control		*-357969,0	91703,5
2,0 Amp. – 4.0 Amp.		61718,8	91703,5
2,0 Amp. – 8.0 Amp.		*96281,3	91703,5
2,0 Amp. – Control		*-417219,0	91703,5
4,0 Amp. – 8.0 Amp.		34562,5	91703,5
4,0 Amp. - Control		*-478938,0	91703,5
8,0 Amp. - Control		*-513500,0	91703,5

\* denota diferencia estadísticamente significativa.

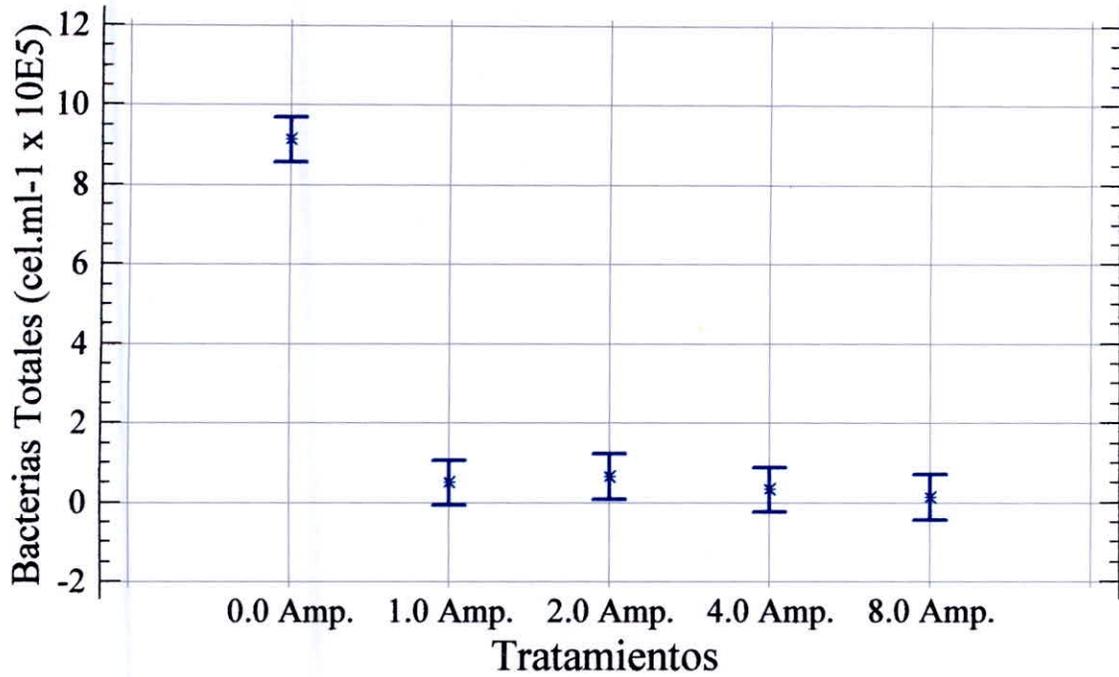


Fig. 2.- Medias de bacterias totales presentes en el agua de mar electrolizada y neutralizada enriquecida con extracto de levadura en un tiempo inicial 0:0.

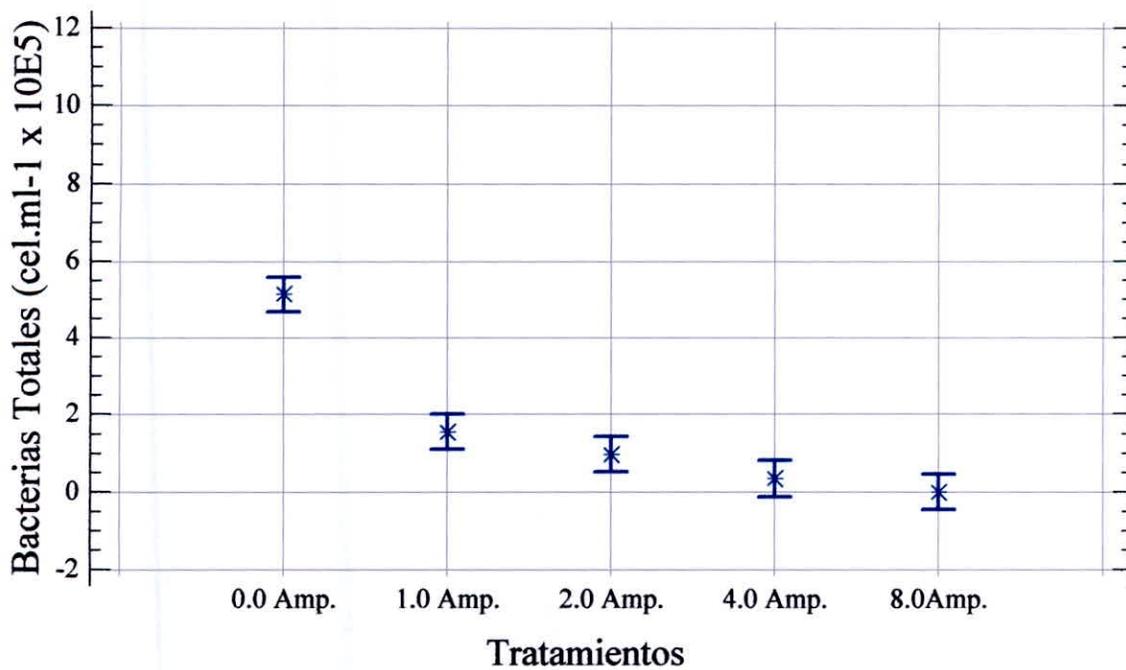
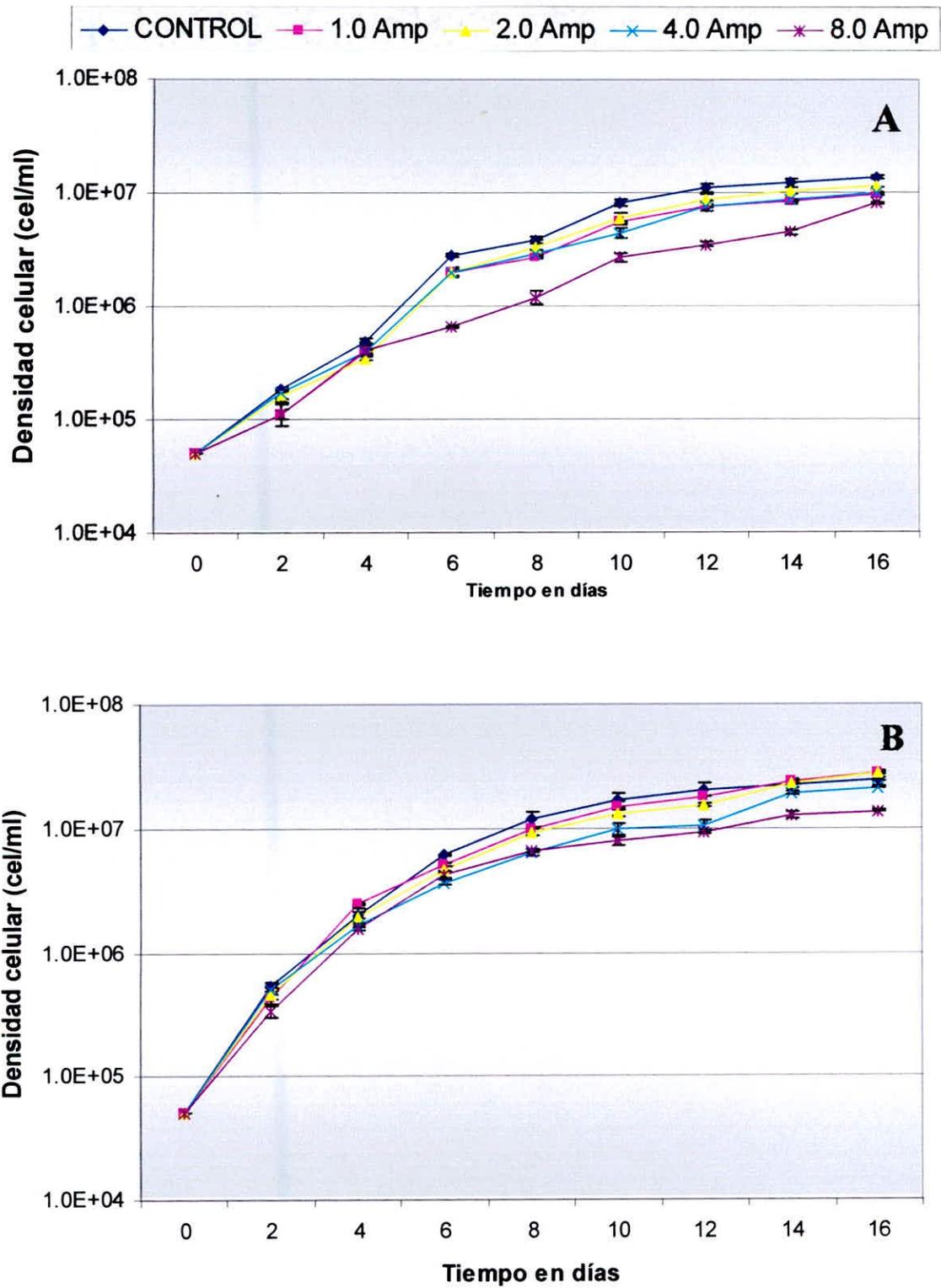


Fig. 3.- Medias de bacterias totales presentes en el agua de mar electrolizada y neutralizada enriquecida con F/2 Fritz en un tiempo inicial 0:0.

**Efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en el crecimiento de *I. galbana*.  
(Clon ISO) e *Isochrysis sp* (Clon TISO):**

La figura 04, muestra la curva de crecimiento de las microalgas ISO (A) y TISO (B). El análisis de varianza ANOVA (Tabla 07), para la máxima producción celular de ambas variedades mostró diferencia significativas ( $p > 0,05$ ) de los cuatro tratamientos electrolíticos (1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 amp.) con respecto al control; encontrándose para la variedad ISO un máximo de  $1,35065E7$  cel.ml<sup>-1</sup> para el control y un máximo de  $1,15125E7$  cel.ml<sup>-1</sup> para el tratamiento de 2,0 amp. Contrario a esto, la variedad TISO presentó una mayor producción de células en los tratamientos de 1,0 y 2,0 amp ( $2,75725E7$  y  $2,78625E7$  cel.ml<sup>-1</sup>) con respecto al control ( $2,4410E7$  cel.ml<sup>-1</sup>). Así mismo, el análisis de medias de la máxima producción celular de ambas variedades de microalgas (Fig. 5 y 6) mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey (Tabla 08), muestra una diferencia estadísticamente significativa al 95% entre el tratamiento de 8,0 amp. con respecto al control para la variedad ISO, y diferencias no significativas entre los tratamientos de 1,0 y 2,0 amp. al 95% de nivel de confianza para la variedad TISO.



**Fig. 04.-** Curva de crecimiento de las microalgas *Isochrysis galbana* (Clon ISO) (A) e *Isochrysis* sp. (Clon TISO) (B), cultivadas en agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.

**Tabla 07.-** Análisis de varianza ANOVA para la máxima producción celular de las microalgas ISO y TISO

ANOVA para máxima producción celular de ISO					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	6,7284E13	4	1,6821E13	5,26	0,0075
	4,80103E13	15	3,20069E12		
Total (Corr.)	1,15294E14	19			
ANOVA para máxima producción celular de TISO					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	5,47298E14	4	1,36824E14	97,55	0,0000
	2,10394E13	15	1,40263E12		
Total (Corr.)	5,68337E14	19			

Valor Tabular  $\{T-1:T(r-1)\} = 3,06$

**Tabla 08.-** Prueba de Tukey para máxima producción celular de las microalgas *Isochrysis galbana* variedades ISO y TISO.

Tukey para máxima producción celular de ISO			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
8,0 Amp.	4	8,0325E6	X
4,0 Amp.	4	9,74063E6	XX
1,0 Amp.	4	1,01408E7	XX
2,0 Amp.	4	1,15125E7	XX
Control	4	1,35065E7	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1,0 Amp. – 2.0 Amp.		- 1,77188E6	3,92025E6
1,0 Amp. – 4.0 Amp.		- 400125,0	3,92025E6
1,0 Amp. – 8.0 Amp.		1,70813E6	3,92025E6
1,0 Amp. – Control		- 3,76588E6	3,92025E6
2,0 Amp. – 4.0 Amp.		1,37175E6	3,92025E6
2,0 Amp. – 8.0 Amp.		3,48E6	3,92025E6
2,0 Amp. – Control		- 1,994E6	3,92025E6
4,0 Amp. – 8.0 Amp.		2,10825E6	3,92025E6
4,0 Amp. Control		3,36575E6	3,92025E6
8,0 Amp. Control		* - 5,474E6	3,92025E6

Tukey para máxima producción celular de TISO			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
8,0 Amp.	4	1,36475E7	X
4,0 Amp.	4	2,132E7	X
Control	4	2,441E7	X
1,0 Amp.	4	2,75725E7	X
2,0 Amp.	4	2,78625E7	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		- 290000,0	2,59515E6
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		* 6,2525E6	2,59515E6
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 1,3925E7	2,59515E6
1,0 Amp. – Control		* 3,1625E6	2,59515E6
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		* 6,5425E6	2,59515E6
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 1,4215E7	2,59515E6
2,0 Amp. – Control		* 3,4525E6	2,59515E6
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 7,6725E6	2,59515E6
4,0 Amp. Control		* - 3,09E6	2,59515E6
8,0 Amp. Control		* - 1,07625E7	2,59515E6

\* denota diferencia estadísticamente significativa.

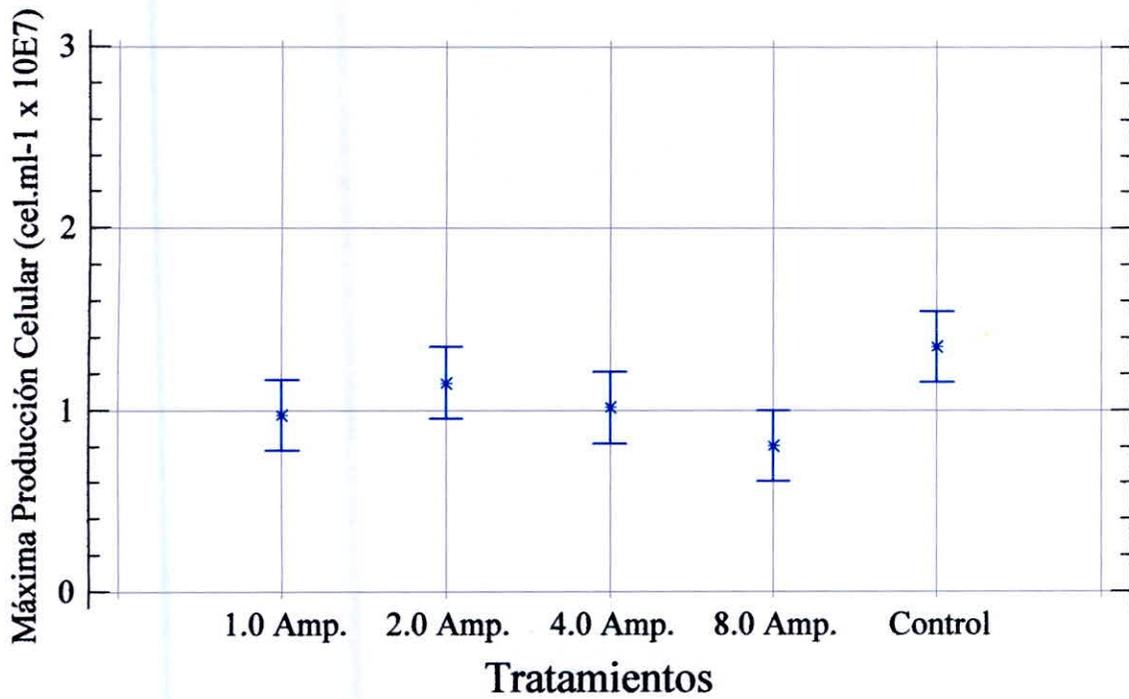


Fig. 5.- Medias de la máxima producción celular de la microalga ISO cultivada con agua de mar electrolizada.

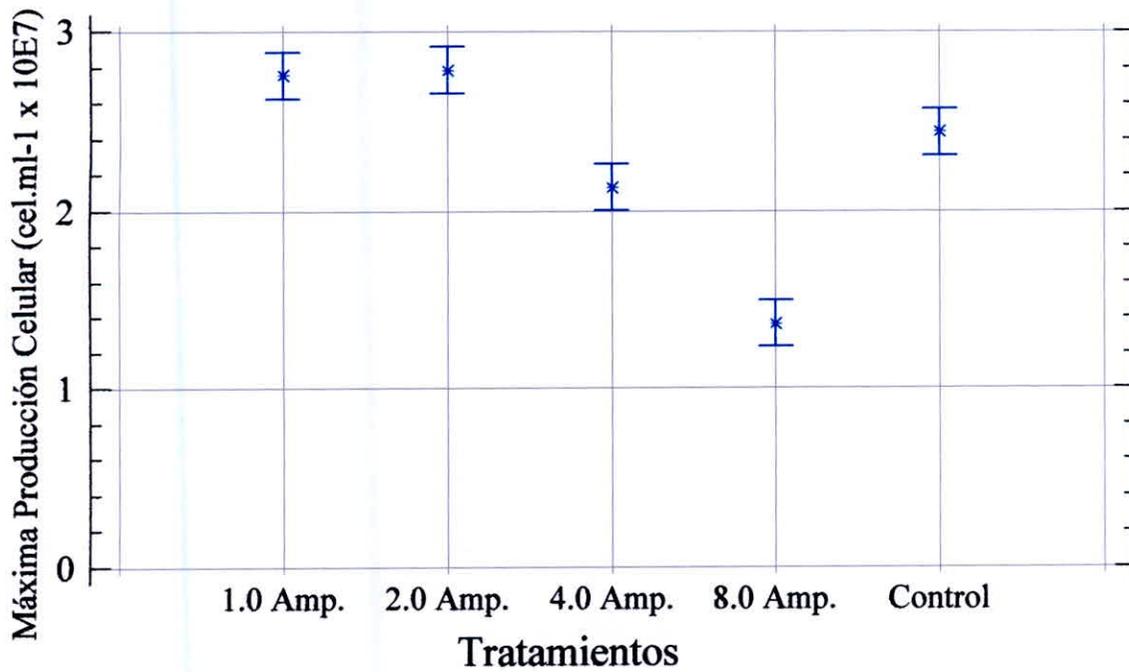


Fig. 6.- Medias de la máxima producción celular de la microalga TISO cultivada con agua de mar electrolizada.

**Tabla 9.-** Análisis de varianza ANOVA para la tasa de crecimiento de las microalgas ISO y TISO

ANOVA para la tasa de crecimiento de las microalgas ISO					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	0,05523	4	0,0138075	21,08	0,0000
	0,009825	15	0,000655		
Total (Corr.)	0,065055	19			
ANOVA para la tasa de crecimiento de las microalgas TISO					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	0,03233	4	0,0080825	7,75	0,0014
	0,01565	15	0,00104333		
Total (Corr.)	0,04798	19			

Valor Tabular  $\{T-1:T(r-1)\} = 3,06$

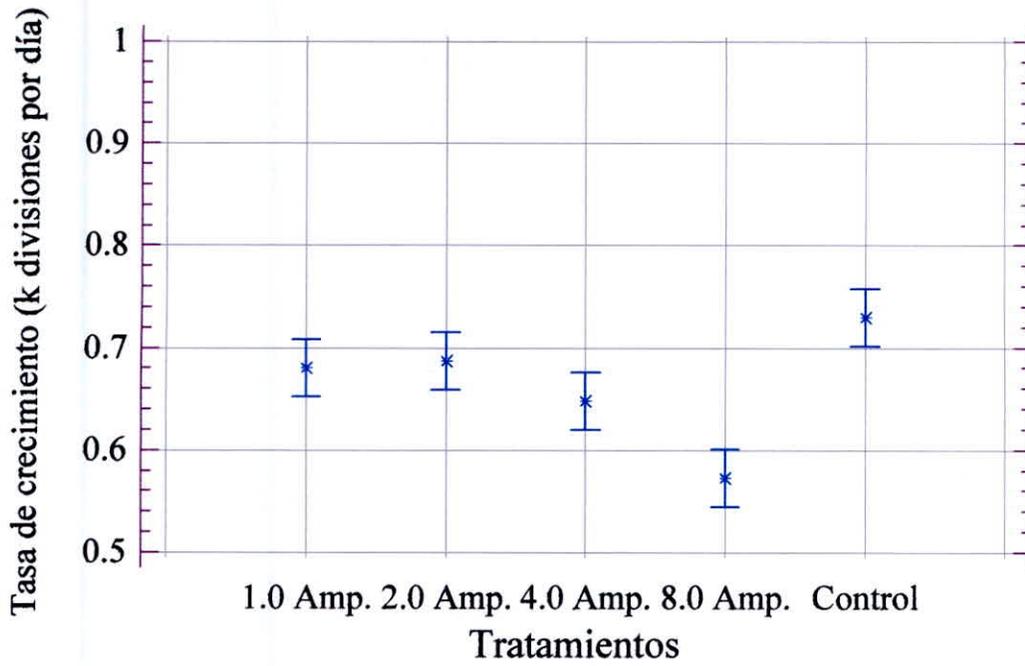
Con respecto a la tasa de crecimiento, los análisis de varianza (Tabla 9) muestran que existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los grupos de un tratamiento a otro para ISO y TISO, a un 95% de nivel de confianza. Así mismo, el análisis de medias de la tasa de crecimiento de ambas variedades de microalgas (Fig. 7 y 8) mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey (Tabla 10), muestra una diferencia estadísticamente significativa al 95% de nivel de confianza, entre los tratamientos de 1,0 – 8,0 amp., 2,0 – 8,0 amp., 4,0 – 8,0 amp., 4,0 amp. – Control y 8,0 amp. – Control, para la variedad ISO; y entre los tratamientos de 1,0 – 8,0 amp., 2,0 – 8,0 amp., 4,0 amp. – Control y 8,0 amp. – Control, para la variedad TISO.

**Tabla 10.-** Prueba de Tukey para la tasa de crecimiento de ISO y TISO.

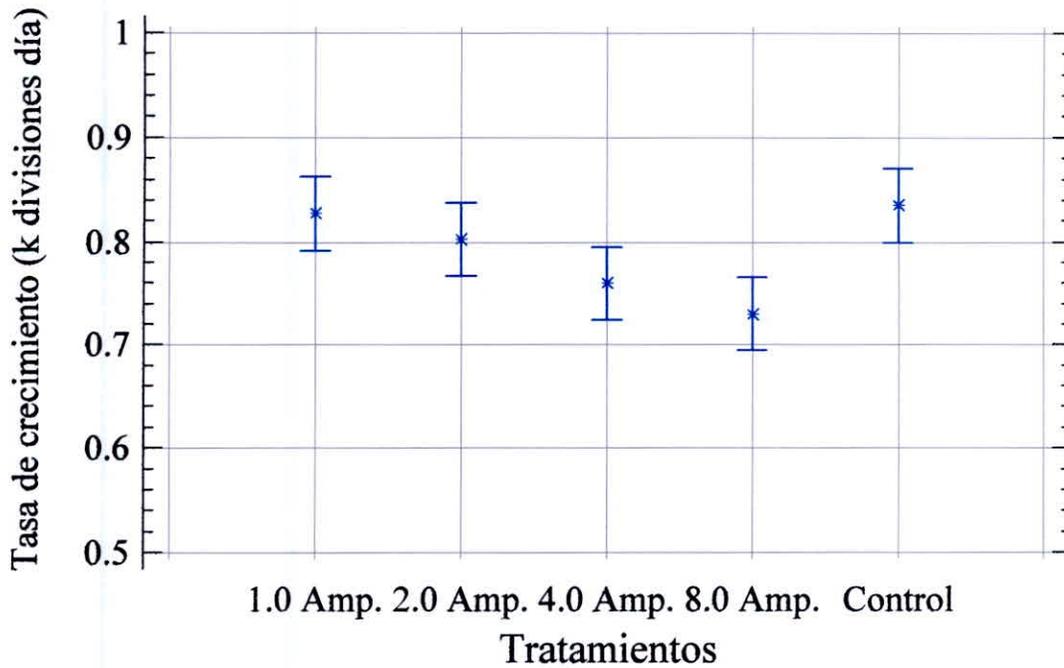
Tukey para la tasa de crecimiento de ISO			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogeneos
8,0 Amp.	4	0,5725	X
4,0 Amp.	4	0,6475	X
1,0 Amp.	4	0,68	XX
2,0 Amp.	4	0,6875	XX
Control	4	0,73	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		- 0,0075	0,0560806
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		0,0325	0,0560806
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 0,1075	0,0560806
1,0 Amp. – Control		- 0,05	0,0560806
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		0,04	0,0560806
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 0,115	0,0560806
2,0 Amp. – Control		- 0,0425	0,0560806
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 0,075	0,0560806
4,0 Amp. Control		* - 0,0825	0,0560806
8,0 Amp. Control		* - 0,1575	0,0560806

Tukey para la tasa de crecimiento de TISO			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogeneos
8,0 Amp.	4	0,73	X
4,0 Amp.	4	0,76	XX
2,0 Amp.	4	0,8025	XX
1,0 Amp.	4	0,8275	XX
Control	4	0,835	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		0,025	0,0707788
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		0,0675	0,0707788
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 0,0975	0,0707788
1,0 Amp. – Control		- 0,0075	0,0707788
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		0,0425	0,0707788
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		* 0,0725	0,0707788
2,0 Amp. – Control		- 0,0325	0,0707788
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		0,03	0,0707788
4,0 Amp. Control		* - 0,075	0,0707788
8,0 Amp. Control		* - 0,105	0,0707788

\* denota diferencia estadísticamente significativa.



**Fig. 7.-** Media de las tasas de crecimiento de la microalga ISO cultivada con agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.



**Fig. 8.-** Media de las tasas de crecimiento de la microalga TISO cultivada con agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.

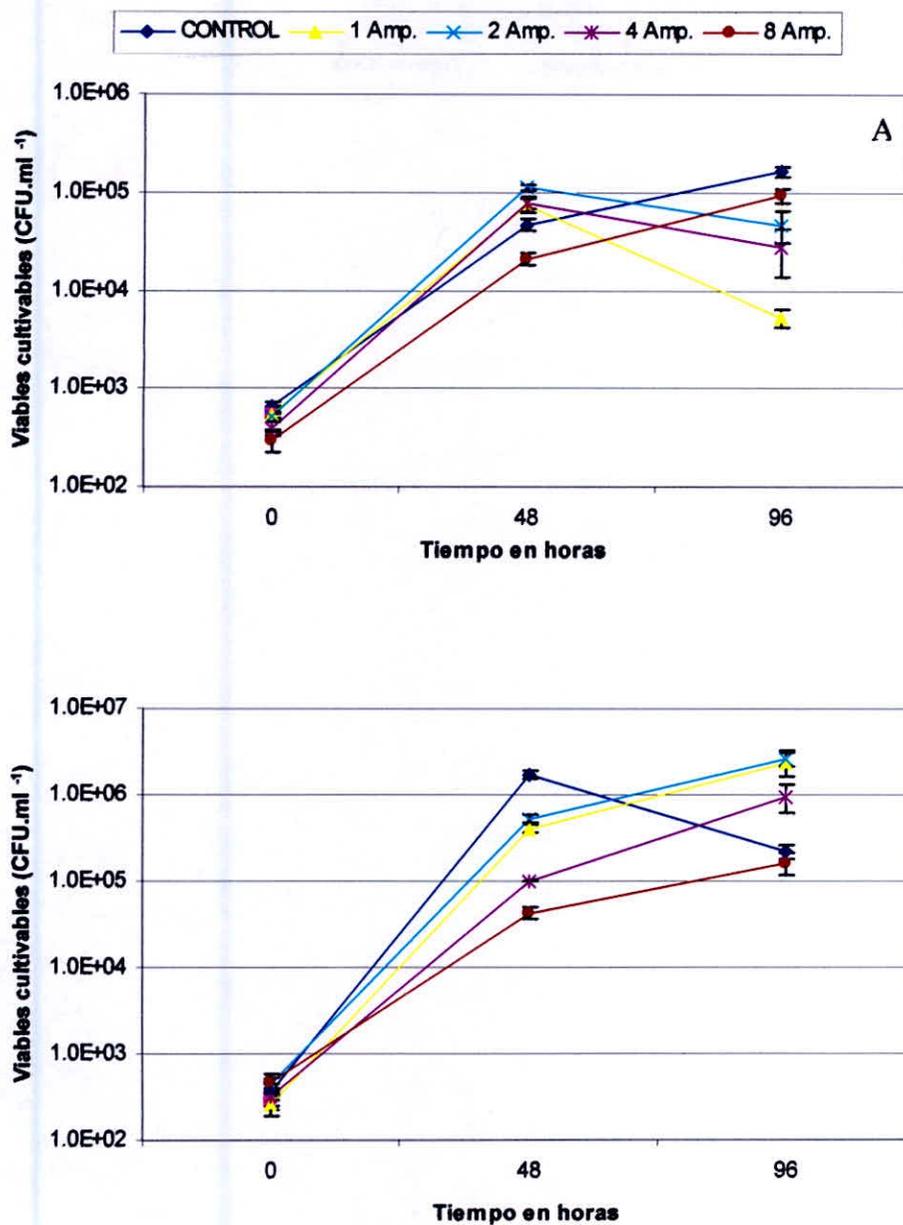
**Efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada en la viabilidad de las bacterias probióticas C33 y 11, asociadas a cultivos de *Isochrysis galbana* (Clon ISO):**

La cuantificación de células viables cultivables de ambas cepas, cultivadas junto a la microalga *Isochrysis galbana* (ISO), indican que éstas son afectadas por el agua de mar electrolizada-neutralizada. Ambas cepas manifestaron un pobre crecimiento en todos los tratamientos electrolíticos ( $< 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>), con respecto al control ( $>10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>) (fig. 09). El análisis de varianza ANOVA (tabla 11), para evaluación de la viabilidad de los probióticos C33 muestran que existen diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre las medias de los grupos de un tratamiento a otro a un 95% de nivel de confianza. Así mismo, el mismo análisis hecho para la cepa 11 demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento con respecto al control, lo cual se ve reflejadas en el gráfico de las medias hechas para cada cepa (Fig. 10 y 11).

**Tabla 11.-** Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 a las 00 Hrs.

ANOVA para el probiotico C33					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	233693,0	4	58423,3	6,16	0,0091
	94800,0	10	9480		
Total (Corr.)	328493,0	14			
ANOVA para el probiotico 11					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	92240	4	23060	0,73	0,5894
	314200	10	31420		
Total (Corr.)	406440	14			

Valor Tabular  $\{T-1:T(r-1)\} = 3,48$



**Fig. 9.-** Curva de crecimiento de las bacterias probióticas *Vibrio C33* (A) y *Pseudomona 11* (B), inoculadas a cultivos de la microalga TISO cultivadas en agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.

**Tabla 12.-** Prueba de Tukey para la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 a las 00 Hrs.

Tukey para la viabilidad de C33			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
8,0 Amp.	3	293,33	X
4,0 Amp.	3	390,0	XX
2,0 Amp.	3	533,33	XX
1,0 Amp.	3	536,667	XX
Control	3	650,0	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		3,333	261,659
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		146,667	261,659
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		243,333	261,659
1,0 Amp. – Control		-113,333	261,659
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		143,333	261,659
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		240,0	261,659
2,0 Amp. – Control		-116,667	261,659
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		96,6667	261,659
4,0 Amp. Control		-260,0	261,659
8,0 Amp. Control		*-356,667	261,659
Tukey para la viabilidad de 11			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
1,0 Amp.	3	260,0	X
4,0 Amp.	3	316,667	X
Control	3	370,0	X
2,0 Amp.	3	436,667	X
8,0 Amp.	3	476,667	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		-176,667	476,359
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		-56,6667	476,359
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		-216,667	476,359
1,0 Amp. – Control		-110,0	476,359
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		120,0	476,359
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		-40,0	476,359
2,0 Amp. – Control		66,6667	476,359
4, Amp. – 8,0 Amp.		-160,0	476,359
4,0 Amp. Control		-53,333	476,359
8,0 Amp. Control		106,667	476,359

\* denota diferencia estadísticamente significativa.

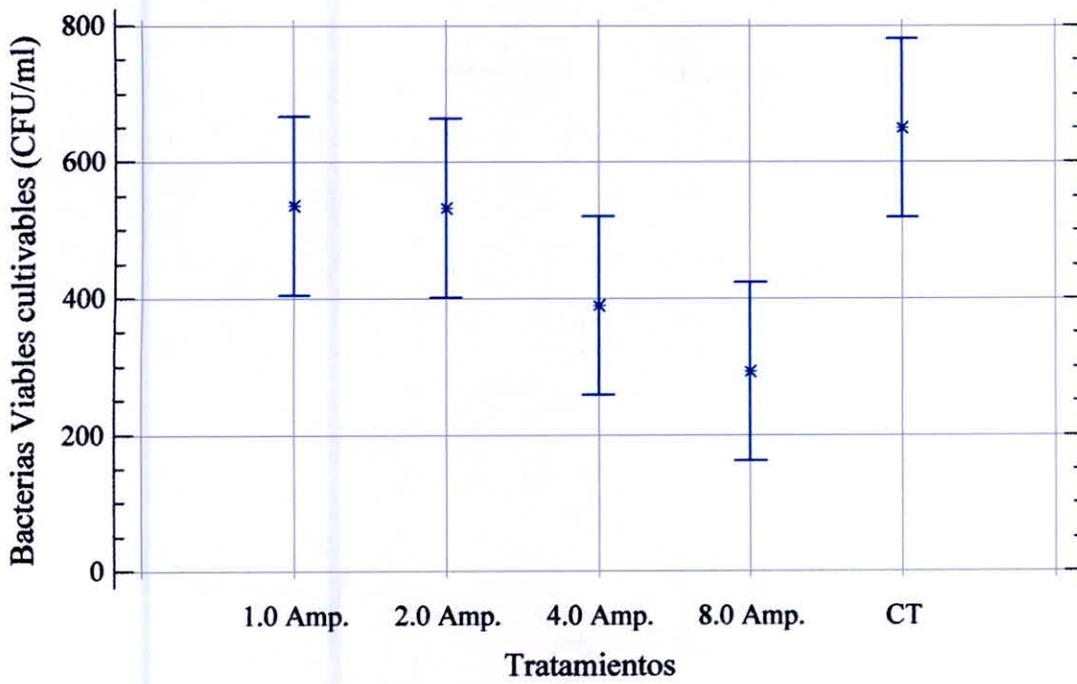


Fig. 10.- Medias del probiótico *Vibrio* sp. cepa C33 inoculado en cultivos de la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.

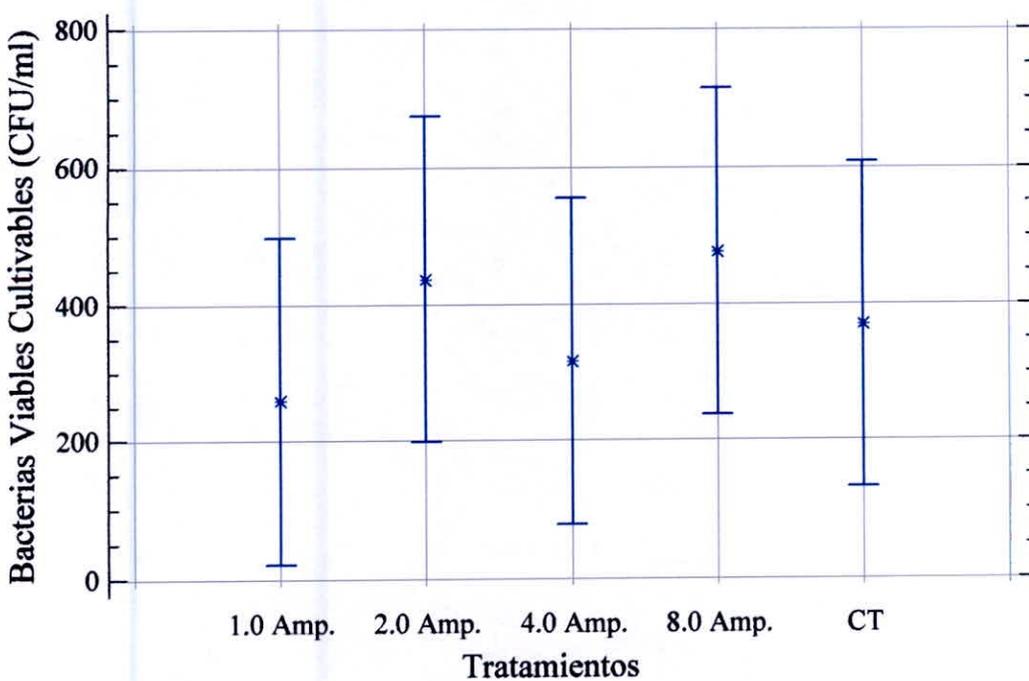


Fig. 11.- Medias del probiótico *Pseudomona* sp. cepa 11 inoculado en cultivos de la microalga TISO cultivada en agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio.

El análisis de medias de la concentración de células viables cultivables para un tiempo inicial (Fig. 10 y 11), mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey (Tabla 12), muestra una diferencia estadísticamente significativa al 95% de nivel de confianza, para el tratamiento de 8 amperios para la cepa C33; no existiendo diferencias significativas en los demás tratamientos para ambas cepas.

Posterior a las 96 horas de cultivo, el ANOVA (tabla 13), refleja diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los grupos de un tratamiento a otro a un 95% de nivel de confianza para el concentración final de ambas cepas. Así mismo,

**Tabla 13.-** Análisis de varianza ANOVA para la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 a las 96 Hrs.

ANOVA para el probiotico C33					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	4,77215E10	4	1,19304E10	11,81	0,0008
	1,01041E10	10	1,01041E9		
Total (Corr.)	5,78257E10	14			
ANOVA para el probiotico 11					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F	Valor de P
	1,115E13	4	2,78749E12	30,70	0,0000
	9,07983E11	10	9,07983E10		
Total (Corr.)	1,2058E13	14			

Valor Tabular  $\{T-1:T(r-1)\} = 3,48$

**Tabla 14.-** Prueba de Tukey para la viabilidad de las bacterias probióticas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 a las 96 Hrs.

C33 96hrs.			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
1,0 Amp.	3	5333,3	X
4,0 Amp.	3	28000,0	XX
2,0 Amp.	3	46666,7	XX
8,0 Amp.	3	94633,3	XX
Control	3	164000,0	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		-41333,3	85424,2
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		-22666,7	85424,2
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		*-89300,0	85424,2
1,0 Amp. – Control		*-158667,0	85424,2
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		18666,7	85424,2
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		-47966,7	85424,2
2,0 Amp. – Control		*-117333,0	85424,2
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		-66633,3	85424,2
4,0 Amp. Control		*-136000,0	85424,2
8,0 Amp. Control		-69366,7	85424,2
B 11 96hrs			
Tratamientos	Conteo	Medias (cel.ml <sup>-1</sup> )	Grupos homogéneos
8,0 Amp.	3	190000,0	X
Control	3	220000,0	X
4,0 Amp.	3	866667,0	XX
1,0 Amp.	3	1,52333E6	X
2,0 Amp.	3	2,475E6	X
Contraste		Diferencia	+/- Limites
1,0 Amp. – 2,0 Amp.		*-951667,0	809785,0
1,0 Amp. – 4,0 Amp.		656667,0	809785,0
1,0 Amp. – 8,0 Amp.		*1,33333E6	809785,0
1,0 Amp. – Control		*1,30333E6	809785,0
2,0 Amp. – 4,0 Amp.		*1,60833E6	809785,0
2,0 Amp. – 8,0 Amp.		*2,285E6	809785,0
2,0 Amp. – Control		*2,255E6	809785,0
4,0 Amp. – 8,0 Amp.		676667,0	809785,0
4,0 Amp. Control		646667,0	809785,0
8,0 Amp. Control		-30000,0	809785,0

\* denota diferencia estadísticamente significativa.

## DISCUSION

La electrolización del agua de mar origina cambios sustanciales en algunas de sus propiedades físico – químicas; como son, el incremento en los valores de oxígeno disuelto, potencial de óxido reducción (ORP) y la generación de hipoclorito de sodio, cuantificado como cloro libre (Tabla 7). Diversos autores han reportado tales alteraciones en soluciones acuosas y/o agua ante procesos de electrolización. Izumi (1999), reportó la generación de 20 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre y un pH de 6,8 luego de someter a electrolización una solución de 2.5 % de NaCl. Tsuzuki *et al.* (1999), reportaron la generación de 10 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre luego de electrolizar a 10 voltios una muestra de agua del lago Kasumigaura. Yoshimizu *et al.* (1999), luego de electrolizar una solución conteniendo 3 % de NaCl a 0.1 amperios, determinaron la presencia de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio; así mismo, al incrementar el amperaje a 2,0 amperios, determinaron la generación de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de hipoclorito. Venkitanarayanan *et al.* (1999), electrolizaron una solución conteniendo 12 % de NaCl a 19,8 amperios, obteniendo valores de pH de 2.63, un ORP de 1155 mV y 83,5 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre. Así mismo, Oomori *et al.* (2000), reportaron una concentración de 50 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre luego de electrolizar una solución de 0,1 % de NaCl a 6V y 10,2 amperios. Morita *et al.* (2000), al electrolizar una solución conteniendo 0.05 % de NaCl obtuvieron valores de ORP de 1053 mV, pH de 2,34 y 4,20 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre.

Dichos cambios observados en el agua electrolizada se fundamenta en que durante la electrólisis de agua de mar, el cloruro de sodio disuelto en el agua es dissociado en iones cloruros (Cl<sup>-</sup>) e iones hidróxidos (OH<sup>-</sup>) cargados negativamente, así como iones de sodio (Na<sup>+</sup>) e iones hidrógeno (H<sup>+</sup>) cargados positivamente, siendo los primeros adsorbidos por el ánodo donde se forman ácido hipocloroso (HOCl) e iones hipoclorito (Venkitanarayanan *et*

*al.*, 1999), pudiendo combinarse dos radicales cloro para producir el gas cloro. Finalmente, en la sección del cátodo, cada ión sodio cargado positivamente reacciona con un ión hipoclorito para convertirse en hipoclorito de sodio (Fig. 14), el cual es cuantificado como cloro libre; confiriéndole de esta manera propiedades oxidantes y biocidas a las soluciones electrolizadas.

La actividad antimicrobiana del agua de mar electrolizada se puede apreciar, para la presente experiencia, en la figura 1. El análisis de comparación múltiple de Tukey para el recuento de bacterias totales (DTC) mostró diferencias significativas (95%) para las medias de los tratamientos de electrolización, con respecto al agua de mar no electrolizada (Fig. 2 y 3), permitiendo de esta manera determinar el efecto bactericida del agua de mar electrolizada. El uso de la tinción 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), permitió visualizar el efecto del agua de mar electrolizada sobre la carga bacteriana. Dicha técnica se basa en la especificidad del colorante ante el DNA, el cual forma un complejo DNA-DAPI, el cual fluoresce de color azul brillante ante un rango de luz de 365 a 390 nm, lo cual permite distinguir a las bacterias de cualquier otro material particulado, los cuales al no ligarse con el DAPI fluorescen de color amarillo débil (PORTER & FEIG, 1980).

Los resultados de bacterias viables (DVC) y bacterias cultivables (CFU) muestran claramente el efecto biocida del agua de mar electrolizada, al no ser detectados en los tratamientos de electrolización, lo cual hace innecesaria el uso de alguna prueba estadística para su interpretación. La evaluación de bacterias totales (DTC), bacterias viables (DVC) y bacterias viables cultivables (CFU) resultaron necesarios para el presente trabajo debido a que el porcentaje de las mismas es variable en la naturaleza; así mismo existe un elevado

porcentaje de células activas que no necesariamente se desarrollan en medios de cultivo artificiales, las cuales podrían desarrollarse al encontrar las condiciones favorables.

Estudios sobre desinfección de agua de mar por electrolización, han registrado mortalidades >99.99% de *V. anguillarum*, *Aeromonas salmonicidas*, agentes etiológicos de vibriosis y furunculosis en peces, con tratamientos 0,1 mg Cl<sup>-1</sup> litros<sup>-1</sup> a 0,1 A, además de reducir >99.99% la actividad de Yellow tail ascite virus (YAV) y hirame rhabdovirus (HIRRV) con tratamientos de 0,58 mg Cl<sup>-1</sup> litros<sup>-1</sup> (Yoshimizu *et al.*, 1998). Igualmente, Kim *et al.* (2000), reporta una reducción de 8,88 log<sub>10</sub> CFU.ml<sup>-1</sup> de *Escherichia coli* O157:H7 luego de 30 segundos de exposición a agua electrolizada conteniendo 10 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre. Venkitanarayanan *et al.* (1999), reportan una reducción mayor o igual de 7 log CFU.ml<sup>-1</sup> para tres patógenos como son *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* al ser expuestas a agua de mar electrolizada conteniendo entre 43 – 82 mg.l<sup>-1</sup> de cloro libre.

Dicho efecto estaría centrado a la participación del cloro libre como agente desinfectante, no descartando la participación de otros agentes como el ácido hipocloroso, elevados valores de ORP, presencia de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, así como un efecto bioeléctrico propuesto por Stewart *et al.* (1999).

Algunos autores han propuesto mecanismos para la inactivación de bacterias y virus por parte del cloro. Tanto el ácido hipocloroso y el ión hipoclorito son poderosos oxidantes, los cuales pueden atacar las paredes celulares y deteriorar la función de la membrana (Beer, 2000). White (1992), señala que el HOCl es el mayor germicida de todas las formas de cloro libre debido a la relativa facilidad con la cual éste puede penetrar la pared celular. Esto es atribuido tanto a su bajo peso molecular y a la neutralidad eléctrica. Así, observaciones sobre

la manera en que el cloro actúa sobre las bacterias determinaron que: 1) las células bacterianas dosificadas con cloro liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio (Venkobachar *et al.*, 1977) y 2) las funciones de la membrana, tales como la respiración y transporte activo, son más afectadas por el cloro (McFeters & Camper, 1979). En este contexto, Keith (2000), señala que la exposición al cloro destruiría la barrera protectora de la célula, con lo que concluirían las funciones vitales de la célula originando la muerte del microorganismo. Una posible secuencia de los casos durante la cloración sería: 1) La interrupción de la barrera de la pared celular mediante reacciones del cloro con sitios proyectados de la superficie de la célula, 2) Descarga de elementos constitutivos celulares vitales de la célula, 3) Terminación de las funciones asociadas con membranas y 4) Terminaciones de las funciones celulares dentro de la célula.

Al igual que el cloro, el potencial de óxido reducción ORP, juega un papel muy importante en la inactivación de microorganismos (Kim *et al.*, 2000). Jay (1996 *in* Venkitanarayanan *et al.*, 1999), manifiesta que el ORP es crítico para el crecimiento de microorganismos y generalmente está asociada a la presencia de oxígeno molecular disuelto, apreciado en la presente experiencia, el cual es muy oxidante. Una posible explicación para el elevado ORP del agua electrolizada estaría en la liberación de oxígeno por la ruptura de las uniones débiles e inestables de los radicales hidroxilo y cloro. El mismo autor señala que un ORP de 200 a 800 mV es apropiado para el crecimiento de microorganismos aerobios, por el contrario un rango de -200 a -400 mV es favorable para el crecimiento de microorganismos anaerobios.

En relación a los radicales libres, Brock (1998), señala que estas son moléculas altamente reactivas que atacan los enlaces de proteínas de los tejidos, el DNA en los núcleos de las células y los importantes ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas de las células. Una vez que comienzan a actuar se activa una reacción en cadena que acaba por destruir totalmente la célula.

Una de las técnicas empleadas en la presente investigación para evaluar la actividad de células viables fue el uso de la tinción 6-CFDA, la cual permitió determinar el daño ejercido por el agua de mar electrolizada sobre la membrana celular de las bacterias, al no presentar actividad fisiológica alguna ante dicha tinción. Esta técnica se fundamenta en el uso del colorante 6-carboxy fluorescein diacetate (6 CFDA), el cual es un ester fluorogénico que al penetrar rápidamente en la membrana celular, es hidrolizada por estereasas no específicas resultando en la liberación de fluoresceína, la cual fluoresce en un verde brillante al ser irradiado con luz azul (Yamaguchi *et al.*, 1999).

La contaminación bacteriana generalmente es la causa más común de problemas o defectos en los cultivos algales, por lo que los niveles de bacterias en éstos, deben ser mantenidos bajo control ya que pueden disminuir el crecimiento del alga y causar una caída del cultivo, antes de alcanzar las densidades deseadas (Uribe, 1997).

La disminución de la microflora del agua de mar hasta niveles no detectables permite tener en el nuevo tratamiento de electrolización un método de desinfección eficaz para el tratamiento de aguas de cultivo. La neutralización del cloro libre, presente en el agua de mar electrolizada, con tiosulfato de sodio nos ha permitido realizar cultivos de microalgas asociadas a bacterias probióticas. No obstante la neutralización del cloro, tanto la máxima

producción celular así como la tasa de crecimiento de las microalgas ISO y TISO se ven afectadas en función al grado de tratamiento.

Las experiencias de cultivo de la microalga *Isochrysis galbana* con agua de mar electrolizada y neutralizada con tiosulfato de sodio demuestran que es factible su empleo para dicho fin. Aunque los resultados reflejan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la densidad poblacional de los tratamientos, siendo estos menores que el control (fig. 4A), las tasas de crecimiento no experimentaron mayores diferencias. El bajo crecimiento de las microalgas en los tratamientos estaría relacionado a la producción de otras especies de agentes oxidantes los cuales no son valorados por el análisis de cloro libre. En este contexto, Stewart *et al.* (1999), señala que la adición de tiosulfato de sodio, un agente capaz de neutralizar rápidamente especies reactivas de oxígeno y cloro, no neutraliza el efecto bioeléctrico de una solución electrolizada.

Así también, productos derivados de la reacción del cloro en el medio acuoso como son la formación de ácido hipocloroso (HOCl) e iones clorato estarían participando en la baja respuesta de crecimiento de los cultivos algales. Estos agentes oxidantes podrían actuar por dos rutas: la primera correspondería a la reacción con las sustancias nutritivas adicionadas al medio de cultivo, y la segunda sería por la acción de estos oxidantes sobre las microalgas. Beer (2000), señala que el cloro acuoso, en cualquiera de sus formas como HOCl o OCl-, pueden participar en tres reacciones químicas básicas con compuestos orgánicos como son: oxidación, adición y sustitución. Stauber (1998), señala que las algas son más sensibles para los cloratos que invertebrados y peces. La misma autora determinó que el clorato es tóxico para las microalgas *Nitzschia closterium* y *Dunalliella tertiolecta*, disminuyendo la asimilación de nitrato debido a la inhibición de la nitrato reductasa.

Aún cuando las densidades obtenidas en los cultivos algales con agua de mar electrolizada se mantienen por debajo de los controles, éstos mantienen su crecimiento, así mismo presentarían una gran ventaja en cultivos masivos en relación a la calidad microbiológica con respecto al tratamiento con radiación UV empleado en hatcheries, por lo que se tendría que evaluar la relación Costo-beneficio en la producción de microalgas.

El efecto apreciado sobre la concentración de células viables cultivables (CFU) de las cepas *Vibrio* C33 y *Pseudomona* 11 inmediatamente después de la inoculación, estaría indicando que el mayor efecto del agua de mar electrolizada y neutralizada ocurre durante las primeras horas de iniciado el cultivo. Dicho efecto se aprecia claramente para el tratamiento de 8 amperios luego de evaluar las medias de los tratamientos mediante la prueba de comparación multiple de Tukey. Al igual que las microalgas, un porcentaje de células viables podría ser afectado por los agentes oxidantes que no son valorados ni neutralizados por el tiosulfato de sodio originando así la reducción en la concentración de los inóculos empleados tanto para las microalgas así como para las cepas probióticas empleadas.

No obstante que las concentraciones finales de ambas cepas difieren con las del control, resulta importante la presencia de éstas asociadas a las microalgas durante el proceso de cultivo, ya que así éstas pueden ser incorporadas, junto con el alimento, a los cultivos larvales de invertebrados marinos. Así pues, de experiencias realizadas en paralelo a la presente investigación, se determinó que dichas bacterias probióticas eran desplazadas por aquellas bacterias que sobrevivían a tratamientos de desinfección con radiación UV (datos no reportados), impidiendo así la incorporación indirecta de dichas cepas a los cultivos larvales.

Así mismo, cabe recalcar que a bajos niveles de cloro producidos por los tratamientos de electrolización, éstos mantienen su poder biocida, evitando de esta manera el uso indiscriminado de dicho desinfectante en procesos de sanitización; considerando el riesgo que significa el mal uso de dicho compuesto, así como la formación de trihalometanos, productos formados por la reacción del cloro con la materia orgánica; los cuales han sido clasificados por la U.S. Environmental Protection Agency como posibles carcinógenos humanos (Kim *et al.*, 2000).

Es importante reconocer que el uso del proceso de electrolización como tratamiento alternativo de desinfección corresponde sólo a una parte del tratamiento integral, y que es igualmente importante realizar una buena filtración del agua a ser empleada en los cultivos por la implicancia que tiene este factor en la eficiencia de los tratamientos de desinfección.

De los resultados cabría destacar que el tratamiento de 2 amperios permitiría controlar tanto la carga como actividad bacteriana del agua de mar, permitiéndonos realizar cultivos de las microalgas ISO y TISO al determinarse que no existen diferencias significativas entre las medias de las tasas de crecimiento con respecto al control. Así mismo, dicho tratamiento también permitiría incorporar a las bacterias probióticas *Vibrio C33* y *Pseudomona 11* a los cultivos, obteniéndose así el control microbiológico de los cultivos microalgales.

## CONCLUSIONES

- Los cuatro tratamientos electrolíticos disminuyen significativamente la carga bacteriana (bacterias totales) del agua de mar, reportándose valores no detectables para bacterias viables (DVC) y bacterias viables cultivables (CFU).
- La tasa de crecimiento y máxima producción celular de las microalgas *Isochrysis* sp. (Clon TISO) e *I. galbana* (Clon ISO) se ven afectados significativamente al ser cultivados en agua de mar electrolizada a valores mayores a 4 amperios, aun cuando sea neutralizada con tiosulfato de sodio.
- El agua de mar electrolizada y neutralizada afecta significativamente la viabilidad de la bacteria probiótica *Vibrio* C33 incorporado al cultivo de la microalga TISO, no afectando al probiótico *Pseudomona* 11.
- El agua de mar electrolizada y neutralizada no impide la realización de cultivos microalgales asociados a bacterias probióticas lo cual nos permite tener un control microbiológico en cultivos microalgales.

## RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones orientados a caracterizar e identificar los mayores cambios físico – químicos ocurridos en el agua de mar luego de ser sometidos a procesos de electrolización.
- Realizar investigaciones orientadas a ampliar el uso del agua de mar electrolizada en el cultivo de organismos acuícolas.
- Realizar evaluaciones de cultivos masivos de microalgas marinas utilizando tratamientos de electrolización.
- Realizar evaluaciones de Costo-Beneficio para el uso masivo de tratamientos de electrolización en acuicultura.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANONYMOUS, 2000.** 5 December 2000, revision date. [Online] Aquatechnology website <http://www.aquatechnology.net/electrolyzed.html> (13 December, last date accessed).
- ARAYA, R.; M. JORQUERA & C. RIQUELME. 1999.** Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Rev. Chilena de Hist. Nat.* 72: 261-271.
- ARIMOTO, M.; J. SATO; K. MARUYAMA; G. MIMURA & I. FURUSAWA. 1996.** Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143: 15 – 22.
- AUSTIN, B. 1988.** Marine Microbiology. Ed. Cambridge University Press. 222 p.
- AUSTIN, B., L.F. STUCKEY, P.A.W. ROBERTSON, I. EFFENDI AND D.R.W. GRIFFITH. 1995.** A probiotic strains of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *V. anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of fish diseases.* 18:93-96 p.
- AVENDAÑO, M. 1993.** Donnes sur le biologie de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), mollusca bivalve du Chili. Tesis de Doctorado de la Universidad de Bretaña Occidental. 162 p.

- AVENDAÑO, R. 1997.** Incorporación de Vibrios productores de antibacterianos en cultivos de microalga *Isochrysis sp.* (Clone T-ISO). Tesis para Optar al Título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad de Antofagasta.
- AVENDAÑO, R. & C. RIQUELME. 1999.** Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research*. 30: 1 – 8.
- BABINCHAK, J. & R. UKELES. 1979.** Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. *Mar. Biol.*, 51: 69 – 76.
- BARJA JL, ML LEMOS & A TORANZO. 1989.** Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 33(10): 1674 – 1679.
- BECKER, E. W. 1994.** Microalgae: Biotechnology and microbiology. 1<sup>o</sup> Ed. Published by the Press Syndicate of the University Cambridge. 291 p.
- BEER, C. 2000.** Recreational water disinfection by Copper/silver ions. 5 December 2000, revision date. [Online] <http://www.clearwaterpoolsystems.com/waterdis.htm> (13 December 2000, last date accessed).
- BERGH, O. 1995.** Bacteria associated with early life stage of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of pathogenic *Vibrio sp.* *Journal of Fish Diseases*. 18: 93-96.

- BILLARD, C. & P. GAYRAL. 1972.** Two new species of *Isochrysis* with remarks on the genus *Ruttnera*. Br. Phycol. J. 7: 289 – 297.
- BIRKBECK, T. H. & GALLACHER, S. 1993.** Interaction of pathogenic *Vibrios* with marines bivalves. In: Trends in Microbial Ecology. Guerrero, R. and Pedrós-Elió, C. (Eds.). Spanish Society for Microbiology. 221-226 p.
- BOROWITZKA, M. 1986.** Micro-algae as source fine chemicals. Microbiological Sciences. 3(12):272-375.
- BOROWITZKA, M.A. AND BOROWITZKA, L.J. 1988.** Micro-algal biotechnology. 470 p.
- BOYD, C. & L. MASSAUT. 1999.** Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 20: 113 – 132.
- BROCK, 1998.** Biología de los microorganismos. Prentice hall Iberia, Madrid.
- BROWN, C. & L. PETTI. 1988.** Characterization of nonmotile *Vibrio sp* pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* (74): 195-204.
- BROWN M.R., S.W. JEFFREY & C.D. GARLAND. 1989.** Nutritional aspects of microalgae used in aquaculture; a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205, CSIRO, Canberra, A.C.T., 44pp.

- BROWN M.R., JEFFREY S.W., VOLKMAN J.K., & G.A. DUNSTAN. 1997.**  
Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* (151) 1-4  
pp. 315 -331.
- BRUCE, J.R., M. KNIGHT & M. PARKE. 1940.** The rearing of oyster larvae on an  
algal diet. *J. Mar. Biol. Assoc., UK.* 24: 337 – 374.
- BULLOCK, G. T, SUMMERFELT, A. NOBLE, A, WEBER, M. DURANT & J.  
HANKINS. 1997.** Ozonation of a recirculating rainbow trout culture  
system. I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria.  
*Aquaculture.* 158: 43-55.
- CAMPER, A. K. & G. A. McFETERS. 1979.** *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 633 – 641.
- CONWAY, PL. 1989.** lactobacilli: Fact and fiction. En: R Grubb, T Midvet & E. Norin  
(eds). *The regulatory and protective role of the normal microflora* : 263 –  
281. Macmillan Press Ltd. London, UK.
- DOPAZZO C.P., M.L. LEMOS, C.J. LODEIROS, J. BOLINCHES, J.L. BARJA &  
A.E. TORANZO. 1988.** Inhibitory activity of antibiotic producing marine  
bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology.* 65: 97-  
101.
- DOUILLET, A. & P. PICKERING. 1999.** Seawater treatment for larval of fish  
*Sciaenops ocellatus* Linnaeus (red drum). *Aquaculture* 170: 113-126.

- DOUILLET, P. & CJ, LANGDON. 1993.** Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *Biological Bulletin*. 184: 36-51.
- DOUILLET, P. & CJ, LANGDON. 1994.** Use of a probiotic for the culture of larvae of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25-40.
- ELSTON, R. A. 1984.** Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc. Husbandry. *Journal World Mariculture Society*. 15: 284-300 p.
- EWART J. & G. PRUDER. 1981.** Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff. galbana*, clone T-ISO at temperatures and light intensities. *J. World Maricult. Soc.* 12: 333 – 339.
- FABREGAS J, A. MUÑOS, A OTERO, JL BARJA & M ROMARIS. 1991.** A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57(7): 1377 – 1382.
- FIDALGO, J. P.; A. CID, E. TORRES, A. SUKENIK & C. HERRERO. 1998.** Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 166: 105-116.
- FITT, W.; G. HESLINGA & T. WATSON. 1992.** Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. Tridacnidae). *Aquaculture* 104: 1-10.

- FULLER R. 1989.** Probiotics in man and animals – A review. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365 – 378.
- GATESOUBE, F-J. 1997.** Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio sp.* Associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*. 10: 239-246.
- GATESOUBE, F-J. 1999.** The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.
- GAUTHIER MJ & GN FLATEAU. 1976.** Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to production of brominated compounds. *Canadian Journal Microbiology*. 22: 1612 – 1619.
- GIBSON, L.F., J. WOODWORTH & A.M. GEORGE. 1998.** Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 169: 111-120.
- GILDBERG, A & H. MIKKELSEN. 1998.** Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*. 167: 103-113.
- GRAM, L.; J. MELCHIORSEN, B. SPAGGAARD, I. HUBER & T.F. NIELSEN. 1999.** Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluoresce* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969-973.

- GREEN, J.C. & R.N. PIENAAR. 1997.** The taxonomy of the order Isochrysidales (Prymnesiophyceae) with special reference to the genera *Isochrysis* Parke, *Dictateria* Parke and *Imantonia* Reynolds. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 57: 7 – 17.
- HERNLEM, B. & L. TSAI. 2000.** Chlorine generation and disinfection by electroflotation. *Journal of food science.* 65(5): 834 – 837.
- HIBBERD, D. J. 1976.** The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae (Haptophyceae): a survey with some new observations on the ultrastructure of Chrysophyceae. *Bot. J. Linn. Soc.,* 72: 55 – 80.
- IWASAWA, A. AND NAKAMURA, Y. 1996.** Bactericidal effect of acidic electrolyzed water-comparison of chemical acidic sodium hypochloride (NaOCl) solution. [Japanese] *Kansenshogaku Zasshi* 70, 915-922.
- IZUMI, H. 1999.** Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. *Journal of food science.* 64(2): 536 – 539.
- JORQUERA, M.A., C.E. RIQUELME, L.A. LOYOLA & L.F. MUÑOZ. 1999.** Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture International.* 7: 433 – 448.

- KEITH, A.C. 2000.** Cloro (Spanish). Chlorine Chemistry Council Home. 13 August 2000, revisiondate.[Online][http://www.c3org/chlorine\\_knowledge\\_center/whitepapers10-98.html](http://www.c3org/chlorine_knowledge_center/whitepapers10-98.html). 11 July 2001, last date accessed).
- KIM, C., HUNG, Y.C. AND BRACKETT, R.E. 2000.** Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Journal of Food Microbiol* 61, 199-207.
- KIM, C., HUNG, Y.C. AND BRACKETT, R.E. 2000.** Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection*. 63(1): 19 – 24.
- LEWIS, T.; C. GARLAND, T. O'BRIEN, M. FRASER, P. TONG, C. WARD, T. DIX & T. McMEEKING. 1988.** The use of 0,2 um membrane filtered seawater for improved control of bacterial levels in microalgal cultures fed to larval Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* (69): 241-251 p.
- LILTVED, H & S. J. CRIPPS. 1999.** Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Research*. 30,445-450.
- LILTVED, H.; H. HEKTOEN & H. EFRAIMSEN. 1995.** Inactivation of bacterial and fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering* 14: 107 – 122.

- LODEIROS, C. J.; E. FERNANDEZ, A. VELEZ & J. BASTARDO. 1988.** Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en la acuicultura. Bol. Inst. Oceanog. Venezuela. Univ. Oriente. 27(1 y 2): 63-69.
- McPHEARSON, R.; A. DePAOLA, R. ZIWNO, L. Jr. MILES, M. MOTES & A. GUARINO. 1991.** Antibiotic resistance in gram negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*. 99: 203-211.
- MOLINA, E., J. SANCHEZ, J. GARCIA, F. GARCIA & D. ALONSO. 1992.** EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem*. 27: 299 – 305.
- MOLINA, E., J. SANCHEZ, F. GARCIA, J. FERNANDEZ & F. ACIEN. 1994.** Effect of growth rate on EPA and DHA content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 41(1): 23 – 27.
- MOLL, D.; R. SUMMERS & A. BREEN. 1998.** Microbial characterization of biological filters used for drinking water treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64(7): 2755 – 2759.
- MORIARTY, D. 1990.** Interaction of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. Elsevier Science Publishers, B. U. *Microbiology in Poecilotherms*. 217-221 p.

- MORIARTY, D. 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaid aquaculture pond. *Aquaculture*. 164: 351-358 p.
- MORITA, C., K. SANO, S. MORIMATSU, H. KIURA, T. GOTO, T. KOHNO, W. HONG, H. MIYOSHI, A. IWASAWA, Y. NAKAMURA, M. TAGAWA, O. YOKOSUKA, H. HIROMITSU, T. MAEDA & Y. KATSUOKA. 2000.** Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *Journal of Virological Methods*. 85: 163 – 174.
- MUNITA, C. 1996.** Desarrollo de los estudios y usos en Chile y el mundo: Microalgas, las errantes microscópicas. En: *Aquanoticias Internacional*. 32: 6-13 p.
- NIKULIN, V.A. 1977.** Use of an electrolyzed sodium chloride solution for disinfection in therapeutic and prophylactic institutions [Russian]. *Sov Med* 12, 105-108.
- NOGAMI, K. & M, MAEDA. 1992.** Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canada Journal Fisheries Aquatic Science*. 49: 2373-2376.
- O' SULLIVAN MG, G. THORNTON, GC O' SULLIVAN & JK COLLINS. 1992.** Probiotics bacteria: Myth or reality?. *Trends Food Science and Technology*. 3: 309 – 314.

- OCLARIT JM, S OHTA, Y KAMIMURA, Y YAMAOKA & S IKEGAMI. 1994.**  
Production of an antibacterial agent, O-aminophenol by a bacterium isolated from the marine sponge, *Adocia sp.* *Fisheries Science*. 60: 559 – 562.
- OKAUCHI, M. 1990.** Food value of *Isochrysis aff. galbana* for the growth of pearl oyster spat. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1343.
- OLSEN, J.C., WESTREDAHL, A., CONWAY, P. & KJELLEBERG, S. 1992.**  
Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) – associated bacteria with inhibitory against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 551 – 556.
- OOMORI, T., T. OKA, T. INUTA, & Y. ARATA.** The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. *Analytical Sciences*. 16: 365 – 369.
- PARKE, M. 1949.** Studies on marine flagellates. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 28: 255 – 288.
- PARKER, R. B. 1974.** Probiotics the other half of the antimicrobial story. *Anim. Nutr. Health*. 29: 4 – 8.
- PASCHO, R.; M. LANDLT & J. ONGERTH. 1995.** Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture* 131: 165 – 175.

- PATTERSON, G. W., E. TSITSA-TSARDIS, G.H. WIKFORS, P.K. GLADU, D. J. CHITWOOD & D. HARRISON. 1994.** Sterols and alkenones of *Isochrysis*. *Phytochemistry*. 35: 1233 – 1236.
- PORTER, K & Y. FEIG. 1980.** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25(5): 943-948.
- PRIERUR, D.; G. MEVEL, JL. NICOLAS, A. PLUSQUELLEC & M. VIGNEULLE. 1990.** Interaction between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28: 277-352.
- RENAUD, S. M., ZHOU, H. Q., PARRY, D.L., THINH, L.V. & K.C. WOO. 1995.** Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgal species *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia palacea*, and commercial species *Isochrysis sp.*, (clone TISO). *J. Appl. Phycol.* 7: 595 – 602.
- RENAUD, S. M.; THINH, L. & D. L. PARRY. 1999.** The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 170: 147-159 p.
- RENGPIPAT, S., W. PHIANPHAK, S. PIYATIRATITIVORAKUL & P. MENASVETA. 1998.** Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 167: 301-313.

- RICO-MORA, R. & D. VOLTOLINA. 1995.** Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae) cultures. *Rivista Italiana de Acquacoltura*. 30: 105-109.
- RINGØ, E. & T.H. BIRKBECK. 1999.** Review of intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*. 28: 735-752.
- RIQUELME, C. & Y. ISHIDA. 1988.** Chemotaxis of bacteria extracellular products of marine bloom. *Journal Gen. Applied. Microbiology*. 34: 417-423 p.
- RIQUELME, C.; P. CHAVEZ, Y. MORALES, & G. HAYASHIDA. 1994.** Evidence of parental bacteria transfer to larval in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biological Research*. 27: 129-134.
- RIQUELME, C., G. HAYASHIDA, A. E. TORANZO, J. VILCHES & P. CHAVEZ. 1995a.** Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum* related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larval cultured in Chile. *Diseases of aquatic Organisms*. 22: 135-141 p.
- RIQUELME, C.; G. HAYASHIDA, N. VERGARA, A. VASQUEZ, Y. MORALES & P. CHAVEZ. 1995b.** Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*. 138: 49-60.

- RIQUELME, C.; G. HAYASHIDA, R. ARAYA, A. UCHIDA, M. SATOMI & Y. ISHIDA. 1996a.** Isolation of a native bacterial strain the scallop *Argopecten purpuratus* whit inhibitory effects agains pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 15,(2): 369 – 374.
- RIQUELME, C.; AE TORANZO, JL BARJA, N VERGARA & R ARAYA. 1996b.** Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 213 - 218.
- RIQUELME C, R. ARAYA, N VERGARA, A ROJAS, M GUAITA & M. CANDIA. 1997.** Potencial of probiotic strains in the cultura of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17 – 26.
- RIQUELME, C. R. ARAYA & R. ESCRIBANO. 2000a.** Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*. 181: 25 – 36.
- RIQUELME, C., M. JORQUERA, A. ROJAS, R. AVENDAÑO & N. REYES. 2000b.** Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. 00: 1 – 9.
- RODRIGUEZ, L. 1988.** A review on some technicals methods of microalgal cultures. *Cultures systems gayana*, Bot. 45(1-4): 283-287 p.

- ROJAS, L. 1992.** Determinación cualitativa de bacterias asociadas al desarrollo larval de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Tesis para optar al Título de Ingeniero (E) en Acuicultura. Universidad de Antofagasta. 86 p.
- RUETER, J. & R. JOHNSON. 1995.** The use of ozone to improve solids removal during disinfection. *Aquacultural Engineering* 14: 123 – 141.
- RUIZ, R. & J. SANCHEZ. 1995.** Effect of three different marine bacteria strains on larval cultures of *Pecten maximus*. En: Book of abstracts, 10<sup>th</sup> International Pectinid Workshop: 113 – 114.
- SERVAIS, P. & BILLEN, G. 1993.** Dynamics of heterotrophic bacteria in aquatic system: the HBS model. In: Guerrero y C. Pedrós-Alió (eds) Trends in Microbial Ecology. Spanish Society for microbiology Publisher, Barcelona, España. 397-400 p.
- SHANKAR, G.S. 1996.** Role of probiotic in shrimp farming. *Fish World*. 4:21 pp.
- SIEBURTH, J. 1976.** Bacterial substrate and Productivity in Marine Ecosystems. *An. Rev. Ecol. Syst.* (7): 259-285.
- SILVA, F. & M. MEZA. 1999.** Optimización en la incorporación de bacterias benéficas en cultivos microalgales. Seminario para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad de Antofagasta – Chile.

- SINDERMAN, C.J. 1990.** Principal diseases of marine fish and shellfish. 2th Edition, Volume 1. Academic Press, Inc. New York, USA. 521 pp.
- SKJERMO, J & O, VADSTEIN. 1999.** Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177: 333-343.
- SOBSEY, M.D. 1989.** Inactivation of health related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science and Technology*. 21: 179 – 195.
- SPANGGARD, B.; F. JORGENSEN, L. GRAM & H. HUSS. 1993.** Antibiotics resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115: 195-207.
- STAUBER, J.L. 1998.** Toxicity of chlorate to marine microalgae. *Aquatic Toxicology* 41, 213-227.
- STEIN, 1979.** Handbook of phycological methods culture and growth measurement. Cambridge University Press. 446 p.
- STELL, D. & J. TORRIE. 1985.** Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da edición. Mc. Graw Will. Bogotá – Colombia. . 662 p.
- SUGITA, H., Y. HIROSE, N. MATSUO & Y. DEGUCHI. 1998.** Production of the antibacterial substace by *Bacillus sp.* Strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. 165: 269-280.

**SUGITA, H.; J. MITA & Y. DEGUCHI. 1996.** Effect of ozone treatment on amylases in seawater. *Aquaculture* 141: 77-82.

**SUGITA, H.; T. ASAI; K. HAYASHI; T. MITSUYA, K. AMANUMA, C. MARUYAMA & Y. DEGUCHI. 1992.** Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58(12): 4072-4075.

**SUMMERFELT, S.; J. HANKINS, A. WEBER & M. DURANT. 1997.** Ozonation of recirculating rainbow trout culture system. II. Effects on microscreen filtration and water quality. *Aquaculture*. 158: 57-67 p.

**TAMARU T, T ARAKI, H AMAGO, H MORI & T MORISHITA. 1995.** purification and characterization of a extracellular B-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio sp.* Strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 4454-4458.

**TANAKA, N., FUJISAWA, T., DAIMON, T., FUJIWARA, K., YAMAMOTO, M. AND ABE, T. 1999.** The cleaning and disinfecting of hemodialysis equipment using electrolyzed strong acid aqueous solution. *Artif Organs* 23, 303-309.

- WESTERDAHL, A.; J. OLSSON, S. KJELLEBERG & P. CONWAY. 1991.** Isolation and characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Applied and environmental microbiology. 57(8): 223-228 p.
- WIKFORS G.H. & G. W. PATTERSON. 1994.** Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. *Aquaculture*. 123: 127-135 p.
- WILK, I.J., ALTMANN, R.S. AND BERG, J.D. 1987.** Antimicrobial activity of electrolyzed saline solution. *Sci Total Environ* 63, 191-197.
- YAMAGUCHI, N., T. KENZAKA & M. NASU. 1997.** Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microbes and Environments*. 12: 1 – 8.
- YANG, Z., Y. LI, & M. SLAVIK. 1999.** Antibacterial efficacy of electrochemically activated solution for poultry spraying and chilling. *Journal of food science*. 64(3): 469 – 472.
- YOSHIMIZU, M., A. ISHIKAWA, Y. HORI, T. YOSHINAKA, Y. EURA, K. WATANABE & T. UENISHI. 1999.** Desinfection of system for aquaculture by electrolyzation of sea water. *Fac. Fish., Hokkaido Univ. Japan*.h

## GLOSARIO

**Antibiótico.-** Agente químico producido por un microorganismo, que mata o inhibe el crecimiento de otro.

**Antimicrobiano.-** Agente perjudicial para los microorganismos, ya sea matándolos o inhibiendo su crecimiento.

**Autoclave.-** Equipo para esterilizar, que destruye microorganismos con temperatura y vapor de agua a presión elevada.

**Axénico.-** Referencia al cultivo de un organismo puro, que no contiene ningún otro, y realizado en condiciones de laboratorio. Muchos de los organismos axénicos son producto de la biogenética.

**Bactericida.-** Sustancia que produce la muerte de las bacterias. Antibiótico, suero bactericida, asepsia. Se dice de toda sustancia medicamentosa (antibiótico en general) capaz de herir y matar las bacterias (penicilina, por ejemplo).

**Bacteriostático.-** Se dice de toda sustancia medicamentosa (antibiótico, en general) que inhibe o frena la multiplicación de las bacterias pero sin destruirlas (tetraciclina, por ejemplo).

**Cepa.-** Población celular descendiente de una única célula; clon.

**Clon.-** Población de células que descienden todas de una única célula. O bien, cierto número de copias de un fragmento de DNA obtenidas al dejar que el fragmento original se replique insertado en un fago o en plásmido.

**Cloración.-** Procedimiento de desinfección altamente efectivo para el agua potable, usando gas cloro o compuestos que contengan cloro.

**Colonia.-** Población de células que puede observarse macroscópicamente, y crece en un medio sólido, procedentes de una sola célula.

**Deletéreo.-** Se dice de todo lo que es nocivo, Mortífero, venenoso.

**Desinfección.-** Destrucción de los gérmenes que pueden causar infecciones.

**Electrolización.-** Acto o proceso de electrólisis.

**Electrólisis.-** Acto o proceso de descomposición química, por acción de la electricidad.

**Epizootia.-** Enfermedad infecciosa que ataca a una o varias especies de animales de manera transitoria, como una epidemia.

**Estéril.-** Libre de organismos vivos y de virus.

**Esterilización.-** Tratamiento que mata o eliminación del medio de cultivo, todos los microorganismos vivos o sus virus.

**Hatchery.-** Incubadora, eclosería, vivero, criadero.

**Inóculo.-** Material usado para iniciar un cultivo microbiano.

**Lisis.-** Pérdida de la integridad celular, con liberación de contenido citoplasmático.

**Microbiológico.-** Relativo a la ciencia de los microorganismos.

**Medio de cultivo.-** Solución acuosa de varios nutrientes adecuada para el crecimiento de microorganismos.

**Ozonización.-** Procedimiento de desinfección altamente efectivo para el agua, usando gas ozono.

**Patógeno.-** Organismo capaz de causar daño a un hospedador, al cual infecta.

**Probiótico.-** Microorganismo vivo que, al ser ingerido en cantidades suficientes, ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales.

**Prebiótico.-** Molécula fermentable que posee un efecto favorable sobre la flora intestinal. En esta categoría se encuentran las fibras, los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos, la inulina (extraída de la

achicoria, por ejemplo), la lactosa, los azúcares-alcoholes, etc. Dichas moléculas pueden añadirse a un alimento o bien producirse in situ, como los oligosacáridos, fabricados por algunas bacterias durante la fermentación láctica.

**Profilaxis.-** Prevención de enfermedades mediante las medidas oportunas.

**Recuento de bacterias totales (Direct Total Count, DTC).-** Determinación y/o cuantificación directa del número total de células en una muestra sin diferenciar entre células muertas y vivas.

**Recuento de bacterias viables (Direct Viability Count, DVC).-** Determinación y/o cuantificación directa del número de células viables presentes en una muestra.

**Recuento de viables cultivables.-** Determinación y/o cuantificación indirecta del número de células cultivables en medio artificial de cultivo a través del conteo de unidades formadoras de colonia (Colony Formad United, CFU).

**Unidad Formadora de Colonias (Colony Formad United, CFU).-** Unidad de medida mediante originada de una célula viable.

**Viable.-** Vivo, capaz de reproducirse.

**Virucida.-** Agente químico que inactiva virus.

Agua de mar electrolizada



# ANEXO

Agua de mar

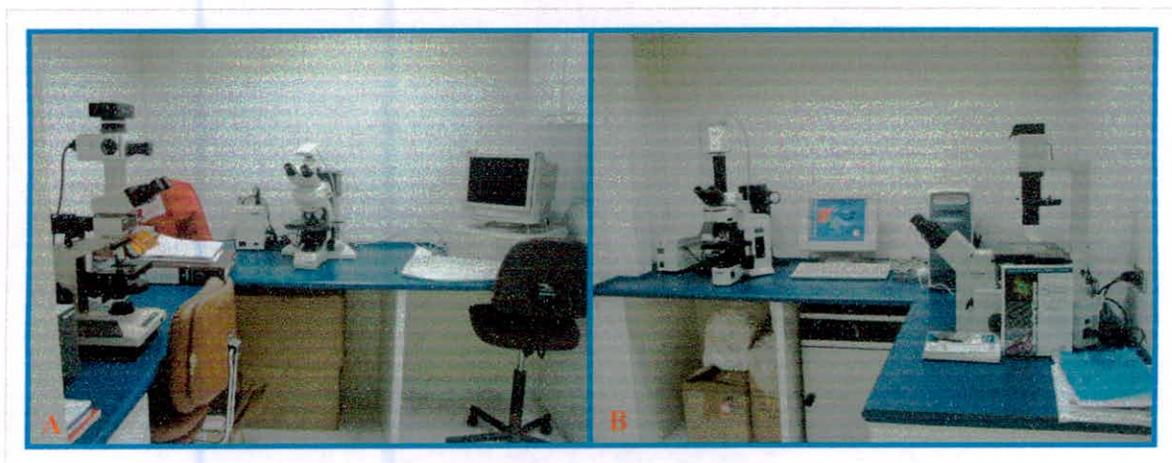
Fig. 14.- Esquema del proceso de electrolización de agua de mar.

**Tabla 15.-** Composición química del nutriente comercial F/2 (FRITZ S.A.), para el cultivo de microalgas, equivalente a la formulación F/2 Guillard's.

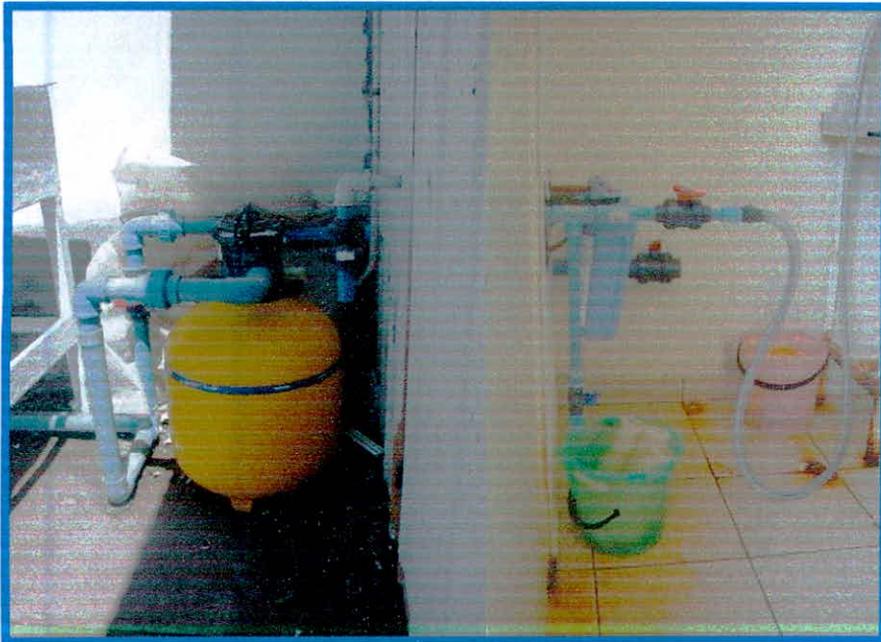
Solución A		Solución B	
- Hierro (Fe)	1,3 %	- Nitrógeno (N)	15,0 %
- Manganeso (Mn)	0,034 %	- Fosfato (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	2,0 %
- Cobalto (Co)	0,002 %	- Vitamina B1	0,07 %
- Zinc (Zn)	0,0037 %	- Vitamina B12	0,0002 %
- Cobre (Cu)	0,0017 %	- Biotina	0,0002 %
- Molibdato (Mo)	0,0009 %		
<u>Ingredientes</u>		<u>Ingredientes</u>	
- Cloruro de fierro.		- Nitrato de sodio.	
- EDTA.		- Fosfato monosodico.	
- Cloruro de cobalto.		- Tiamina hidrocloreide (vit. B1).	
- Sulfato de Zinc.		- Vitamina B12.	
- Sulfato de cobre.		- Biotina.	
- Sulfato de sodio.			
- Molibdato de sodio.			



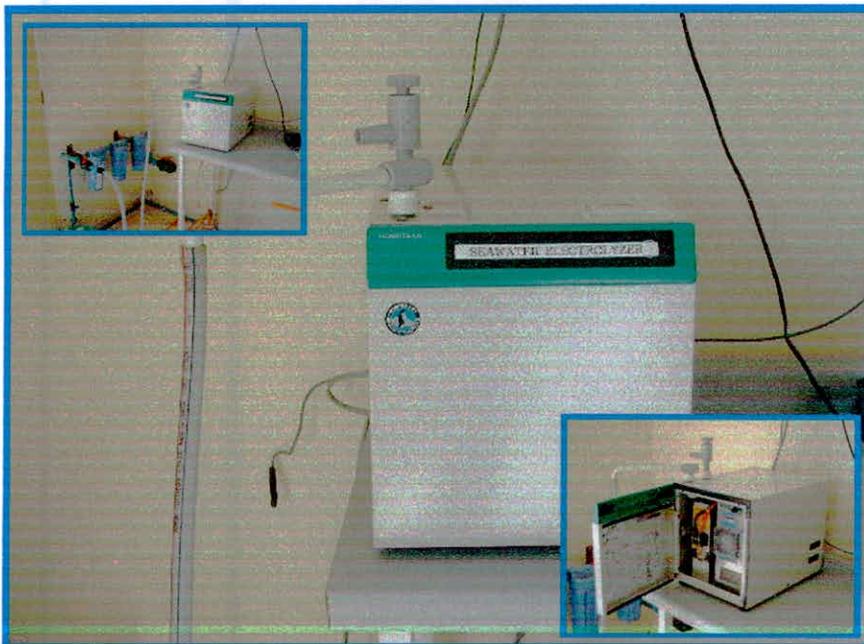
**Fig. 15.-** Sala principal del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Antofagasta. A) Campana de flujo laminar, B) Campana de madera, C) Mesón principal de trabajo, D) Zona de lavado y E) Refrigeradoras para conservación de materiales y reactivos.



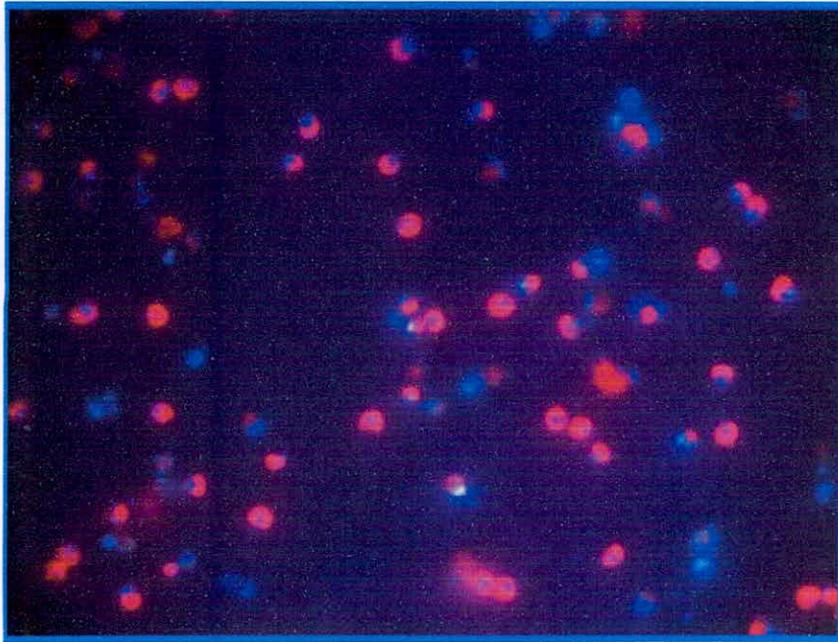
**Fig. 16.-** Sala de microscopia de epifluorescencia.



**Fig. 17.-** Sistema de filtración de agua de mar empleado en la presente experiencia.



**Fig. 18.-** Equipo de electrolización empleado en la presente experiencia.



**Fig. 19.-** Cultivo axénico de la microalga *Isochrysis galbana* observado bajo tinción DAPI y microscopia de epifluorescencia.