

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS SOBRE EL
CRECIMIENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS IMPLICADAS EN EL
PROCESO DE *BIOFOULING***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

ANAHÍ ESCOBEDO FREGOSO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. RUTH NOEMÍ AGUILA RAMÍREZ

OCTUBRE DEL 2017

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA

CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS

Ensenada, B.C. a 1 de Agosto de 2017.

P. BIOL. ANAHÍ ESCOBEDO FREGOSO

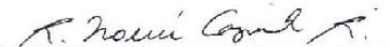
Presente.-

Por este medio comunico a usted que después de haber leído detenidamente el trabajo que presenta como Tesis Profesional bajo el Título:

"EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE BIOFOULING"

Considero que reúne los requisitos para aprobar la parte escrita de su Examen Profesional.

ATENTAMENTE



DRA. RUTH NOEMI
AGUILA RAMÍREZ
Directora de tesis

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA

CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS

Ensenada, B.C. a 1 de Agosto de 2017.

P. BIOL. ANAHÍ ESCOBEDO FREGOSO

Presente.-

Por este medio comunico a usted que después de haber leído detenidamente el trabajo que presenta como Tesis Profesional bajo el Título:

“EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE BIOFOULING”

Considero que reúne los requisitos para aprobar la parte escrita de su Examen Profesional.

ATENTAMENTE



**DRA. MARIA DEL REFUGIO
GONZALEZ ESPARZA**

Asesora interna de tesis

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA

CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS

Ensenada, B.C. a 1 de Agosto de 2017.

P. BIOL. ANAHÍ ESCOBEDO FREGOSO

Presente.-

Por este medio comunico a usted que después de haber leído detenidamente el trabajo que presenta como Tesis Profesional bajo el Título:

“EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIATOMEAS BENTÓNICAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE BIOFOULING”

Considero que reúne los requisitos para aprobar la parte escrita de su Examen Profesional.

ATENTAMENTE



DR. CARLOS ALBERTO
FLORES LÓPEZ
1er Vocal

Resumen de la tesis de Anahí Escobedo Fregoso presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Octubre del 2017.

Evaluación de extractos bacterianos sobre el crecimiento de diatomeas bentónicas implicadas en el proceso de *biofouling*.

Resumen aprobado:

Dra. Ruth Noemí Águila Ramírez

RESUMEN

El *biofouling* es un fenómeno natural que comienza con la formación de una biopelícula, seguido por la colonización de microorganismos y posteriormente por la acumulación de invertebrados. Es en la primer fase (*microfouling*) en donde las diatomeas (además de bacterias, hongos y rotíferos) destacan como principales constituyentes de la comunidad microbiana formadora de *biofouling*, siendo las formas pennadas las que dominan en el proceso. El *biofouling* tiene como consecuencia el aumento en los costos de productividad, incremento en la emisión de gases de efecto invernadero, disminución de la vida útil de materiales sumergidos en el mar, entre otros. Para combatir este problema, usualmente se utilizan pinturas a base de compuestos tóxicos, o biocidas que contienen cobre, entre otros metales pesados, los cuales producen un impacto negativo en el ambiente, erradicando todos los organismos del medio, incluso los no involucrados. Una alternativa para controlar el problema, son las pinturas a base de compuestos de origen marino, con sustancias con actividad *antifouling* y bajos niveles de toxicidad. Para hacer estos compuestos más efectivos y dirigidos, la caracterización biológica de las especies de diatomeas que participan en la formación de *biofouling* es uno de los objetivos de este estudio, así como, identificar los extractos con mayor potencial *antifouling*. Para ello, se realizaron pruebas *in vitro*, utilizando 13 extractos de bacterias probando su efectividad contra tres cepas consideradas como formadoras de biopelículas de las costas de Francia. Con esta prueba se seleccionaron siete extractos que redujeron el crecimiento microalgal a la mínima concentración inhibitoria (CMI). Estos fueron sometidos posteriormente a pruebas *in situ* en el puerto de La Paz, B.C.S., incorporando los extractos a geles inertes sobre placas de cajas Petri sostenidas

en estructuras de PVC, se utilizó óxido cuproso como control positivo y fueron sumergidas en el mar durante 30 días. Al ser retiradas del sitio, se obtuvo la cobertura microalgal de cada tratamiento y se cultivaron en medio F/2. Una vez crecidos los cultivos, se realizó una identificación taxonómica aplicando previamente a las muestras un proceso de digestión y montado para retirar la materia orgánica y mantener exclusivamente la frústula de las diatomeas, estructuras que fueron observadas bajo microscopio compuesto para realizar la caracterización florística de diatomeas y conocer las especies que originan el *biofouling* en la zona. Como resultado se obtuvo que *Amphora sp.*, *Nitzschia longissima*, *N. lorenziana*, *Pleurosigma sp.*, *Psammodictyon punctata var. coartata* y *Thalassiosira dicipiens* fueron las especies más recurrentes, al presentarse en todos los tratamientos, y fue el género *Nitzschia* el dominante, con nueve especies encontradas. Mediante la comparación de ambas pruebas, se concluyó que el extracto con co-cultivo de *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis*, así como el extracto de la cepa de *Staphylococcus sp.* son los seleccionados para continuar con ensayos utilizando las especies de diatomeas anteriormente mencionadas.

Palabras clave: *Biofouling*, *fouling*, *antifouling*, biopelícula, diatomeas, extractos bacterianos.

DEDICATORIA

A la mujer más fuerte que he conocido en mi vida y que seguramente no podré comparar con nadie. La jefa de la familia, la extrañamos mucho, nos hace falta, sigo viéndola y escuchando esos regaños, chistes y anécdotas que con tanta gracia contaba. Siempre la llevamos en el corazón. Ya no alcanzó a ver otra meta cumplida y dejó una marca en todos nosotros.

Y a mi hermana postiza. Persona tan única, alegre, rebelde y alocada. Mi niñez no hubiera sido la misma sin tu presencia, Carly. Aún me río de tan solo recordar tus travesuras.

Esta va por ustedes...

+*Carlota Navarro de Fregoso (8-Enero-1931; 28-Febrero-2016)*

+*Carlybeth Ramírez Fregozo (17-Agosto-1988; 18-Enero-2010)*

*"Las palabras nunca alcanzan
cuando lo que hay que decir
desborda el alma"*

Julio Cortázar

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto “Desarrollo de una plataforma tecnológica de recubrimientos antivegetativos de bajo impacto ambiental” CDTI-CONACyT 210637, del cual se desprende esta investigación.

A las instituciones CICIMAR, en especial al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, por permitirme desarrollar esta tesis en sus instalaciones. A CIBNOR, en donde también hice uso de sus laboratorios como apoyo. A UABC, mi alma mater en donde desarrollé el gusto por la investigación.

A mi directora de tesis, la Doctora Ruth Noemí Aguila Ramírez, agradezco infinitamente su apoyo y guía incluso con la distancia. Siempre paciente, tolerante y cálida, tengo suerte de ser parte de su grupo de estudiantes.

Al Doctor Francisco Omar López Fuerte. Aprendí mucho de sus habilidades, no sé cómo tuvo tanta paciencia y dedicación conmigo. Admiro su trabajo y carácter, sin usted me hubiera tardado fácil otros dos años más en terminar de identificar diatomeas. Quedo en deuda.

A todos aquellos que me ayudaron, apoyaron y aconsejaron para esta investigación. Erika Rico, me resolviste tantas preguntas. A los catedráticos de CIBNOR que entre pláticas dilucidaban mis dudas: Eduardo y Alberto.

A mi familia, razón de que no me de por vencida. Mi madre Carlota Fregoso que siempre tiene fé en mí y nos impulsa para dar más. Mi papá José Escobedo, su mentalidad me dejó claro desde pequeña que terminaría mi carrera. Mi hermano Damian, protector de la familia, siempre puedo contar contigo. Mi hermana, la Dr. Cristina, te debo todo, me involucraste a este mundo de la ciencia, financiaste mi educación y eres como mi segunda directora de tesis. Tu trabajo y pasión me inspiras a alcanzar mis sueños y metas. Mi abuelo querido, ejemplo de esfuerzo y perseverancia. Los amo familia.

A mi hermosa e inteligente hija, Corina Danae, el amor de mi vida, me acompañas en cada aventura, eres tan chiquita y tengo tanto que aprender de ti, te amo princesita. Doy todo por verte feliz. Eres mi orgullo, chiqui.

Y a mi Luis, tu apellido define bien tu persona, eres un guerrero, hombres como tú no se encuentran fácilmente. Quiero seguir compartiendo sueños contigo y llegar muy lejos. Siempre estás en mi mente y corazón. Agradezco tenerte a mi lado, te amo.

ÍNDICE

Lista de Figuras	VII
Lista de Gráficas.....	VIII
Lista de Tablas	VIII
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES	9
Estudios para el control del <i>Biofouling</i>	9
Extractos Bacterianos	16
Importancia del estudio	18
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General	15
Objetivos específicos	15
METODOLOGÍA	16
Ensayo en laboratorio (<i>in vitro</i>).....	16
Ensayo en campo (<i>in situ</i>).....	17
Área geográfica de estudio.....	24
Análisis de los datos <i>in situ</i>	26
Proceso de digestión y montado e Identificación florística	28
Método de identificación florística	29
Bibliografía utilizada para la identificación	30
RESULTADOS	31
Ensayos <i>In vitro</i>	31
Ensayos <i>In situ</i>	32
Taxonomía y florística	40
Descripción	56
DISCUSIÓN	66
Ensayos <i>In vitro</i>	66
Ensayos <i>In situ</i>	67
Categorías taxonómicas: riqueza y recurrencia	68
Cobertura e identificación florística	70
Interés sobre la cepa realizada con co-cultivo	70

Control de <i>biofouling</i> mediante cobre	71
Potencial de inhibición de las pinturas antivegetativas	72
CONCLUSIÓN	74
REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	75

Lista de Figuras

FIGURA 1-4. LAMILLA 1. 1) TRICERATIUM DICTYOTUM, 2) ZYGOCEROS RHOMBUS, 3) TRICERATIUM DUBIUM, 4) PERISSONOË CRUCIATA.	423
FIGURA 5-11. LAMINILLA 2. 5) THALASSIOSIRA DICAPIENS, 6) CYCLOTELLA MENENHENGIANA, 7) CYCLOTELLA ATOMUS, 8) PARALIA SULCATA, 9) PODOBITA STELLIGER. 10) ACTINOCYCLUS OCTANARIUS, 11) ACTINOPTYCHUS SENARIUS.	434
FIGURA 12-20. LAMINILLA 3. 12) EUPODISCUS RADIATUS, 13) AULISCUS SULPTUS, 14) ODONTELLA TURGIDA.	445
FIGURA 14-20. LAMINILLA 4. 14) HYALOSYNEDRA LAEVIGATA, 15) ARDISSONEA FORMOSA, 16) GRAMMATOPHORA MARINA, 17) DIMEROGRAMMA MINUS, 18) DELPHINEIS SURIRELLA VAR. AUSTRALIS, 19) COCCONEIS SP., 20) COCCONEIS DISTANTS.	456
FIGURA 21-23. LAMINILLA 5. 21) AMPHORA DECUSATA, 22) AMPHORA BIGGIBA VAR. INTERRUPTA, 23) AMPHORA SPP.	467
FIGURA 24-25. LAMINILLA 6. 24) ACHNANTHES BREVIPIES VAR. ANGUSTATA, 25) DIPLONEIS SUBORBICULARIS.	478
FIGURA 26-30. LAMINILLA 7. 26) CAMPYLODISCUS AMBIGUS, 27-28) CAMPYLODISCUS FASTUOSUS, 29) CAMPYLODISCUS SIMULANS, 30) CAMOYLODISCUS PARVULUS,	4849
FIGURA 31-35. LAMINILLA 8. 31) NAVICULA ARENARIA, 32) NAVICULA FLAGELLIFERA, 33) NAVICULA SP., 34) CALONEIS LIBER VAR. LINEARIS, 35) ENTOMONEIS ALATA.	490
FIGURA 35-42. LAMINILLA 9. 36) NITZSCHIA SIGMA, 37) NITZSCHIA CLOSTERIUM, 38) NITZSCHIA CAPITELLATA C.F., 39) NITZSCHIA HYBRIDA, 40-41) NITZSCHIA LORENZIANA, 42) NITZSCHIA INCERTA.	501
FIGURA 43-49. LAMINILLA 10. 43) PSAMODICTYON BOMBIFORME, 44) PSAMODICTYON PANDURIFORME C.F., 45) PSAMODICTYON PUNCTASTA VAR, COARTATA, 46) ROPHALODIA MUSCULUS (CON HEPITECA E HIPOTECA), 47)) ROPHALODIA PACIFICA, 48) SP.1, 49) TRYBLIONELLA HUNGARICA.	512
FIGURA 50-54. LAMINILLA 11. 50) SEMINAVIS STRIGOSA, 51) SEMINAVIS EULEINSTENII CF., 52) RHOICOSIGMA OCEANICUM, 53) PLEUROSIGMA FORMOSUM, 54) PLEUROSIGMA SP.2.	523
FIGURA 55-59. LAMINILLA 12. 55) LYRELLA IRRORATA, 56) PETRONEIS GRANULATA, 57) PARLIBELLUS HAGELSTEINII, 58) MASTOGLOIA SP., 59) FALLACIA NUMMULARIA.	534

FIGURA 60-63. LAMINILLA 13. 60) SURIRELLA SP., 61-62) SURIRELLA FASTUOSA, 63) PETRODICTYON GEMMA.....	545
FIGURA 64-68. LAMINILLA 14. ESPECIES EXTRA GRANDES, TOMADAS POR PARTES A 100X Y UNIDAS. 64) CATACOMBAS GAILLONII, 65) PLEUROSIGMA SP 1, 66) BACILLARIA SOCIALIS, 67) PLAGIOTROPIS LONGA, 68) NITZSCHIA LONGISSIMA	556

Lista de Gráficas

GRÁFICA 1. COBERTURA REPRESENTADA POR LAS MICROALGAS SOBRE LAS PLACAS EN LAS PRUEBAS IN SITU.	33
GRÁFICA 2. RIQUEZA ESPECÍFICA DE DIATOMEAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. C+= CONTROL POSITIVO, CN= CONTROL NEGATIVO.....	38
GRÁFICA 3. RECURRENCIA DEL TOTAL DE LAS FAMILIAS.	39
GRÁFICA 4. RECURRENCIA DEL TOTAL DE LAS CLASES.....	40

Lista de Tablas

TABLA I. REGISTRO DE MUESTRAS.	27
TABLA II. ACTIVIDAD ANTIFOULING IN VITRO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE BACTERIAS MARINAS FRENTE A MICROALGAS FORMADORAS DE BIOFILM (CMI $\mu\text{g mL}^{-1}$). LAS CEPAS MARCADAS CON (*) FUERON LAS SELECCIONADAS.....	32
TABLA III. ESPECIES DE DIATOMEAS ENCONTRADAS EN LAS SUPERFICIES CON INCORPORACIÓN DE LOS 9 DIFERENTES TRATAMIENTOS.	37
TABLA IV. ESPECIES MÁS RECURRENTES EN LAS PRUEBAS IN SITU. LAS MARCADAS CON (*) NO SE PRESENTAN EN UN TRATAMIENTO. 1=PRESENCIA Y 0=AUSENCIA.....	69

INTRODUCCIÓN

El *fouling* es un fenómeno natural que forma parte de muchos ecosistemas acuáticos, se da por la sucesión y acumulación de organismos que van desde bacterias hasta invertebrados, los cuales colonizan una superficie dada (Martínez-Díaz, 2010).

Existen diferentes tipos de *fouling*, sin embargo, el *biofouling* y la corrosión son los más frecuentes. El *biofouling*, es definido como un depósito dado por la acumulación, esencialmente microbiológica, la cual es conocida como *biofilm* o biopelícula (Epstein, 1981).

A pesar de la alta variabilidad de condiciones ambientales y la gran diversidad de organismos involucrados en el proceso, con frecuencia se observa una secuencia general de colonización durante el asentamiento, y al final, el establecimiento de una comunidad compleja. El proceso se diferencia en dos fases: *microfouling* y *macrofouling*, la primera abarca desde el acondicionamiento orgánico: desarrollando una *biopelícula* primaria mediante materia orgánica coloidal y moléculas como polisacáridos y proteínas, seguida por el asentamiento de microorganismos, en donde destacan las bacterias, diatomeas, hongos y rotíferos (Anil, 1986). Sin embargo, las diatomeas son las mayores constituyentes de la comunidad microbiana (Evans, 1988), al destacarse por su abundancia y rapidez para colonizar los sustratos (Buendía-Flores et al. 2015). Como consecuencia de la formación de la micropelícula se constituye una segunda fase, en donde

se presenta el asentamiento principalmente de clorofitas e invertebrados como: percebes, mejillones, briozoos, hidrozoos, etc. (Anil, 1986). Esta sucesión depende del éxito de la colonización por microorganismos, de manera que el control del *microfouling* a menudo es la solución para detener todo el proceso (Anil, 1986; Christie y Dalley, 1987).

Los organismos que se encuentren asociados al *biofouling* van a ser cambiantes, y dependerá de diversos factores como: localización geográfica, temperatura, salinidad, competencia y depredación. También existe una selección específica, mediada por la interacción entre el organismo y el sustrato. Por ejemplo, las larvas y esporas de algas, requieren de una superficie a la cual puedan adherirse para completar su ciclo vital. Se estima que existen en el mundo más de 4,000 especies involucradas en el *biofouling* marino, la mayoría de ellas pertenecientes a aguas superficiales de la costa y de puertos con gran cantidad de nutrientes (Moraga-Alcaino, 2012).

Del grupo de las diatomeas, las formas pennadas son las que mayormente dominan en la adhesión hacia los sustratos debido a características que las diatomeas centrales no presentan (Mitbavkar y Chandrashekar, 2006). Por ejemplo, las diatomeas pennadas con rafé secretan una sustancia mucilaginosas que además de proporcionarles unión al sustrato, les permite deslizarse sobre este, haciéndolas móviles, mientras que, la movilidad en microalgas centrales sólo se presenta en algunas que secretan mucílago mediante procesos valvares (fulto y rimopórtulas).

Los géneros más comunes encontrados en formaciones epibiontes son: *Amphora*, *Navicula* y *Nitzschia spp.* (Characklis y Cooksey, 1983; Cooksey et al. 1984; Mitbavkar y Anil, 2002, 2004, 2006; Patil y Anil, 2000, 2005^{a, c}).

En consecuencia de la formación de *biofouling*, los efectos generalmente se traducen en: una disminución importante del rendimiento de sistemas industriales, deterioro de materiales y reducción de vida útil de los mismos (Jimenez-Taracido, 2009), así como el incremento en los costos de productividad industrial principalmente debido a la alta resistencia de fricción del *biofouling* adherido (Yebra et al. 2004) lo cual se ve reflejado en un aumento del combustible, que llega a elevarse hasta un 50% en los gastos de transporte, representando una significativa pérdida económica. A su vez, la emisión de dióxido de carbono aumenta de manera proporcional al gasto de combustible (Anderson, 2002). El proceso de colonización en las superficies ha sido estudiado con la finalidad de disminuir este costo económico y el impacto ecológico mediante el desarrollo de medidas alternativas que lo controlen (Wahl, 1989).

Para reducir la problemática causada por el *biofouling* en las actividades industriales se han empleado sustancias químicas que ayudan a prevenir la colonización, conocidas como *antifouling* o antivegetativas. Por muchos años, las compañías navieras han empleado pinturas a base de compuestos tóxicos como: arsénico y mercurio, para contrarrestar los efectos de los organismos epibiontes. Y a partir de la década de 1960 se popularizó el uso de TBT (tributil de estaño; organo estañados). Sin

embargo, fue inminente su prohibición debido a que son biocidas no específicos, por lo cual, los efectos adversos que estos compuestos provocan sobre el ambiente, tales como: contaminación, debido a la alteración que provoca en los ciclos básicos del sistema (Castelló-Orvay, 1993), acumulación en organismos de consumo humano, así como posibles mutaciones genéticas. Actualmente también existe incertidumbre sobre el impacto ambiental que causan algunos de los biocidas comercialmente disponibles, como los que contienen cobre y zinc (Vishwakir y Anil, 1999).

En los últimos años, la aplicación de compuestos antimicrobianos naturales ha despertado un gran interés en la industria (en especial la naviera); para la prevención de la adhesión y acumulación de organismos incrustantes en las superficies, incluyendo la protección de estructuras artificiales sumergidas, tales como los equipos de acuicultura y cascos de buques, entre otros (Briand, 2009).

El presente estudio busca evaluar los compuestos de origen bacteriano marino con potencial para inhibir el crecimiento de microorganismos y por ende detener el proceso de colonización de macroorganismos. Así como, identificar las especies de diatomeas autóctonas involucradas en la formación del *biofouling*. Para ello, se realizaron pruebas *in vitro* e *in situ* de extractos de cepas bacterianas con efecto antivegetativo,

También se llevó a cabo la caracterización taxonómica de las diatomeas adheridas a las superficies en las pruebas en campo, con el propósito de

realizar en futuros estudios el cultivo y crecimiento de aquellas especies que resultaron más recurrentes en las pruebas *in situ* e inhibir su adhesión.

ANTECEDENTES

No se tiene suficiente información de las especies de diatomeas que conforman el *biofouling* en las costas del Noroeste de México, sin embargo, Moreno et al. (1996), Siqueiros-Beltrones (2002) y López-Fuerte et al. (2010) ya han hecho registros completos de las diatomeas que habitan en los cuerpos de agua del Golfo de California.

Durante los últimos años, se han llevado a cabo múltiples bioensayos con el fin de dilucidar los mecanismos de defensa química de los organismos acuáticos para el control del *biofouling* (Dobretsov y Qian, 2004; Dworjanyn et al. 2006; Nylund et al. 2007; Qian et al. 2007) y evaluar su variación en el tiempo y en el espacio (Hellio et al. 2004; Marechal et al. 2004).

Estudios para el control del *Biofouling*

Para el control del *microfouling* se han realizado algunos estudios. Uno de ellos es el de Sawant et al. (1995), quienes realizaron pruebas *in vitro* con extractos metanólicos de la planta *Derris scandens* ante siete bacterias y cuatro diatomeas formadoras de comunidades de *biofouling*, observando una inhibición de las siete bacterias y una diatomea (*Navicula subinflata*), los autores concluyeron que a pesar de que el extracto contenía propiedades antialgales su potencial variaba entre las diferentes especies de diatomeas.

En países de América latina como: Colombia y Argentina, se han identificado sustancias de origen natural para el control de *biofouling* a través de pinturas, entre ellas, se evaluaron los extractos obtenidos de organismos marinos (corales y esponjas). Después de una inmersión de 90 días en el mar, todos los extractos mostraron actividad *antifouling*, tanto en Mar del Plata (Argentina) como en Santa Marta (Colombia). El hecho de que los resultados fueran favorables en dos puertos con diferentes condiciones bióticas y abióticas generó mayores expectativas frente a su potencial (Santos-Acevedo et al. 2013).

También se han identificado nuevas fuentes de compuestos naturales a partir de las esponjas marinas *Agelas tubulata*, *Aplysina tabulata*, *Neopetrosia próxima* y *Holoturia glaberrima*, los cuales fueron muy efectivos en la inhibición del asentamiento de las principales especies de la comunidad formadora del *biofilm* (Santos-Acevedo et al. 2013).

Muchos de los compuestos descubiertos con mayor potencial antivegetativo provienen de algas o de invertebrados marinos. Se han probado a nivel laboratorio extractos de macroalgas (Hernández-Guerrero et al. 2009; Águila-Ramírez et al. 2012), esponjas (Montes-Plascencia, 2010, Ortiz-Aguirre, 2012) y bacterias marinas (Águila-Ramírez et al. 2014) que actúan inhibiendo el asentamiento de bacterias y microalgas productoras de *biofouling*.

Actualmente, el reto radica en la producción a gran escala de los compuestos naturales antes mencionados, ya que, la mayoría de ellos no pueden obtenerse en cantidades suficientes y los organismos de los que proceden no pueden ser cultivados. Adicionalmente, su cultivo conlleva costos demasiado elevados, o bien, su síntesis química resulta demasiado compleja y costosa (Carballo, 2002).

El uso de compuestos de origen microbiano (biocidas, inhibidores de la adhesión y/o colonización de otros microorganismos e inhibidores de la fijación de esporas de macroalgas, larvas e invertebrados); puede ser la solución al problema del *biofouling*, sin la limitante del abastecimiento, ya que estos se pueden cultivar en reactores (Demain y Adrio, 2008).

Aunque se conoce que los microorganismos marinos son una fuente prometedora de compuestos con actividad *antifouling*, hasta la fecha, sólo ha sido estudiado un número pequeño de ellos (Qian et al. 2007).

Extractos Bacterianos

Desde la década pasada, se han realizado estudios para conocer principalmente las etapas tempranas que conforman las biopelículas (*microfouling*), como: Dang y Lovell (1999), quienes estudiaron la sucesión primaria de bacterias en distintas superficies marinas; Raveendran et al. (1991) identificando el *microfouling* colonizador en superficies de aluminio y fibra de vidrio en costas de la India; Jiménez-Taracido (2009) que analizó la

evolución de las comunidades bacterianas sobre intercambiadores de calor en una planta piloto de Cádiz, España; Xu et al. (2012) dirigiendo su trabajo en la dinámica de microorganismos formadoras de biopelículas en las costas de Xiamen, China, entre otros tantos estudios, que se han utilizado para conocer la dinámica del proceso, permitiendo hacer pruebas cada vez más dirigidas y desarrollar eventualmente estrategias para mantener las superficies libres de aquellos microorganismos.

Hölmstrom y Kjelleberg (1999) demostraron efectos inhibidores sobre diatomeas del género *Amphora* utilizando cepas aisladas de la bacteria marina *Pseudomonas tunicata*, con efectividad ante organismos epibiontes en las aguas de Sydney, Australia. Otras bacterias como *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas* también se han reportado como reguladoras del crecimiento de micro y macro algas (Yoshinaga et al. 1997; Kato et al. 1998; Lovejoy et al. 1998; Lee et al. 2000; Burgess et al. 2003).

En CICIMAR-IPN se cuenta con una colección de cepas bacterianas productoras de compuestos antibióticos, las cuales fueron aisladas como simbioses de invertebrados marinos, de sedimentos marinos, algas y manglar. Adicionalmente, los compuestos que estas bacterias producen han generado resultados exitosos en modelos de control de *microfouling* sobre bacterias (Águila-Ramírez et al. 2015).

Para el descubrimiento de nuevos biocidas se han realizado ensayos probándolos ante especies dominantes. Generalmente se utilizan consorcios mixtos, principalmente de los microorganismos involucrados, es decir, bacterias, microalgas y/o diatomeas (Kobayashi y Okamura, 2002; Da Gama et al. 2003; Briand, 2009). La mayoría de los estudios se han enfocado en comprender la influencia de la colonización inicial por parte de las bacterias en la inhibición del asentamiento y crecimiento de la macrofauna (De Nys et al. 1995; Maximilien et al. 1998; Dobretsov y Qian, 2004; Dobretsov et al. 2006; Qian et al. 2006; Nylund et al. 2007).

Sin embargo, según Martínez-Rodríguez et al. (2014), en México son escasos los trabajos que se conocen sobre *biofouling*. Apesar de los estudios con extractos bacterianos en la zona de La Paz, B.C.S., no se han realizado específicamente investigaciones sobre la identificación taxonómica de las especies que conforman el *biofouling* en esta región.

Importancia del estudio

Para evitar el asentamiento de organismos se utilizan comúnmente agentes con acción *antifouling* como el óxido cuproso (Readman et al. 1993), cloro, bromo, ozono y ácido paracético (Jiménez-Taracido, 2009) en pinturas formuladas para aplicarse sobre las superficies que entran en contacto con el agua de mar, liberando sustancias bioactivas y formando un tipo de

manto biocida que evite la fijación de los organismos (Eguía-López, 2000). Sin embargo, el uso de los químicos *antifouling* tiene la desventaja de erradicar también organismos no involucrados (Readman et al. 1993) y el uso indiscriminado de estas pinturas con sustancias de alta toxicidad provoca severos daños al ambiente (Eguía-López, 2000).

Los productos naturales constituyen una alternativa prometedora para el control del *biofouling*. En este sentido, los compuestos de origen marino son de especial interés ya que se producen en el propio entorno oceánico y son fácilmente biodegradables (De Nys y Steinberg, 1999), haciendo más probable encontrar sustancias con actividad *antifouling* y niveles de toxicidad evidentemente más bajos.

Así mismo, una estrategia para el control del *biofouling* es caracterizando biológicamente a las especies que participan en este proceso, con la finalidad de dirigir una solución específica contra los persistentes y lograr inhibir la sucesión de organismos unicelulares y multicelulares.

En el presente estudio se prueba el efecto de extractos contra diatomeas y se caracteriza a las especies que participan en el proceso de *biofouling*, esto para dirigir una solución específica contra los organismos presentes en la zona de prueba y así lograr inhibir la adhesión de organismos unicelulares y por ende los multicelulares

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial de extractos bacterianos como inhibidores del crecimiento de diatomeas bentónicas implicadas en el proceso de formación de *biofouling*.

Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* los extractos que presentan actividad inhibitoria frente a diatomeas implicadas en el proceso de *biofouling*.
2. Identificar mediante taxonomía clásica la composición de diatomeas aisladas en los ensayos *in situ*.
3. Identificar el/los extractos bacterianos más eficientes para controlar el *biofouling*.

METODOLOGÍA

Ensayo en laboratorio (*in vitro*)

Para los ensayos de actividad antimicroalgal se utilizaron 13 extractos previamente obtenidos de bacterias aisladas de diferentes sustratos marinos (tabla I).

Se prepararon soluciones de los extractos en metanol a concentraciones finales de 0.01, 0.1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se tomaron 50 μL de cada una de estas soluciones para colocarlas en placas oscuras de 96 pozos con seis réplicas. Se dejó evaporar el metanol durante 24 horas para obtener sólo el extracto en los pozos. Se realizó la esterilización de las placas con tapa en un gabinete de esterilización UV (Scie-plas GE UVSC) durante 30 minutos antes de ser inoculadas.

Los extractos fueron probados frente a tres cepas microfitobentónicas proporcionadas por el cepario Algobank-Caen (Francia): *Cylindrotheca closterium*, *Halamphora coffaeiformis* y *Navicula jeffreyi* consideradas como formadoras de biofilm. Los cultivos de las diatomeas y los ensayos se mantuvieron en condiciones controladas a 20°C y luz constante (irradiancia incidente: 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los experimentos utilizaron 100 μL de medio de cultivo F2 inoculado con cada una de las microalgas previamente ajustado a una concentración de 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, éstos fueron colocados en las microplacas de 96 pozos conteniendo los extractos a las diferentes

concentraciones, de acuerdo a la metodología descrita por Tsoukatou et al. (2002), se utilizó óxido cuproso como control positivo, metanol con medio F/2 como control negativo y medio F/2 sin inocular como testigo. Después de 48 h se cuantificó la concentración de pigmento con el método fluorométrico; midiendo la fluorescencia (PolarSTAR Optima BMG Labtech; excitación 485 nm, emisión 645 nm) y usando el medio como blanco. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración más baja que produjo una reducción en el crecimiento.

Ensayo en campo (*in situ*)

Con los extractos que tuvieron mejor actividad (siete extractos) en las pruebas con microplacas se realizó un ensayo con geles inertes. Esta técnica consistió en incorporar los extractos en geles los cuales permitieran su solubilidad gradual al medio marino y la fijación de los organismos. Para ello se prepararon las placas de gel en cajas de Petri de 10 centímetros de diámetro, con los diferentes extractos, el control negativo (elaborado con agua desionizada) y el control positivo (al cual se le adicionó óxido cuproso). De todas las placas se realizaron tres réplicas. (Aquí hay 27 cajas de petri?)

Para realizar los geles primeramente se disolvieron 48 g del phytigel en 35 mL de agua desionizada, se calentó hasta hervir y se agitó durante 15 minutos (Chaves, 2003), se dejó enfriar un poco evitando su gelificación y se agregaron los extractos de las bacterias. Antes de colocar las soluciones

de gel en las cajas de Petri se pegó en las cajas un trozo de malla plástica (ver ilustración 1) como soporte para evitar que el gel se desprendiera al colocarlo verticalmente. El gel fue vaciado en las cajas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (Newmark et al. 2005).

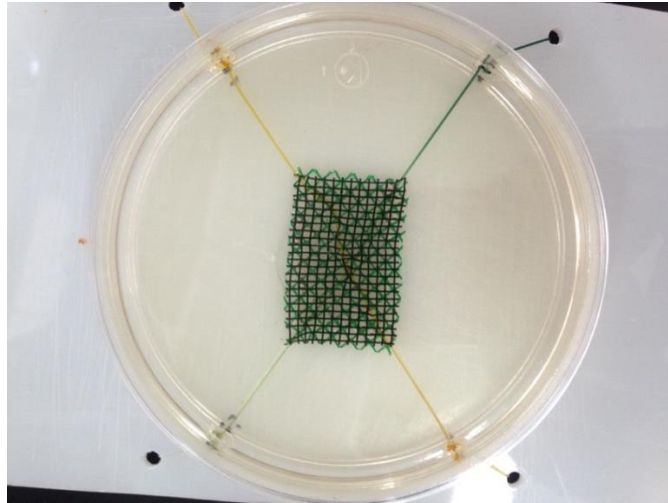


Ilustración 1. Placa de Petri con malla plástica como soporte.

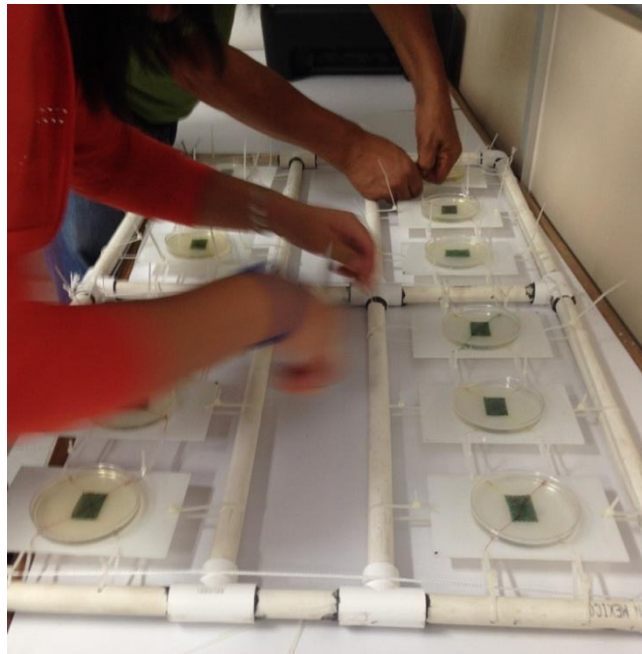


Ilustración 2. Estructura de PVC con placas de Petri conteniendo los extractos.

Los bioensayos se realizaron en el medio natural durante 30 días, en el mes de julio del 2015, utilizando placas de Petri con los geles tratamiento y los controles. Estas placas fueron colocadas al azar en armazones de tubos PVC paralelos entre ellos. Las estructuras se colocaron en el área geográfica de estudio (Ilustración 4), suspendidas a una altura de 40 cm del fondo y las aberturas de las placas fueron orientadas al mismo, tal y como se observa en la Ilustración 3.

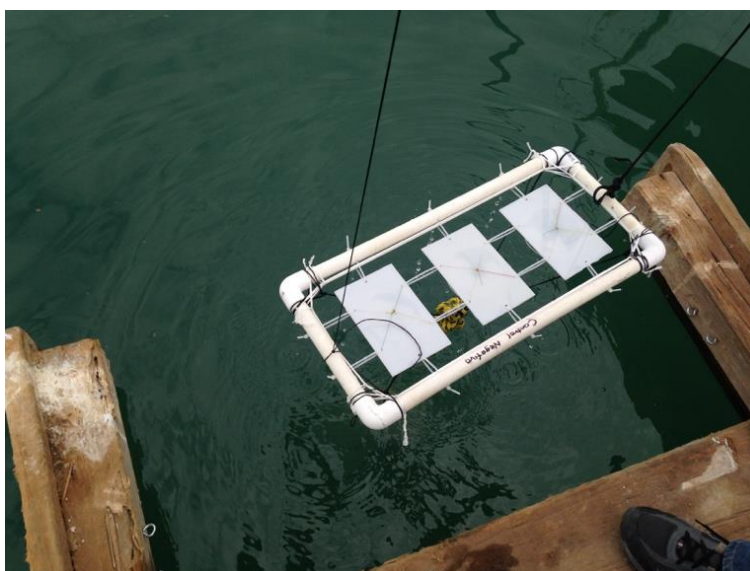


Ilustración 3. Colocación de la estructura de prueba in situ.

Los controles positivos se colocaron a una distancia de aproximadamente 10 m del resto de las placas para que los tratamientos no se vieran afectados o influenciados por la acción inhibidora del cobre.

Área geográfica de estudio

Para la realización del estudio se eligió el área de la marina en La Paz, Baja California Sur, ubicada en la zona del puerto con las siguientes coordenadas geográficas: 24° 9'22.91"N 110°19'40.61"O (lustración 4).

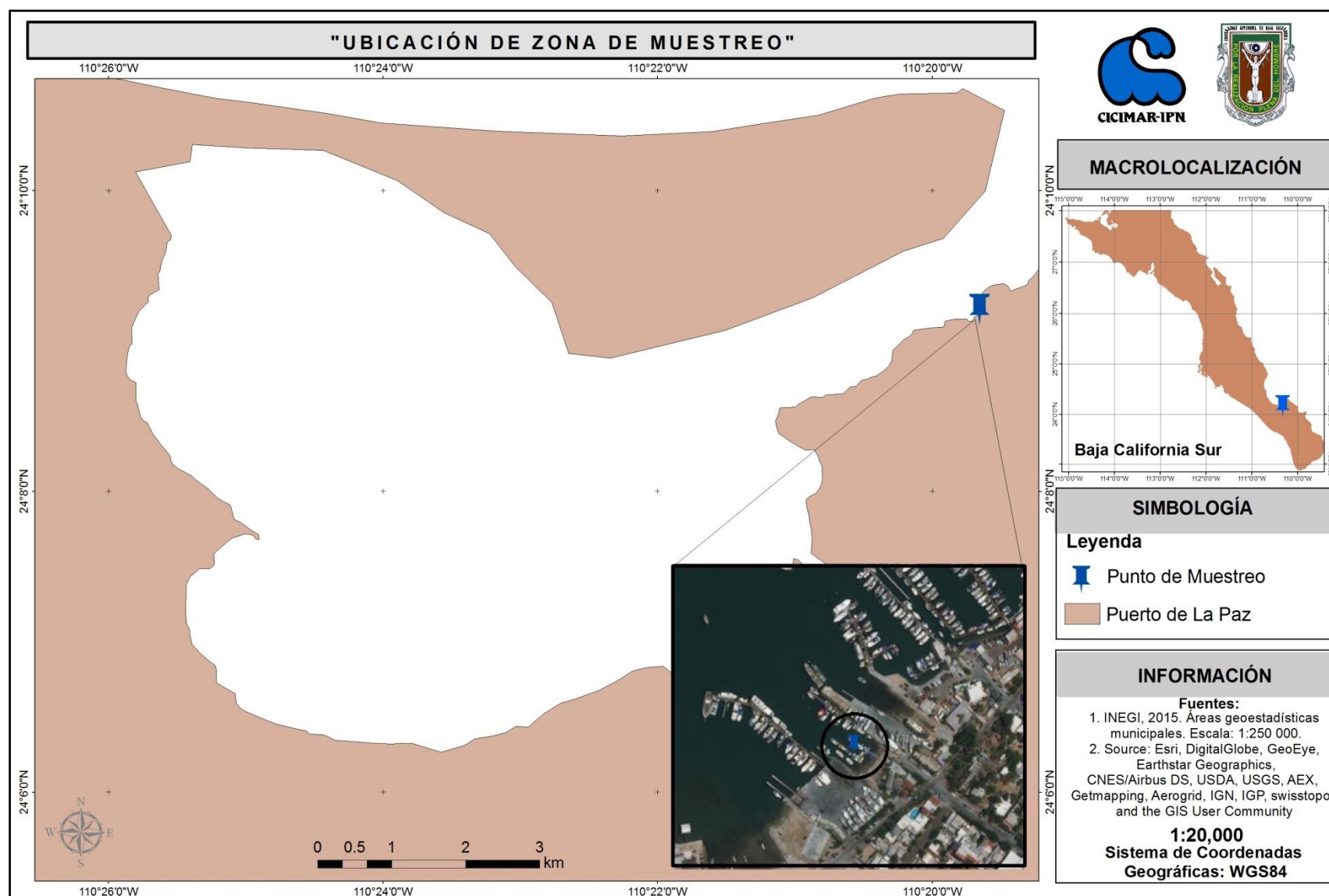


Ilustración 4. Mapa de localización de la zona de muestreo.

La adopción de este sitio como área de estudio se consideró debido a ser una zona representativa del problema que ocasiona el *biofouling* en las embarcaciones, además por su fácil acceso y cercanía con CICIMAR-IPN, encontrándose a sólo 3 km de distancia entre la escuela y la zona de estudio.

Análisis de los datos *in situ*

Las placas fueron retiradas del área de muestreo, y se trasladaron a laboratorio en un recipiente con agua de mar. En ambiente estéril, se enjuagaron con agua destilada para eliminar los organismos que no se encontraban adheridos a ellas. Con la ayuda del programa *Coral Point Count With Excell Extensions* (CPCWEE) se registró la cobertura total que las microalgas representaban en el gel (gráfica 1).

Para cultivar las microalgas de las placas, se hicieron raspados con un hisopo estéril y este se sumergió en tubos con medio F/2 por duplicado, en la tabla I se muestra la denominación que se les dio a las muestras. Se incubaron por siete días bajo condiciones de temperatura y luz constantes (22° C; irradiancia incidente: 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para llevar a cabo posteriormente la identificación de especies (florística).

Extracto	Replica	Replica de replica	Nombre para registro	Extracto	Replica	Replica de replica	Nombre para registro
1	1	1	1 (1-1)	M	1	1	M (1-1)
		2	1 (1-2)			2	M (1-2)
	2	1	1 (2-1)		2	1	M (2-1)
		2	1 (2-2)			2	M (2-2)
	3	1	1 (3-1)		3	1	M (3-1)
		2	1 (3-2)			2	M (3-2)
28	1	1	28 (1-1)	18	1	1	18 (1-1)
		2	28 (1-2)			2	18 (1-2)
	2	1	28 (2-1)		2	1	18 (2-1)
		2	28 (2-2)			2	18 (2-2)
	3	1	28 (3-1)		3	1	18 (3-1)
		2	28 (3-2)			2	18 (3-2)
38	1	1	38 (1-1)	94	1	1	94 (1-1)
		2	38 (1-2)			2	94 (1-2)
	2	1	38 (2-1)		2	1	94 (2-1)
		2	38 (2-2)			2	94 (2-2)
	3	1	38 (3-1)		3	1	94 (3-1)
		2	38 (3-2)			2	94 (3-2)
88	1	1	88 (1-1)	C+	1	1	C+ (1-1)
		2	88 (1-2)			2	C+ (1-2)
	2	1	88 (2-1)		2	1	C+ (2-1)
		2	88 (2-2)			2	C+ (2-2)
	3	1	88 (3-1)		3	1	C+ (3-1)
		2	88 (3-2)			2	C+ (3-2)
CN	1	1	CN (1-1)				
		2	CN (1-2)				
	2	1	CN (2-1)				
		2	CN (2-2)				
	3	1	CN (3-1)				
		2	CN (3-2)				

Tabla I. Registro de muestras provenientes de las placas del ensayo in situ

paa cultivos en tubos con medio F/2.

Proceso de digestión y montado e Identificación florística

Para preparar las muestras para la identificación de las especies diatomeas mediante su morfología; se utilizó el proceso de digestión propuesto por Siqueiros-Beltrones y Voltolina (2000). La digestión se inició con la homogenización vigorosa en vórtex por unos minutos hasta desprender la muestra de las paredes, posteriormente se utilizaron pipetas Pasteur para tomar 0.5 mL de la muestra de cada réplica (por cada extracto por separado) y se colocaron en tubos eppendorf de 5 mL; obteniendo 9 tubos con 3 mL cada uno.

Para eliminar la materia orgánica fuera (materia orgánica e inorgánica) y dentro (cloroplastos) de las diatomeas se agregaron 2 mL de ácido nítrico al 70% en una campana de flujo y se dejó reaccionar por 48 horas, posteriormente se les agregó 1 mL de alcohol al 70% para eliminar toda la materia orgánica, y se dejó reposar 48 horas. Después de este tiempo, se observó que la muestra cambiaba de una coloración verde oscuro a blanco; indicando una la eliminación de toda materia orgánica. Para verificarlo se tomó una gota de muestra y se colocó en un portaobjetos para revisarla en microscopio.

Las muestras de diatomeas limpias se montaron en portaobjetos con resina *ZRAX Diatom mountant de Microlife services*. Estas fueron utilizadas para la identificación de las especies presentes mediante una minuciosa

comparación de las descripciones bibliográficas utilizadas (ver bibliografía utilizada para la identificación).

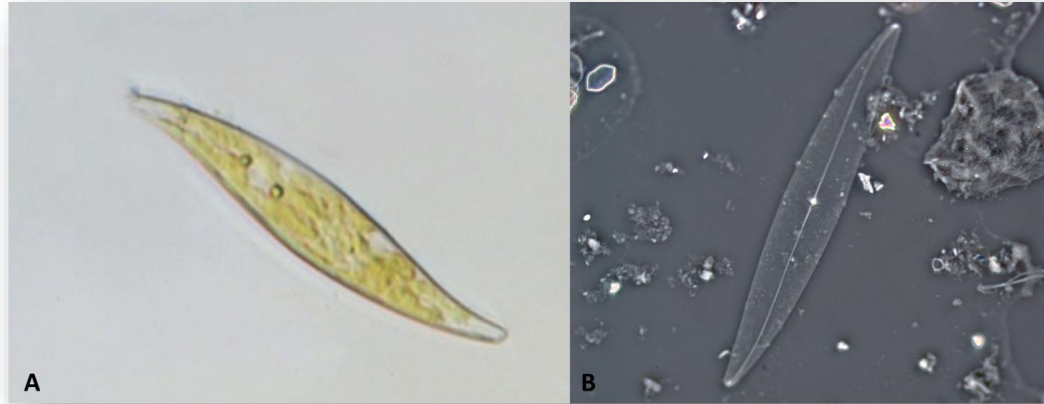


Ilustración 5. Comparación en vista 100 x de una diatomea del género *Pleurosigma* sp., A) *Pleurosigma* sp. viva (Bryant, 2012), B) *Pleurosigma* sp. Después del proceso de digestión y montado.

Método de identificación florística

Para conocer las especies adheridas en los geles con los diferentes extractos, se observaron las laminillas con las muestras fijas en resina. Las observaciones se realizaron en objetivos de 40x y 100x en microscopio *Zeiss*.

Para identificar cada especie de diatomea, se tomaron en cuenta algunas características morfológicas de la frústula, las cuales variaban entre especies, sin embargo, generalmente fueron las siguientes: morfología general de la frústula (pennada, circular, etc.), longitud, ancho del ápice y número de estrías, tecas, partectas o areolas en 10 μm , y número y

posición del nódulo apical. Dependiendo del género al que perteneciera se tomaron otros aspectos como: diámetro (para el caso de las diatomeas centrales), número y forma de esternón, o simplemente su morfología a simple vista al microscopio. La taxonomía se realizó apegado lo más posible a lo establecido por Round et al. (1990). Las características cualitativas fueron comparadas en diversas fuentes bibliográficas para llegar a la identificación taxonómica.

De las observaciones anteriormente mencionadas, se realizó una base de datos con registro fotográfico, medidas, número de foto, y extractos en los que se presentaba cada especie observada (tabla III). Las fotografías fueron tomadas con varias cámaras y programas.

Bibliografía utilizada para la identificación

Para la identificación taxonómica se utilizaron las siguiente referencias bibliográficas: Foged (1975), Foged (1984), Hustedt (1930), Hustedt (1955), Hustedt (1959), Hustedt (1961-66), López-Fuerte et al. (2010), Moreno et al. (1996), Navarro (1982), Navarro y Torres (1987), Peragallo y Peragallo (1908), Siqueiros-Beltrones (2002) y Witkowski et al. (2000). Para la verificación de los nombres taxonómicos y de los datos de identificación, se utilizaron las bases de datos en línea: AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2016) y www.marinespecies.org

RESULTADOS

Ensayos *In vitro*

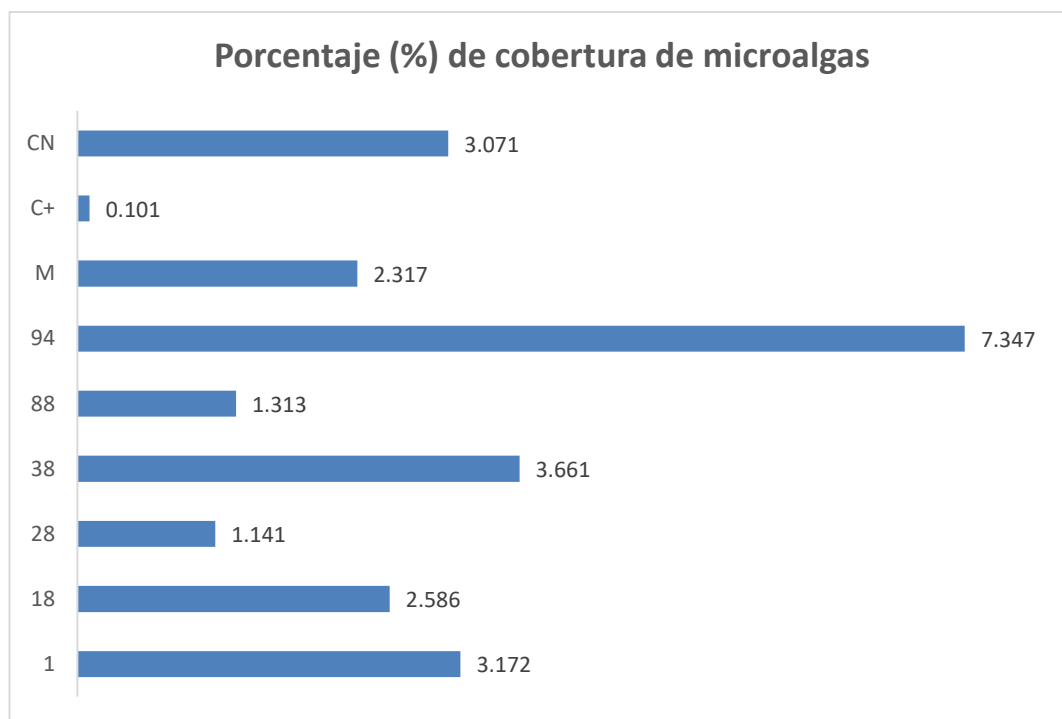
Los resultados *in vitro* de la actividad antimicroalgal de los extractos bacterianos mostraron que todos tuvieron efecto inhibidor a la máxima concentración probada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), sin embargo, solo siete fueron activos a concentraciones menores a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ como se muestra en la Tabla II marcados con asterisco (*), por lo que fueron seleccionados para continuar con los ensayos *in situ*. El extracto C2 a pesar de presentar actividad inhibitoria a bajas concentraciones no fue considerado ya que en ensayos frente a artemia, realizados a la par de este trabajo, se encontró que es tóxico (Rico-Virgen, en preparación).

Extracto / Cepa	<i>Cylindrotheca closterium</i>	<i>Halamphora coffeaeformis</i>	<i>Navicula jeffreyi</i>
1 / <i>Bacillus licheniformis</i> *	10	0.1	1
2 / <i>B. safensis</i>	10	10	50
C2 / <i>B. safensis</i> (ac)	10	0.1	0.01
18 / <i>Shewanella algae</i> *	0.1	1	0.01
47 / <i>B. niabensis</i>	50	50	10
88 / <i>Pseudoalteromonas rutherica</i> *	1	50	0.1
38 / <i>B. subtilis</i> *	1	1	0.01
39 / <i>B. pumilus</i>	50	50	1
40 / <i>B. licheniformis</i>	50	50	10
28 / <i>Staphylococcus</i> sp. *	0.1	0.01	0.1
121 / <i>Staphylococcus</i> sp.	50	50	1
94 / <i>Marinobacter</i> sp. *	1	50	0.1
Mix / (<i>B. subtilis</i>, <i>B. pumilus</i>, <i>B. licheniformis</i>) *	50	1	0.01

Tabla II. Actividad antifouling in vitro de los extractos obtenidos de bacterias marinas frente a microalgas formadoras de biofilm (CMI $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las cepas marcadas con (*) fueron las seleccionadas.

Ensayos *In situ*

Al realizar el análisis de coberturas de microalgas con el programa CPCWEE (Gráfica 1), se observó que las placas con el extracto 94 fueron las de mayor porcentaje, con un 7.34% de cobertura total, mientras que el control negativo (CN) alcanzó solamente un 3.07%. Por otro lado, los tres con menor presencia de microalgas fueron los tratamientos con los extractos 28, 88 y M, con un 1.14%, 1.31% y 2.31% respectivamente. Cabe destacar que el control positivo fue altamente activo, mostrando solo 0.1% de cobertura.



Gráfica 1. Cobertura representada por las microalgas sobre las placas en las pruebas *in situ*.

Una vez realizada la identificación de diatomeas en los tubos con medio F/2 se identificaron en total 69 especies de diatomeas (tabla III), pertenecientes a 29 familias, 22 órdenes y 3 clases (tabla IV) según la clasificación taxonómica actualizada en la página web www.algaebase.org.

El género con mayor número de especies fue *Nitzschia* con nueve especies encontradas en las nueve superficies, en donde *Nitzschia lorenziana* fue la que se presentó en todas las superficies. Le sigue el género *Campylodiscus* con 4 especies, siendo *Campylodiscus ambiguus* el que se presentó en todos los tratamientos con extracto.

En cuanto a los tratamientos con los extractos y los controles se encontraron diferencias en la diversidad de especies (tabla III). *Amphora* sp., *Nitzschia longissima*, *N. lorenziana*, *Pleurosigma* sp. 2, *Psammodictyon punctata* var. *coartata* y *Thalassiosira dicipiens* se presentaron en todos los tratamientos con extracto, mientras que *Nitzschia frustulum*, *N. sigma*, *Petrodictyon gemma* y *Plagiotropis longa* se presentaron exclusivamente en el control negativo. *Delphineis surirella* var. *australis* y *Petroneis granulata* únicamente se encontraron en las placas con el extracto M y *Rhoicosigma oceanicum* fue observada únicamente en la del extracto 94. El resto de las diatomeas se registraron en al menos dos tratamientos con extractos.

Respecto a la diversidad de familias, Bacillariaceae obtuvo el mayor porcentaje de recurrencia con un 19% del total (gráfica 3), seguido por la familia Naviculaceae con 10% y Surirellaceae con un 9%, todas las demás sólo se presentan una vez, por lo que en la gráfica 3 se juntaron, representando el 25%. Y la clase con mayor presencia fue la Bacillariophyceae con un 52%.

FAMILIA	ESPECIE	EXTRACTOS									
		2 8	9 4	1 8	M	8 8	3 8	1	C +	C N	
Achnanthaceae	<i>Achnanthes brevipes</i> var. <i>angustata</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
Hemidiscaceae	<i>Actinocyclus octanarius</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
Heliopeltaceae	<i>Actinoptychus senarius</i>	1	1	1	0	0	1	0	1	1	
Catenulaceae	<i>Amphora biggiba</i> var. <i>interrupta</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
Catenulaceae	<i>Amphora decussata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
Catenulaceae	<i>Amphora</i> sp.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Ardissoneaceae	<i>Ardissonea formosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Eupodiscaceae	<i>Auliscus sulptus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Bacillariaceae	<i>Bacillaria socialis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
Naviculaceae	<i>Caloneis liber</i> var. <i>linearis</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
Surirellaceae	<i>Campylodiscus ambiguus</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
Surirellaceae	<i>Campylodiscus fastuosus</i>	1	0	1	0	0	0	1	1	1	
Surirellaceae	<i>Campylodiscus parvulus</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
Surirellaceae	<i>Campylodiscus simulans</i>	0	1	0	1	0	0	1	0	0	
Ulnariaceae	<i>Catacombas gaillonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Cocconeidaceae	<i>Cocconeis distants</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Cocconeidaceae	Cocconeis sp.	1	0	1	0	0	0	0	1	1	
Stephanodiscaceae	<i>Cyclotella atomus</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
Stephanodiscaceae	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
Rhaphoneidaceae	<i>Delphineis surirella</i> var. <i>australis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Plagiogrammaceae	<i>Dimerogramma minus</i>	1	1	1	0	1		1	1	1	
Diploneidaceae	<i>Diploneis suborbicularis</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
Entomoneidaceae	<i>Entomoneis alata</i>	1	0	0	1	1	0	1	0	1	

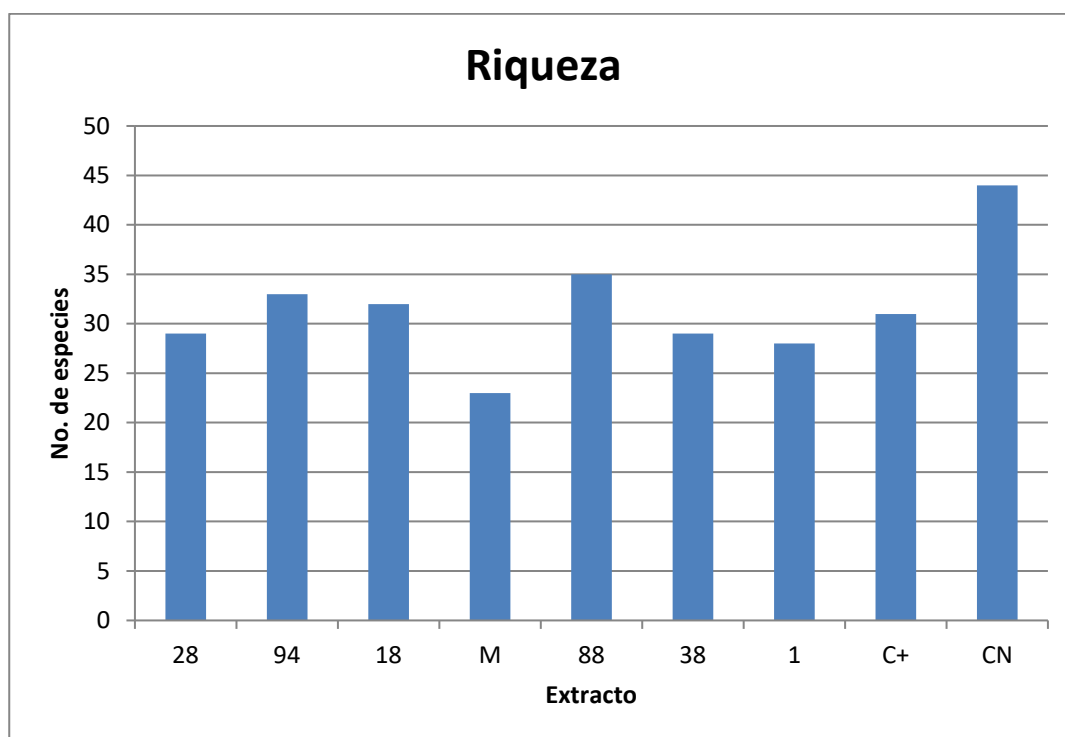
Eupodiscaceae	<i>Eupodiscus radiatus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sellaphoraceae	<i>Fallacia nummularia</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Grammatophoraceae	<i>Grammatophora marina</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Ulnariaceae	<i>Hyalosynedra laevigata</i>	0	1	1	0	1	0	1	1	1
Lyrellaceae	<i>Lyrella irrorata</i>	1	0	0	0	1	1	0	1	1
Mastogloiaceae	<i>Mastogloia sp.</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	
Naviculaceae	<i>Navicula arenaria</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1
Naviculaceae	<i>Navicula flagellifera</i>	0	1	1	1	1	1	0	0	1
Naviculaceae	<i>Navicula sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bacillariaceae	<i>Nitzschia capitellata c.f.</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Bacillariaceae	<i>Nitzschia closterium</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Bacillariaceae	<i>Nitzschia frustulum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bacillariaceae	<i>Nitzschia hybrida</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	0
Bacillariaceae	<i>Nitzschia lanceolata</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1
Bacillariaceae	<i>Nitzschia longissima</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bacillariaceae	<i>Nitzschia lorenziana</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bacillariaceae	<i>Nitzschia lorenziana</i> var. <i>incerta</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Bacillariaceae	<i>Nitzschia sigma</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	1
Eupodiscaceae	<i>Odontella turgida</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Fragilariaceae	<i>Opephora burchardtii c.f.</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Paraliaceae	<i>Paralia sulcata</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	1
Rhaphoneidaceae	<i>Perissonoë cruciata</i>	0	1	0	0	0	0	1	1	0
Berkeleyaceae	<i>Parlibellus hagelsteinii</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Surirellaceae	<i>Petrodictyon gemma</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lyrellaceae	<i>Petroneis granulata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Plagiotropidaceae	<i>Plagiotropis longa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pleurosigmataceae	<i>Pleurosigma formosum</i>	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Pleurosigmataceae	<i>Pleurosigma sp. 1</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Pleurosigmataceae	<i>Pleurosigma sp. 2</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hyalodiscaceae	<i>Podosita stelliger</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Bacillariaceae	<i>Psammodictyon bombiforme</i>	0	1	1	1	1	1	1	0	1
Bacillariaceae	<i>Psammodictyon panduriforme c.f.</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Bacillariaceae	<i>Psammodictyon punctata var. coartata</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pleurosigmataceae	<i>Rhoicosigma oceanicum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Rhopalodiaceae	<i>Rhopalodia musculus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Naviculaceae	<i>Rhopalodia pacifica</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	0
Naviculaceae	<i>Seminavis eulensteinii cf.</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Naviculaceae	<i>Seminavis strigosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	<i>Sp. 1</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Surirellaceae	<i>Surirella fastuosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Surirellaceae	<i>Surirella sp.</i>	0	1	1	0	1	1	1	0	1
Thalassiosiraceae	<i>Thalassiosira diciptiens</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Triceratiaceae	<i>Triceratium dictyotum</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Triceratiaceae	<i>Triceratium dubium</i>	1	0	1	1	1	0	0	1	1
Bacillariaceae	<i>Tryblionella hungarica</i>	0	0	1	1	1	1	1	0	1
Eupodiscaceae	<i>Zygoceros rhombus</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	Total por extracto	2 8	3 3	3 2	2 3	3 5	2 9	2 7	3 1	4 4
	TOTAL CONJUNTO EN LOS EXTRACTOS	69								

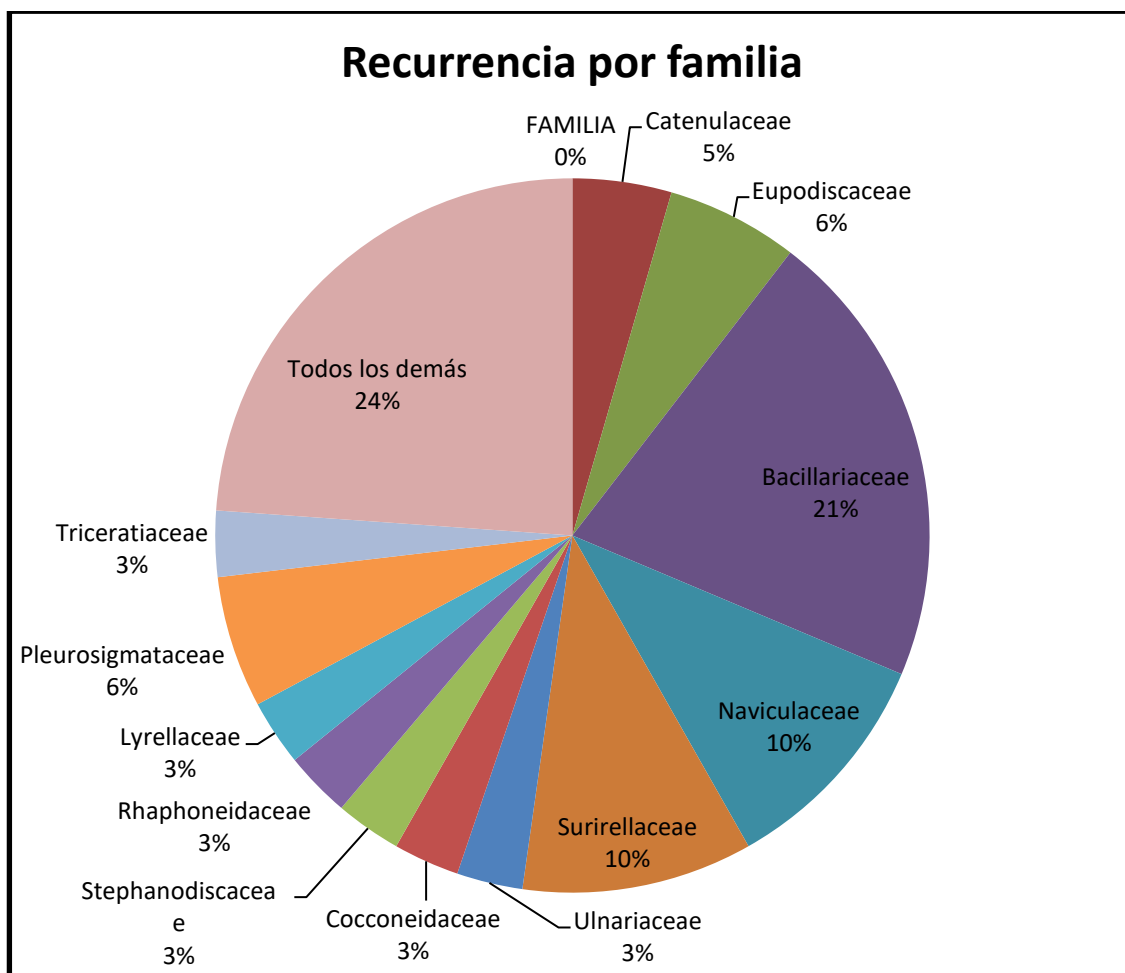
Tabla III. Especies de diatomeas encontradas en las superficies con incorporación de los 9 diferentes tratamientos de los ensayos *In Situ*.

El control negativo presentó el mayor número de especies, con una riqueza de 44 especies, seguido de las placas con los extractos 88 y 94. Y el tratamiento que presentó el menor número de especies fue el M, con solo

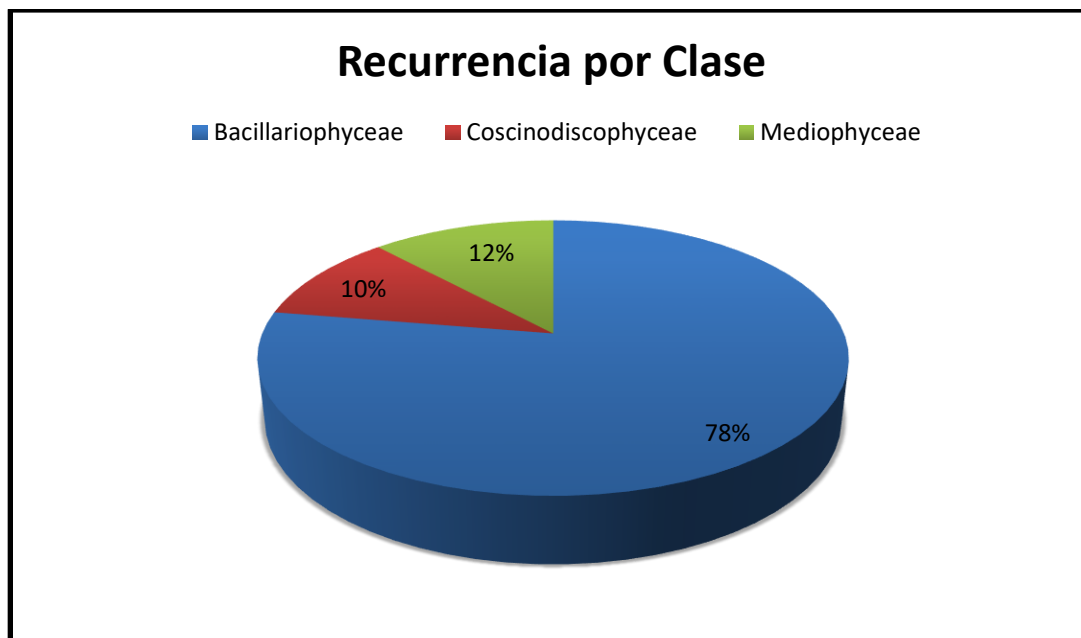
23 especies presentes, en segundo lugar el 1 con 28 especies y en tercero el 28 con 29 especies encontradas.



Gráfica 2. Riqueza específica de diatomeas en los diferentes tratamientos de los experimentos *In Situ*. C+= control positivo, CN= control negativo.



Gráfica 3. Representación en porcentaje del total de las familias con mayor recurrencia



Gráfica 4. Recurrencia del total de las clases en los ensayos *In Situ*.

Taxonomía y florística

Se presenta el registro de 69 especies observadas, fotografiadas y medidas. Se lograron identificar 58 a nivel de especie, 6 a nivel de género, 1 sin identificar (Sp. 1) y 4 identificadas a nivel de especie, pero que se deben corroborar (c.f.). Las estructuras que más ayudaron para identificar las especies fueron la cantidad de estrías, la dirección de éstas, el ancho y largo de la valva y por supuesto la morfología (pennada o central). Algunas especies concordaban con las descripciones de las referencias de forma muy similar o igual, sin embargo, otras resultaron más complejas, ya fuera por la posición en la que se encontraba la diatomea (que no podía

visualizarse bien) o por la falta de referencias que describieran las características de la especie.

La identificación de diatomeas consta de un compilado de imágenes, y un listado organizado por orden alfabéticamente que muestra la información tomada para la identificación de cada especie.

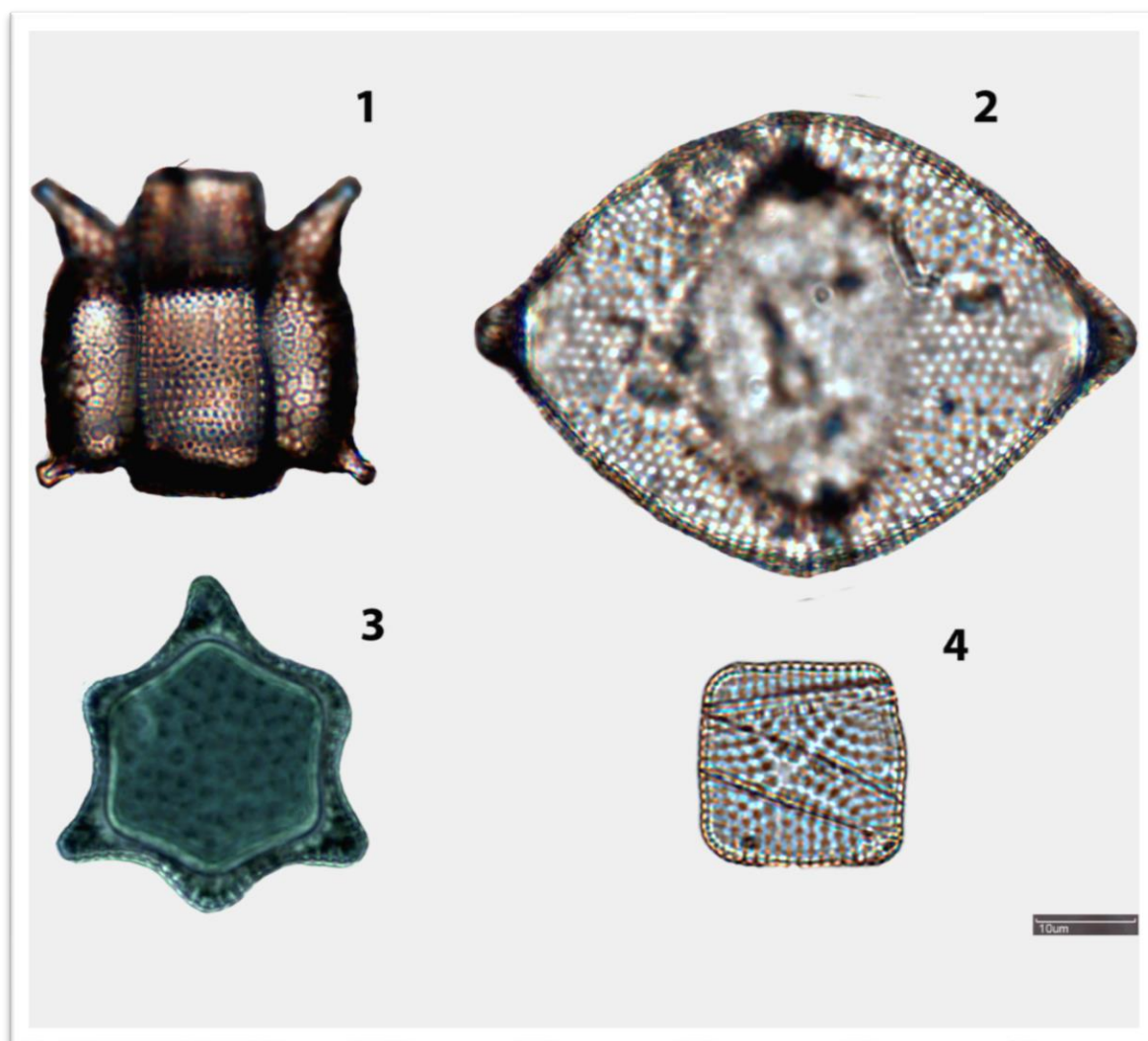


Figura 1-4. Laminilla 1. 1) *Triceratium dictyotum*, 2) *Zygodontos rhombus*, 3) *Triceratium dubium*, 4) *Perissodonta cruciata*.

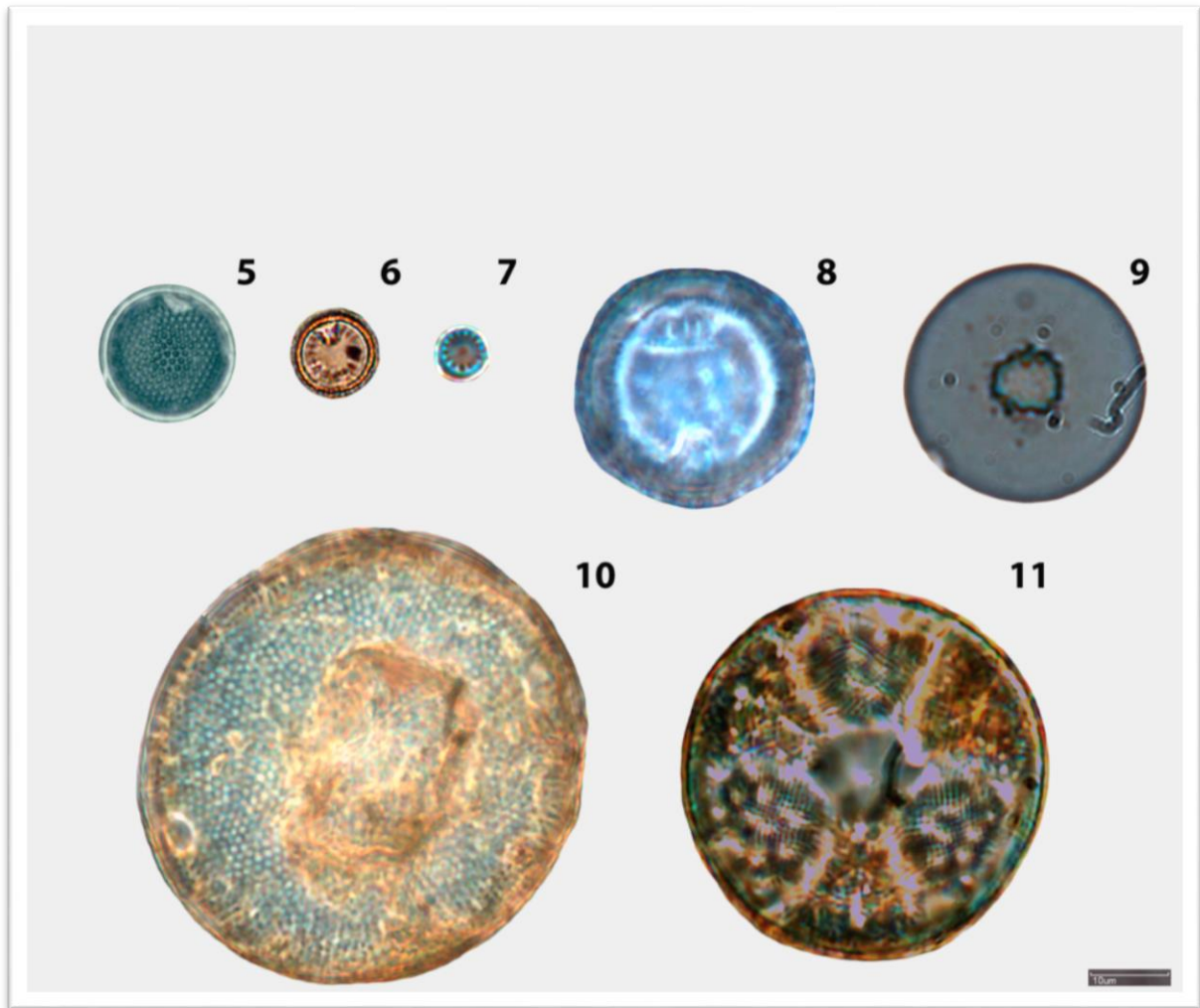


Figura 5-11. Laminilla 2. 5) *Thalassiosira dicipiens*, 6) *Cyclotella menenghiana*, 7) *Cyclotella atomus*, 8) *Paralia sulcata*, 9) *Podosira stelliger*. 10) *Actinocyclus octanarius*, 11) *Actinocyclus senarius*.

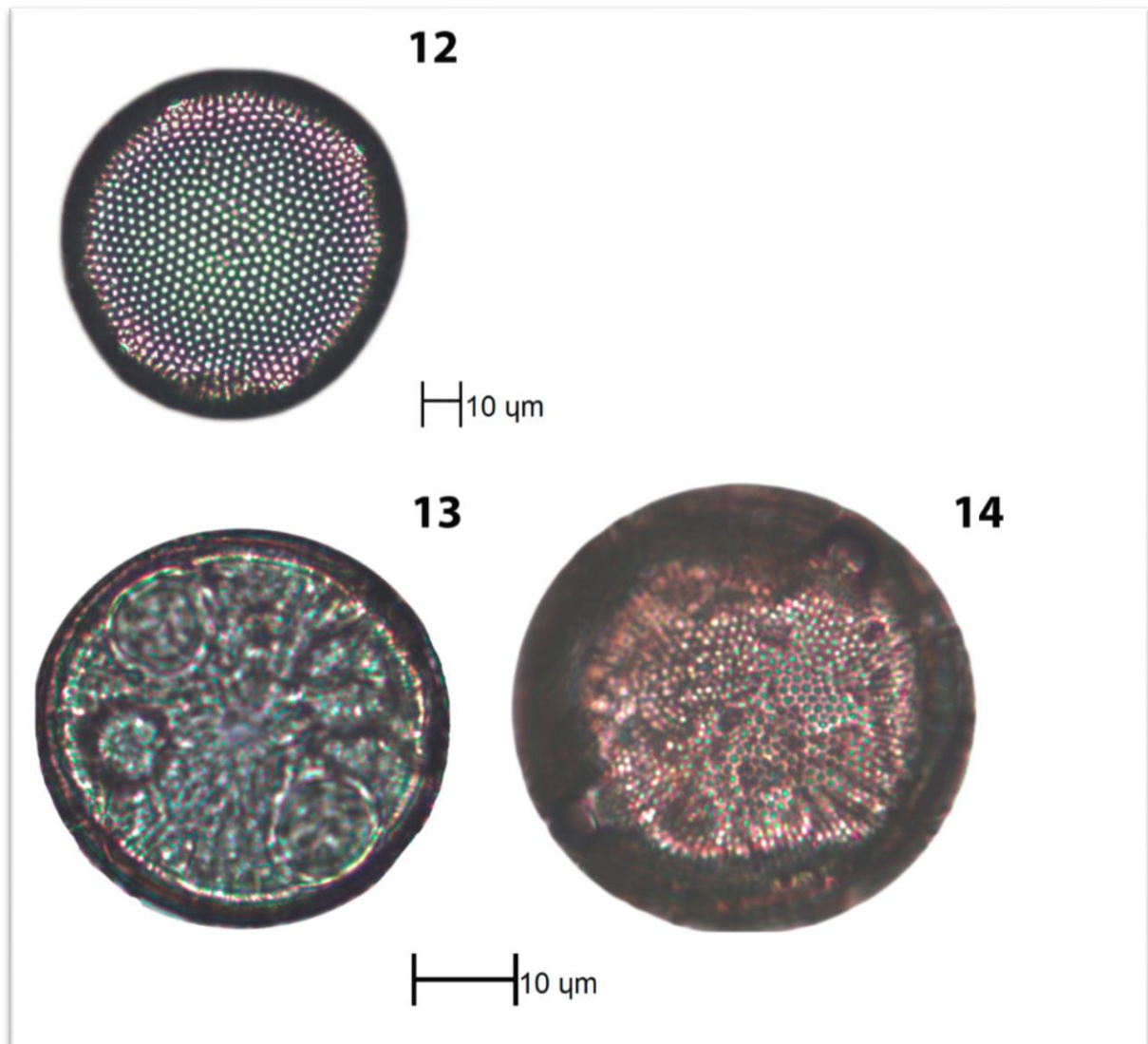


Figura 12-14. Laminilla 3. 12) *Eupodiscus radiatus*, 13) *Auliscus sulptus*, 14) *Odontella turgida*.

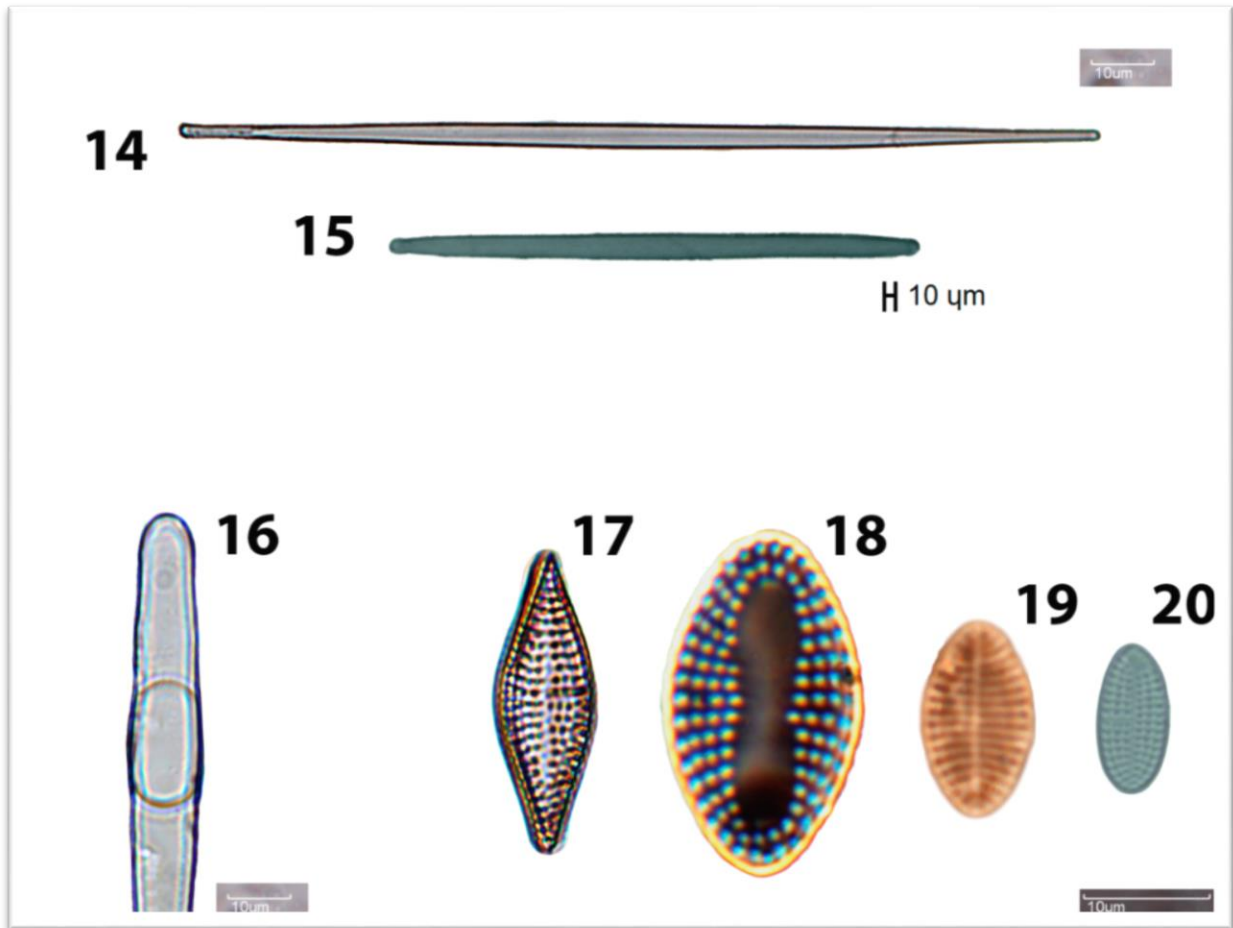


Figura 12-20. Laminilla 4. 14) *Hyalosynedra laevigata*, 15) *Ardissonaea Formosa*, 16) *Grammatophora marina*, 17) *Dimerogramma minus*, 18) *Delphineis surirella* var. *Australis*, 19) *Cocconeis* sp., 20) *Cocconeis distantis*.

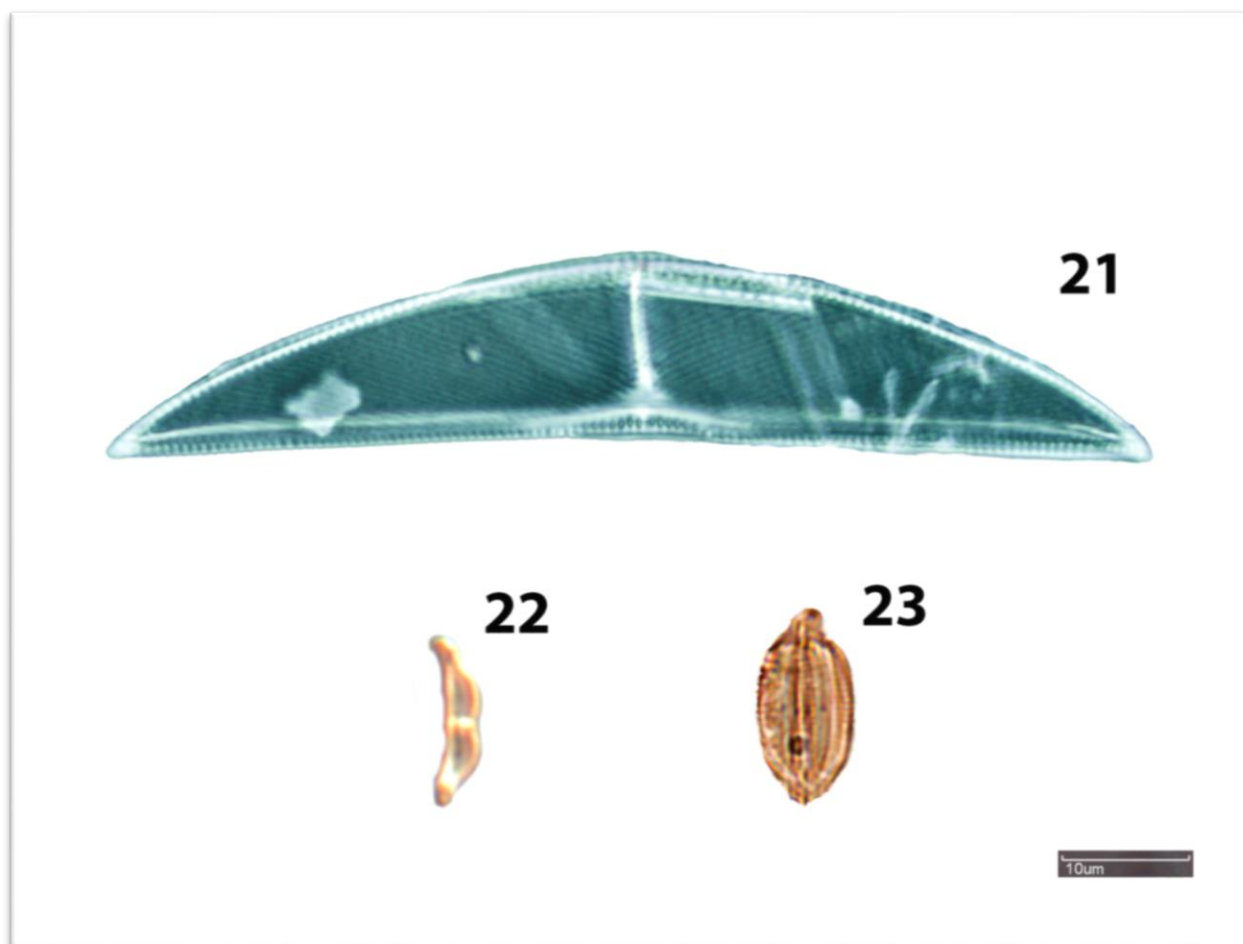


Figura 21-23. Laminilla 5. 21) *Amphora decusata*, 22) *Amphora biggiba* var. *Interrupta*, 23) *Amphora* spp.

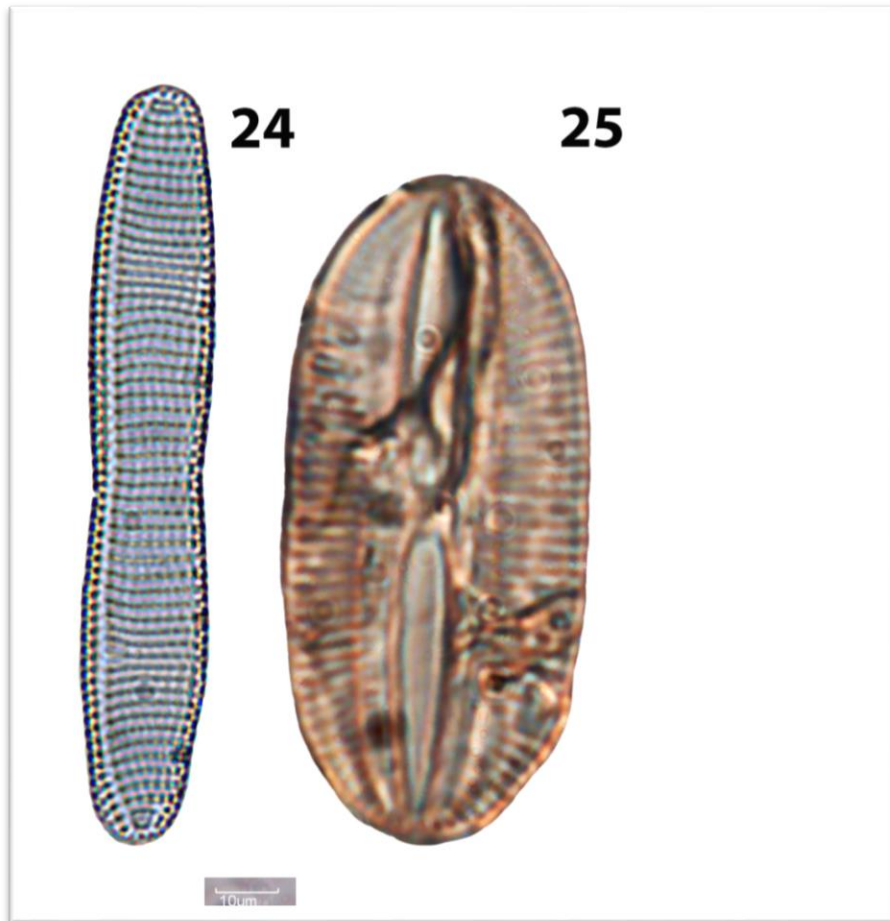


Figura 24-25. Laminilla 6. 24) *Achnanthes brevipes* var. *angustata*, 25) *Diploneis suborbicularis*

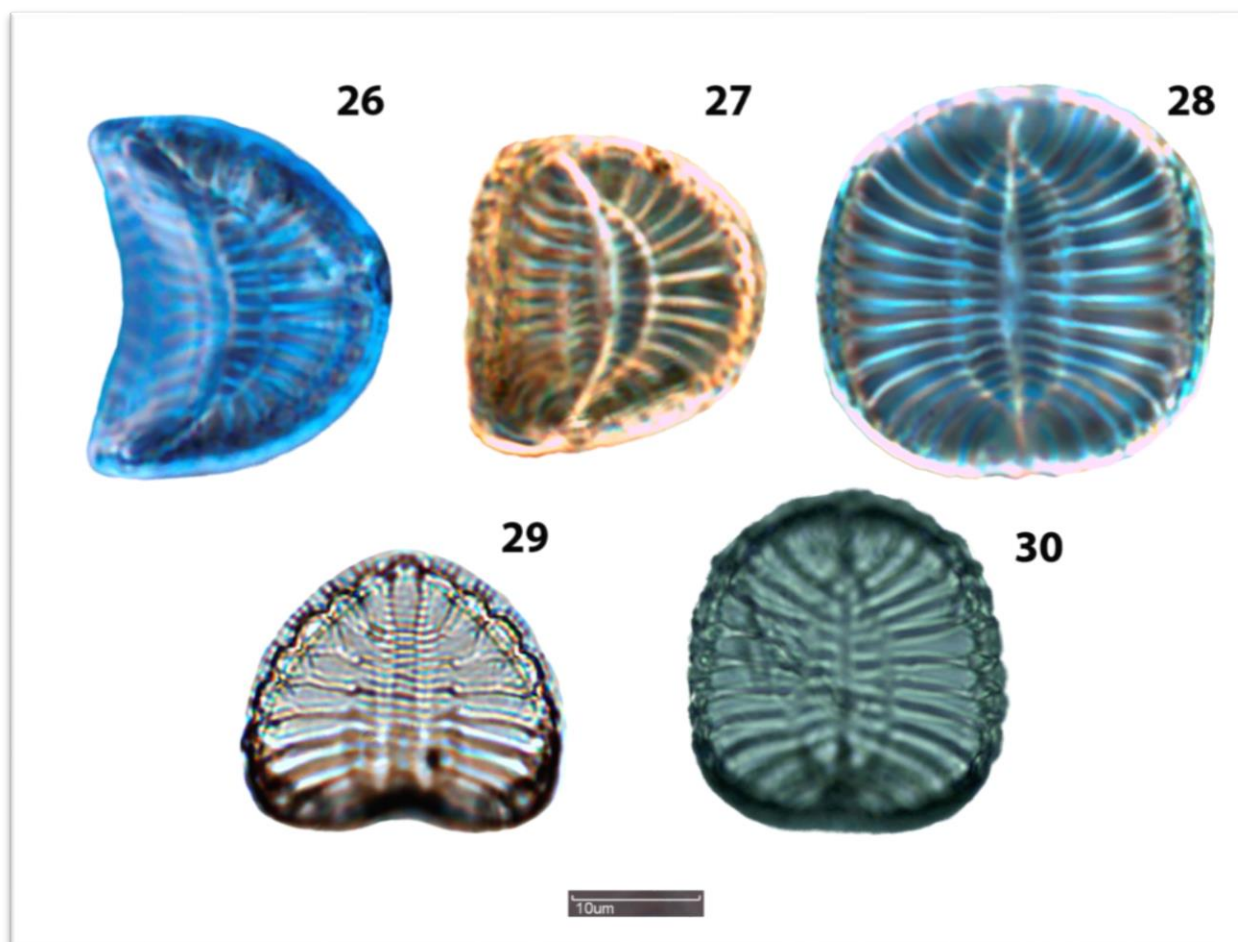


Figura 26-30. Laminilla 7. 26) *Campylodiscus ambiguus*, 27-28) *Campylodiscus fastuosus*, 29) *Campylodiscus simulans*, 30) *Camoylodiscus parvulus*,

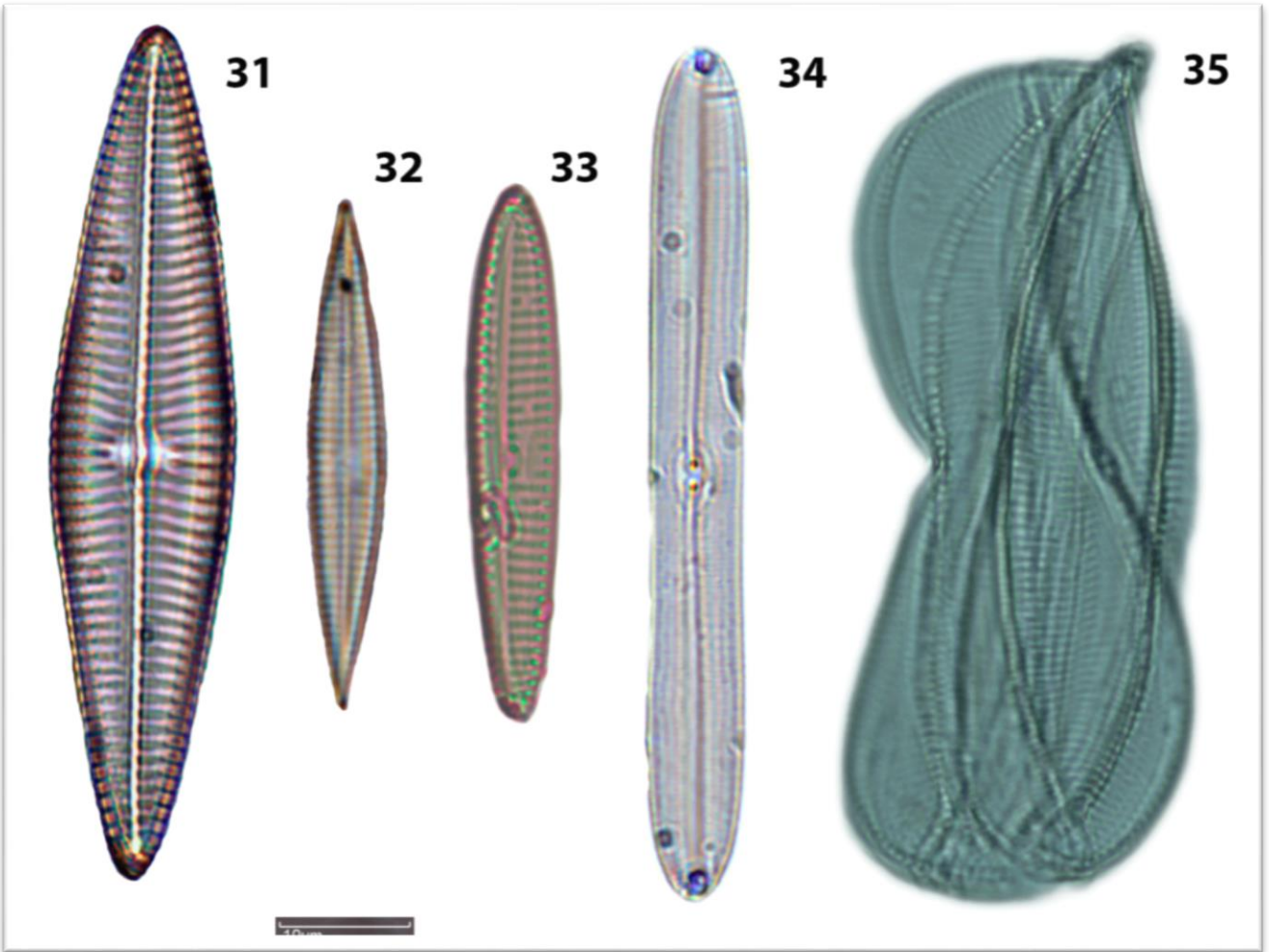


Figura 31-35. Laminilla 8. 31) *Navicula arenaria*, 32) *Navicula flagellifera*, 33) *Navicula* sp., 34) *Caloneis liber* var. *linearis*, 35) *Entomoneis alata*

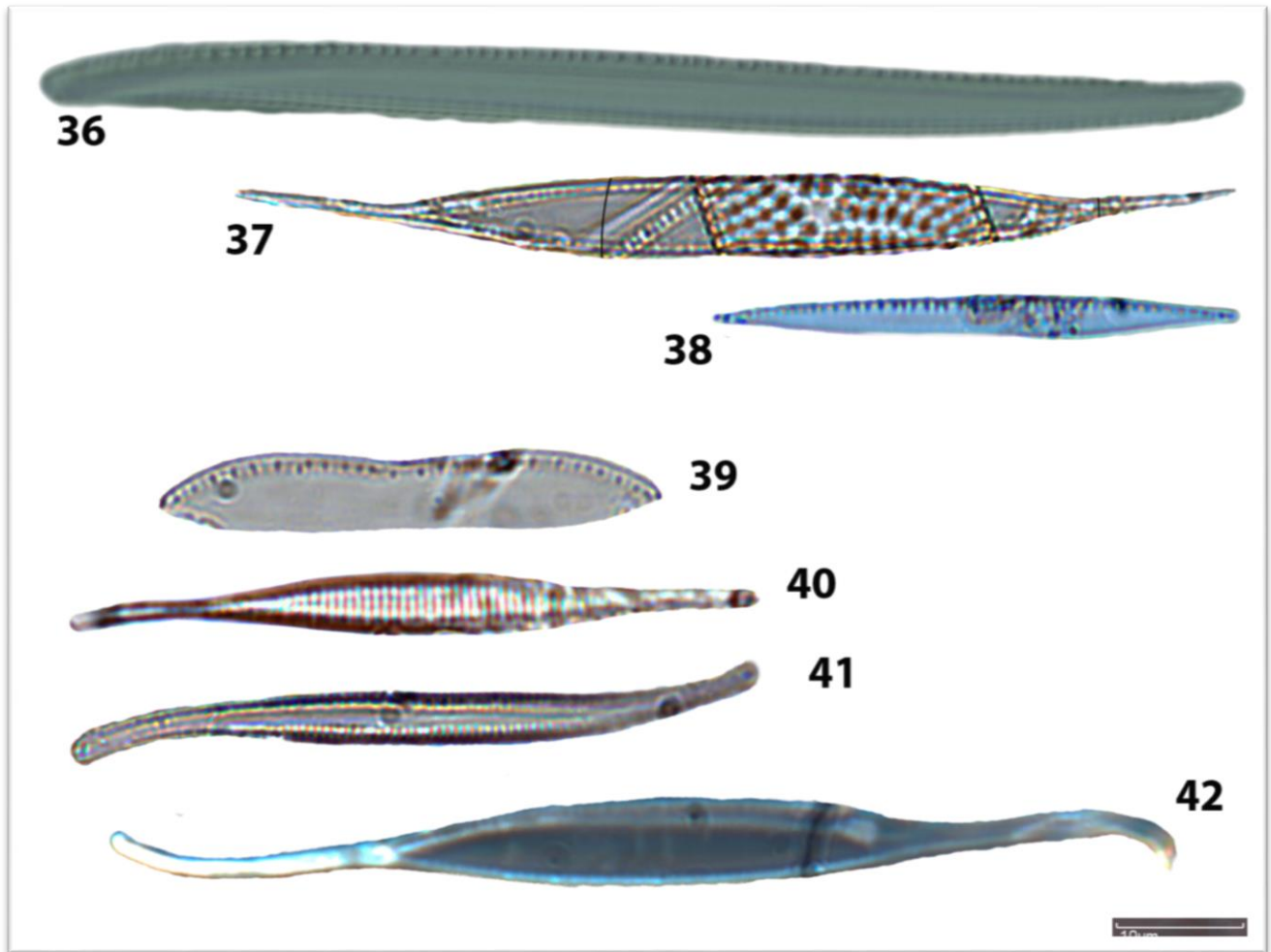


Figura 36-42. Laminilla 9. 36) *Nitzschia sigma*, 37) *Nitzschia closterium*, 38) *Nitzschia capitellata* c.f., 39) *Nitzschia hybrida*, 40-41) *Nitzschia lorenziana*, 42) *Nitzschia incerta*

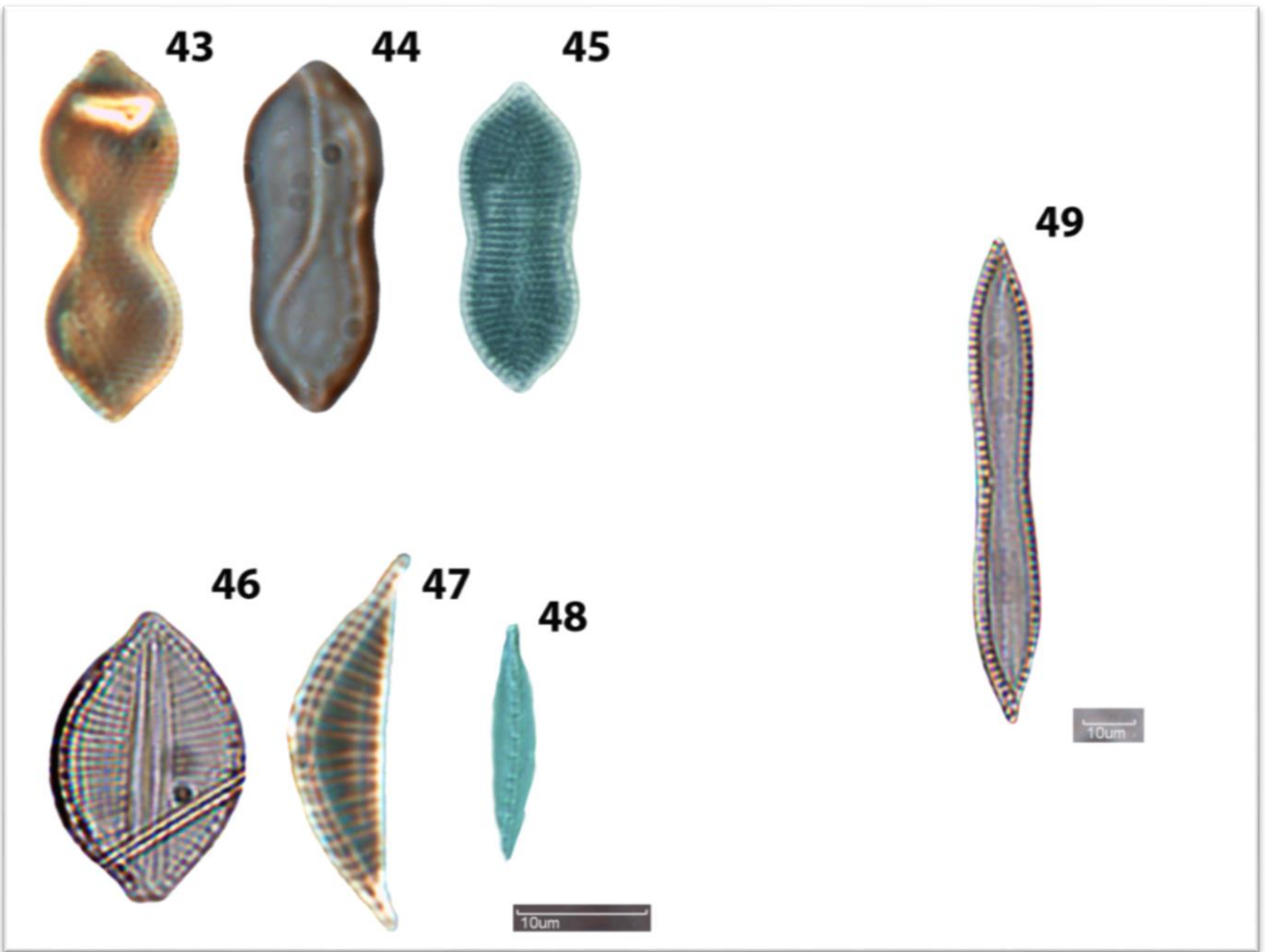


Figura 43-493. Laminilla 10. 43) *Psamodictyon bombiforme*, 44) *Psamodictyon panduriforme* c.f., 45) *Psamodictyon punctata* var. *coartata*, 46) *Rophalodia musculus* (con *hepiteca* e *hipoteca*), 47) *Rophalodia pacifica*, 48) *Sp.1*, 49) *Tryblionella hungarica*.

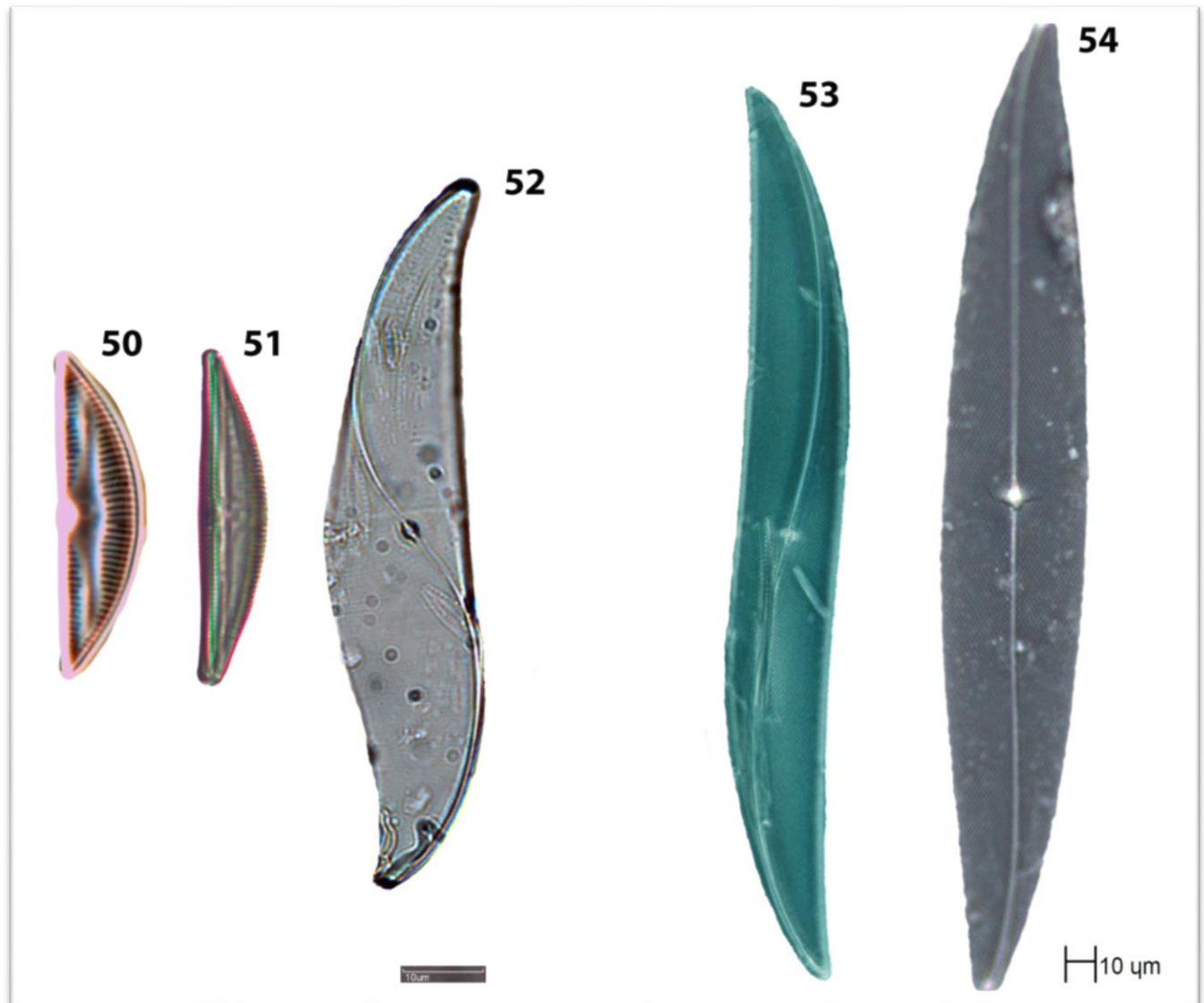


Figura 40-54. Laminilla 11. 50) *Seminavis strigosa*, 51) *Seminavis euleinstenii* cf., 52) *Rhoicosigma oceanicum*, 53) *Pleurosigma formosum*, 54) *Pleurosigma* sp.2.

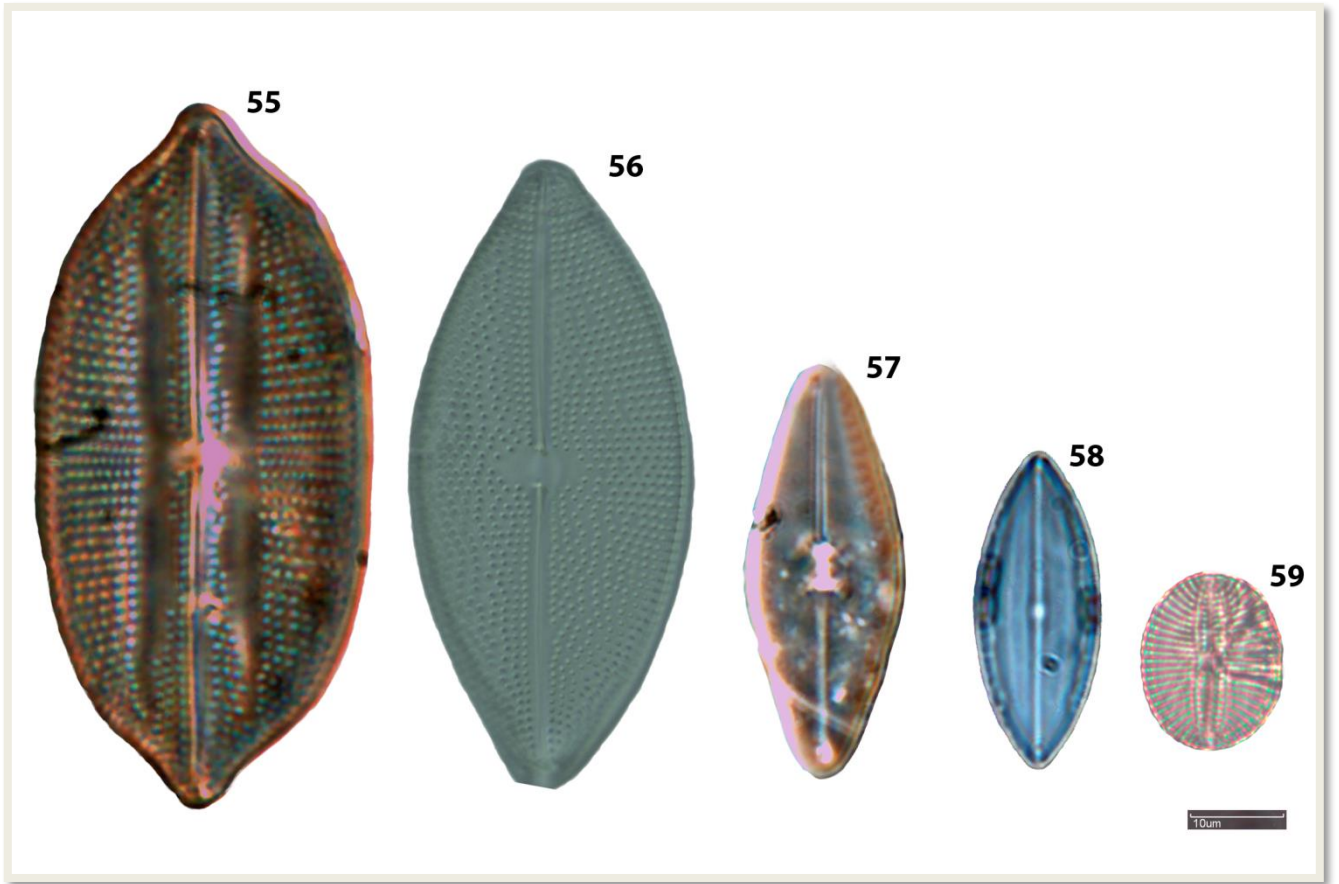


Figura 55-59. Laminilla 12. 55) *Lyrella irrorata*, 56) *Petroneis granulata*, 57) *Parlibellus hagelsteinii*, 58) *Mastogloia* sp., 59) *Fallacia nummularia*.

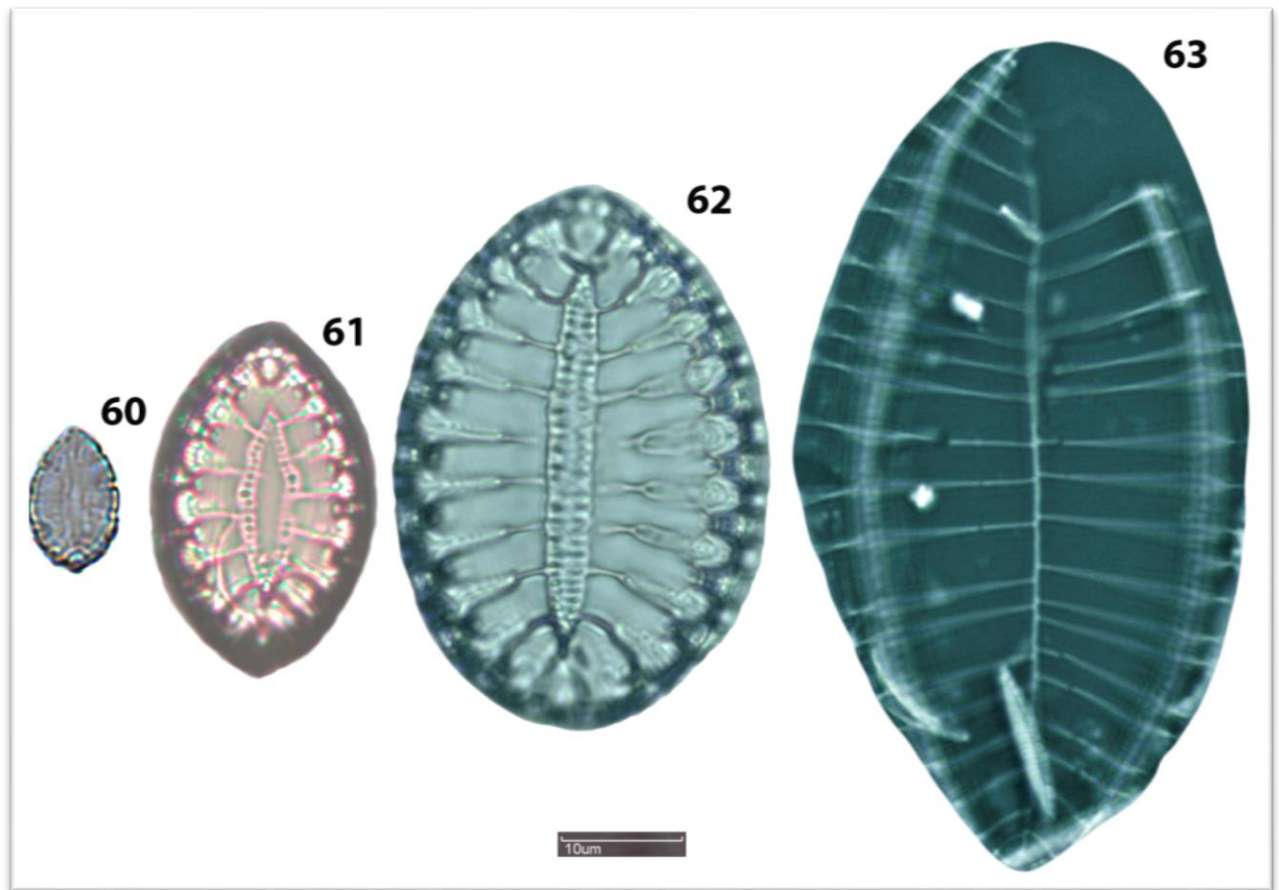


Figura 60-63. Laminilla 13. 60) *Surirella* sp., 61-62) *Surirella fastuosa*, 63) *Petrodictyon gemma*.

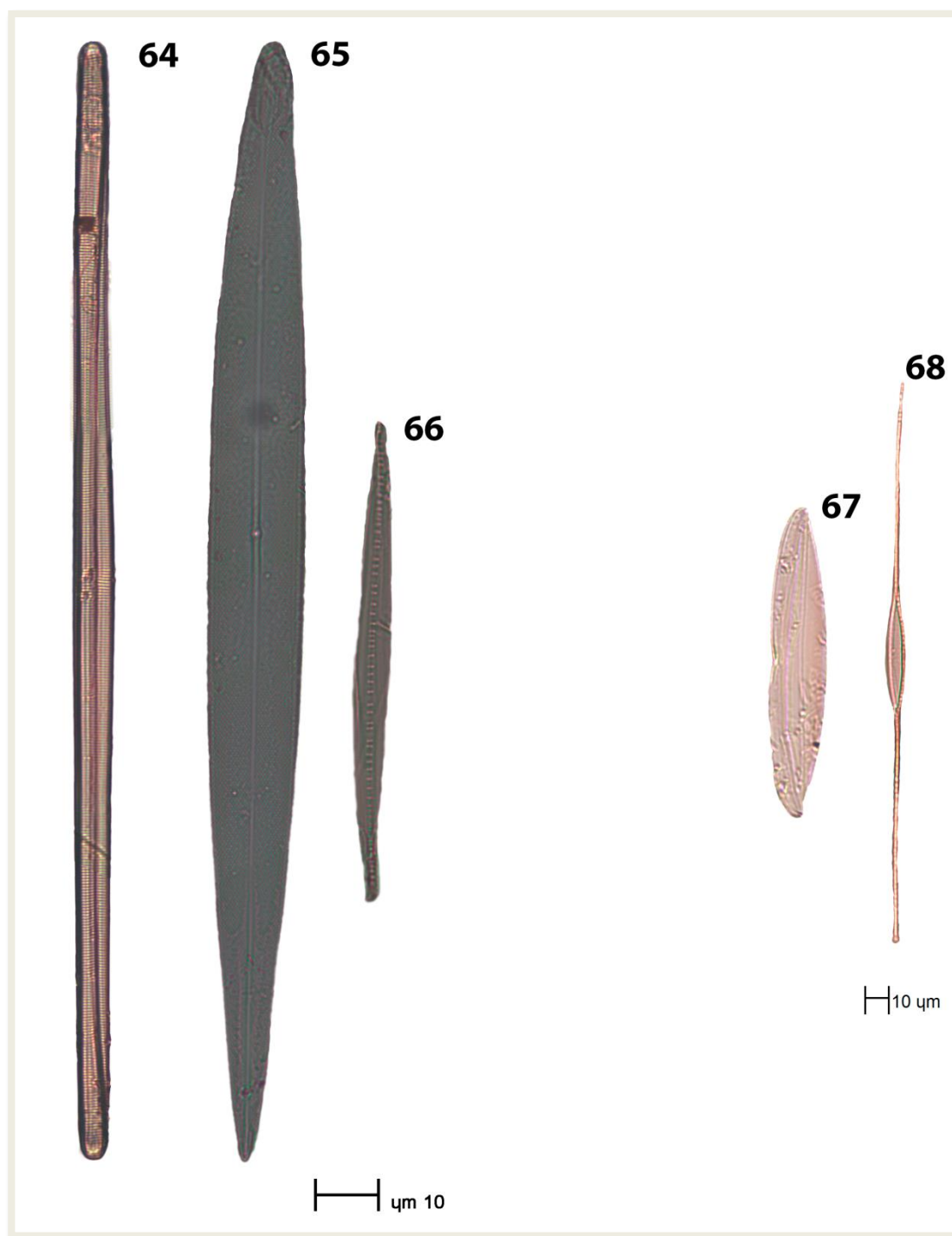


Figura 64-68. Laminilla 14. Especies extra grandes, tomadas por partes a 100x y unidas. 64) *Catacombas gaillonii*, 65) *Pleurosigma* sp 1, 66) *Bacillaria socialis*, 67) *Plagiotropis longa*, 68) *Nitzschia longissima*.

Descripción

***Achnanthes brevipes* var. *angustata* (Greville) Cleve (Figura 24)**

Dimensiones: 60.6 μm de largo, 8.3 μm de ancho y 8 estrías en 10 μm .

***Actinocyclus octanarius* Ehrenberg (Figura 10)**

Dimensiones: 56.5 μm de diámetro.

***Actinoptychus senarius* (Ehrenberg) Ehrenberg (Figura 11)**

Dimensiones: 48 μm de diámetro.

***Amphora biggiba* var. *interrupta* (Grunow) Cleve (Figura 22)**

Dimensiones: 51.3 μm de largo, 4.8 μm de ancho y 14 estrías en 10 μm .

***Amphora decussata* Grunow (Figura 21)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Amphora* sp. (Figura 23)**

Dimensiones: de 14.7 μm a 15 μm de largo, de 4.3 μm a 4.5 μm de ancho y 22 estrías en 10 μm .

***Ardissonea formosa* (Hantzsch) Grunow (Figura 15)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Auliscus sculptus* (W.Smith) Brightwell (Figura 13)**

Dimensiones: 40. 6 μm de diámetro.

***Bacillaria sociales* (Gregory) Ralfs (Figura 66)**

Dimensiones: De 79.2 a 149.1 μm de largo, de 6.2 a 9.5 μm de ancho y 8 estrías al centro, con 18 apicales en 10 μm .

***Caloneis liber* var. *linearis* Cleve (Figura 34)**

Dimensiones: 68.2 μm de largo, 8.7 μm de ancho y 22 estrías en 10 μm .

***Campylodiscus ambiguus* Greville (Figura 26)**

Dimensiones: 25.1 μm de diámetro.

***Campylodiscus fastuosus* Ehrenberg (Figura 27 y 28)**

Dimensiones: de 21 a 25 μm de diámetro.

***Campylodiscus parvulus* W.Smith (Figura 30)**

Dimensiones: 25. 9 μm de diámetro.

***Campylodiscus simulans* Gregory (Figura 29)**

Dimensiones: 23 μm de diámetro.

***Catacombas gaillonii* (Bory) D.M.Williams & Round (Figura 64)**

Dimensiones: 444.7 μm de largo, 19.3 μm de ancho y 24 estrías.

***Cocconeis distants* (Figura 20)**

Dimensiones: 11.9 μm de largo, 5.3 μm de ancho y 15 estrías en 10 μm .

***Cocconeis sp.* (Figura 19)**

Dimensiones: 15.3 μm de largo, 8.8 μm de ancho y 13 estrías en 10 μm

***Cyclotella atomus* Hustedt (Figura 7)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Cyclotella meneghiniana* Kützinger (Figura 6)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Delphineis surirella* var. *australis* (Petit) Navarro (Figura 18)**

Dimensiones: 27.8 μm de largo, 15.6 μm de ancho y 8 areolas en 10 μm .

***Dimeregramma minus* (W.Gregory) Ralfs (Figura 17)**

Dimensiones: 23.3 μm de largo, 4.5 μm de ancho y 11 areolas en 10 μm .

***Diploneis suborbicularis* (Gregory) Cleve (Figura 25)**

Dimensiones: 54.7 μm de largo, 24.7 μm de ancho y 8 estrías en 10 μm .

***Entomoneis alata* (Ehrenberg) Ehrenberg (Figura 35)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Eupodiscus radiatus* Bailey (Figura 12)**

Dimensiones: 91.5 μm de diámetro y 5 areolas en 10 μm .

***Fallacia nummularia* (Greville) D.G.Mann (Figura 59)**

Dimensiones: 20 μm de largo, 15.2 μm de ancho y 11 estrías en 10 μm .

***Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützing (Figura 16)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Hyalosynedra laevigata* (Grunow) D. M. Williams & Round (Figura 14)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Lyrella irrorata* (Greville) D. G. Mann (Figura 55)**

Dimensiones: 76.1 μm de largo, 36.7 μm de ancho y 8 areolas en 10 μm .

***Mastogloia spp.* (Figura 58)**

Dimensiones: De 33.9 μm a 43.4 μm de largo, 13.4 μm a 17.7 μm de ancho, 29 estrías en 10 μm y 9 partectas.

***Navicula arenaria* Donkin (Figura 31)**

Dimensiones: 66 μm de largo, 15.3 μm de ancho y 8 estrías en 10 μm .

***Navicula* sp. (Figura 33)**

Dimensiones: 41.2 μm de largo, 7.9 μm de ancho y 10 estrías en 10 μm .

***Navicula flagellifera* Hustedt (Figura 32)**

Dimensiones: 38.6 μm de largo, 6.6 μm de ancho y 12 estrías en 10 μm .

***Nitzschia capitellata* c.f. (Figura 38)**

Dimensiones: 41.4 μm de largo, 3.3 μm de ancho y de 12 a 13 fíbulas en 10 μm .

***Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith (Figura 37)**

Dimensiones: 64.2 μm de largo, 5.7 μm de ancho y 14 fíbulas en 10 μm .

***Nitzschia frustulum* (Kützinger) Grunow**

Sin registro de foto y medidas. Observada en microscopio por única vez.

***Nitzschia hybrida* Grunow (Figura 39)**

Dimensiones: 39.3 μm de largo, 5.7 μm de ancho y 9 fíbulas en 10 μm .

***Nitzschia lanceolata* W. Smith**

Sin registro de foto y medidas. Observada en microscopio por única vez.

***Nitzschia longissima* (Brébisson) Ralfs (Figura 68)**

Dimensiones: 231.4 μm de largo, 7.3 μm de ancho y 9 estrías en 10 μm .

***Nitzschia lorenziana* Grunow (Figuras 40 y 41)**

Dimensiones: 53.6 μm de largo, 4.5 μm de ancho y 18 estrías 10 μm .

***Nitzschia incerta* (Grunow) M.Peragallo (Figura 42)**

Dimensiones: 87.4 μm de largo, 6.5 μm de ancho y 13 fíbulas en 10 μm .

***Nitzschia sigma* (Kützing) W. Smith (Figura 36)**

Dimensiones: 85.8 μm de largo, 5.9 μm de ancho y 9 estrías en 10 μm .

***Odontella turgida* (Ehrenberg) Kützing (Figura 14)**

Dimensiones: 45.7 μm de diámetro y 10 areolas en 10 μm .

***Opephora burchardtia* c.f. Witkowski**

Sin registro de foto y medidas. Observada en microscopio por única vez.

***Paralia sulcata* (Ehrenberg) Cleve (Figura 8)**

Dimensiones: 31.4 μm de diámetro.

***Parlibellus hagelsteinii* E.J. Cox (Figura 57)**

Dimensiones. 44.7 μm de largo y 17.2 μm de ancho.

***Perissonoë cruciata* (Janisch & Rabenhorst) Andrews & Stoelzel
(Figura 4)**

Dimensiones: 19.9 μm de largo y 8 areolas en 10 μm .

***Petrodictyon gemma* (Ehrenberg) D. G. Mann (Figura 63)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Petroneis granulata* (J. W. Bailey) D. G. Mann (Figura 56)**

Dimensiones: 59.3 μm de largo, 28.5 μm de ancho y 10 areolas en
10 μm

***Plagiotropis longa* (Cleve) Kuntze (Figura 67)**

Dimensiones: 128.8 μm de largo, 22.3 μm de ancho y 8 estrías en 10
 μm .

***Pleurosigma formosum* W.Smith (Figura 53)**

Dimensiones: 250.1 μm de largo, 28 μm de ancho y 16 estrías en 10
 μm .

***Pleurosigma* sp. 1 (Figura 65)**

Dimensiones: 205.5 μm de largo, 17.5 μm de ancho y 20 estrías en 10 μm .

***Pleurosigma* sp. 2 (Figura 54)**

Dimensiones: 120 μm de largo y 16.8 μm de ancho.

***Podosira stelligera* (J. W. Bailey) A. Mann (Figura 9)**

Dimensiones: 31.5 μm de diámetro.

***Psammodictyon bombiforme* (Grunow) D. G. Mann (Figura 43)**

Dimensiones: 29.3 μm de largo, 6.4 μm de ancho en la parte central y 16 areolas en 10 μm .

***Psammodictyon panduriforme* c.f. (W.Gregory) D.G.Mann (Figura 44)**

Dimensiones: 27.3 μm de largo y 8.9 μm de ancho.

***Psammodictyon puntata* var. *Coartata* D. G. Mann (Figura 45)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Rhoicosigma oceanicum* H.Peragallo (Figura 52)**

Dimensiones: 88.9 μm de largo, 18.4 μm de ancho y 20 estrías en 10 μm .

***Rhopalodia musculus* (Kützing) Otto Müller (Figura 46)**

Dimensiones: 21.7 μm de largo, 14.9 μm de ancho con las dos valvas juntas, 7 μm de ancho en cada valva y 14 costillas en 10 μm .

***Rhopalodia pacifica* Krammer (Figura 47)**

Dimensiones: 28.4 μm de largo, 7 μm de ancho y 10 costillas en 10 μm .

***Seminavis eulensteinii* c.f. (Grunow) D.B.Danielidis, K.Ford & D.Kennett (Figura 51)**

Dimensiones: 41.3 μm de largo, 9.6 μm de ancho y 17 estrías en 10 μm .

***Seminavis strigosa* (Hustedt) Danieledis & Economou-Amilli (Figura 50)**

Dimensiones: 40.1 μm de largo, 9.7 μm de ancho y 13 estrías en 10 μm .

Sp. 1 (Figura 48)

Dimensiones: de 16 a 22 μm de largo, 3.6 μm de ancho, 6.9 partectas y 16 estrías.

***Surirella fastuosa* (Ehrenberg) Ehrenberg (Figuras 61 y 62)**

Dimensiones: De 29.7 μm a de largo y 19.5 μm a de ancho.

***Surirella* sp. (Figura 60)**

Dimensiones: 12.1 µm de largo y 8.2 µm de ancho.

***Thalassiosira decipiens* (Grunow ex Van Heurck) E.G.Jørgensen
(Figura 5)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Triceratium dictyotum* P.A.Sims & R.Ross (Figura 1)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Triceratium dubium* Brightwell (Figura 3)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Tryblionella hungarica* (Grunow) Frenguelli (Figura 49)**

Sin medida. Identificada por aspectos morfológicos.

***Zygoceros rhombus* Ehrenberg (Figura 2)**

Dimensiones: 66.5 µm de largo y 46.2 µm de ancho.

DISCUSIÓN

Ensayos *In vitro*

Los extractos que presentaron mayor inhibición de las cepas a erradicar fueron los obtenidos de las siguientes bacterias:

- ✓ *Bacillus licheniformis* (1)
- ✓ *B. subtilis* (38)
- ✓ *Shewanella algae* (18)
- ✓ *Pseudoalteromonas rutherica* (88)
- ✓ *Staphylococcus sp.* (28)
- ✓ *Marinobacter sp.* (94)
- ✓ *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* (M)

Las cepas de *Bacillus licheniformis* y *B. pumilus* también fueron probadas *in vitro* por Devendra et al. (2013), concluyendo que la primera demostraba propiedades antibióticas muy potentes, en cuanto a la segunda, reportó que era muy efectiva para evitar los asentamientos bacterianos. En general, reportó que los compuestos derivados del género *Bacillus sp.* resultaban eficaces para inhibir las biopelículas bacterianas.

El género *Pseudoalteromonas* con anterioridad fue probado por Klein et al. (2011), quienes reportaron las propiedades de inhibición contra

biopelículas, sin embargo, también indicaron no haber obtenido buenos resultados al probarlos contra bacterias planctónicas.

Es importante señalar que las cepas de *Cylindrotheca closterium*, *Halamphora coffaeiformis* y *Navicula jeffreyi*, utilizadas para poner a prueba los extractos, no fueron identificadas en este estudio, a pesar de que *Cylindrotheca closterium* y *Halamphora coffaeiformis* sí han sido registradas por López-Fuerte y Siqueiros-Beltrones (2016) en las costas del norte de México. Es contundente probar preferentemente los extractos M y 28 contra cepas locales que estén asociadas al *biofouling* encontradas en este estudio, estas pueden ser: *Amphora spp.*, *Nitzschia longissima*, *N. lorenziana*, *Pleurosigma sp. 2*, *Psammodictyon punctata var. Coartata* y *Thalassiosira dicipiens*, que fueron las especies más frecuentes en las pruebas *in situ*.

Ensayos *In situ*

Los extractos naturales son una fuente prometedora para evitar el proceso de *biofouling*, no son tóxicas y son biodegradables. Basados en los resultados obtenidos al realizar las pruebas *in vitro*; ocho extractos presentaron una actividad inhibitoria a bajas concentraciones.

Categorías taxonómicas: riqueza y recurrencia

Según los resultados, de las 69 diatomeas clasificadas en todos los extractos seis fueron recurrentes registrándose en todos los tratamientos, estas especies fueron: *Amphora spp.*, *Nitzschia longissima*, *N. lorenziana*, *Pleurosigma spp.*, *Psammodictyon punctata var. coartata* y *Thalassiosira diciptiens*. Dos especies más se observaron en ocho de los nueve tratamientos, estas fueron: *Cyclotella meneghiniana* y Sp. 1. De las primeras cinco especies nombradas pertenecen a formas pennadas, mientras que sólo la última es central, coincidiendo con lo dicho por Mitbavkar y Chandrashekar (2006) al mencionar que las formas pennadas son las que predominan en la formación de *fouling* al tener características que las centrales no presentan, según Lee et al. (2000) y coincidiendo también con el porcentaje de recurrencia de las clases encontradas, al ser la clase Bacilariophyceae la de mayor presencia con un 58%, grupo de mayor presencia en el desarrollo de biopelículas en otros estudios, como el de Xu et al. (2012), mientras que Coscinodiscophyceae y Mediophyceae en conjunto solo alcanzan un 22%.

Los géneros identificados como epibiontes en este estudio: *Amphora* y *Nitzschia* también fueron mencionados como poblaciones epibiontes por Characklis y Cooksey (1983), Cooksey et al. (1984), Mitbavkar y Anil (2002, 2004, 2005), Patil y Anil (2000, 2005^{a, c}), estos fueron los géneros con más especies encontradas, sin embargo, también el género *Campylodiscus* fue

de los más recurrentes, género que junto con *Amphora* fueron dos de las 16 especies destacadas en los trabajos de Martínez-Rodríguez et al. (2014), los cuales coincidieron con los de Licea et al. (2011) para el sur del Golfo de México.

Especie	Extracto								
	28	94	18	M	88	38	1	C+	CN
<i>Amphora spp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Cyclotella meneghiniana*</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>Nitzschia longissima</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Nitzschia lorenziana</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Psammodictyon punctata</i> var. <i>coartata</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Thalassiosira dicipiens</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pleurosigma sp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Sp. 1*</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla IV. Especies más recurrentes en las pruebas In situ. Las marcadas con (*) no se presentan en un tratamiento. 1=Presencia y 0=Ausencia

A pesar de la dominancia de unas cuantas especies de diatomeas bentónicas, estas pueden resultar ser efímeras debido a los cambios cortos en las condiciones ambientales (Cook y Whipple, 1982). Para corroborar las especies anuales dominantes se deben realizar otros estudios *in situ* en otras estaciones del año, pues de acuerdo con Siqueiros-Beltrones (2002) la distribución espacial y temporal de las diatomeas determinan a su vez la distribución de otros microorganismos, como bacterias, hongos, microfauna, meiofauna y macrofauna, siendo una pieza clave en la formación de la comunidad bentónica.

Cobertura e identificación florística

El análisis de coberturas de microalgas prueba que los extractos 28 (*Staphylococcus sp.*), 88 (*Pseudoalteromonas rutherfordia*) y M (*B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis*) han sido los tres extractos más eficientes al tener menos biomasa que los demás. Y una vez realizada la identificación florística de los cultivos crecidos en medio F/2, el M y 28 siguieron siendo de los primeros tres extractos con mayor eficiencia al tener menos presencia de especies, comparando ambos resultados, son estos dos extractos los que prevalecen sobre los demás tratamientos.

Interés sobre la cepa realizada con co-cultivo

El extracto M se realizó como un co-cultivo compuesto de tres cepas de bacterias, su eficiencia muestra que las cepas usadas tienen una

interacción positiva entre las bacterias utilizadas, probablemente por secretar expopolisacáridos que tienen una señal de baja inducción sobre las diatomeas que se pretenden fijar en el sustrato, Lam et al. (2003) explican que las señales de asentamiento a los sustratos en los macroorganismos se ve influenciada por los polisacáridos secretados por las microalgas. Al ser un co-cultivo, tiene como ventaja la producción de diferentes compuestos, incrementando su potencial para mejorar los procesos biotecnológicos con respecto a los cultivos con cepas puras (Wacher-Rodarte, 2012).

Control de *biofouling* mediante cobre

El control positivo tuvo una buena respuesta en las pruebas de cobertura, sin embargo, no fue efectivo en las pruebas de identificación florística, esto difiere con el conocimiento que se tiene sobre las pinturas *antifouling* convencionales, las cuales usan como base óxido cuproso al ser de los biocidas más efectivos por su amplio espectro de prevención (Cárdenas, 2010).

Basado en la investigación de Covarruvias-Rubio et al. (s.f.) para explicar el resultado anterior, es que, muchas microalgas tienen la capacidad de desarrollarse incluso en altas concentraciones de metales pesados presentes en ambientes acuosos y terrestres gracias a la formación de EPS (exopolisacáridos), que actúan uniendo los metales a los grupos carboxilo, sulfato y fosfato de las colonias microalgales, detoxificando el sustrato y proveyendo un ambiente favorable para el desarrollo de interacciones

microbianas. Es por ello, que la producción de EPS se vio incrementada desde el primer día de exposición ante dicho metal como mecanismo de tolerancia.

Potencial de inhibición de las pinturas antivegetativas

Como se mencionaba con anterioridad, el extracto realizado con co-cultivos de *Bacillus* fue el más eficiente en las pruebas de riqueza de especies, y a pesar de que el extracto de *Shewanella algae* fue exitoso *in vitro*, no fue eficiente frente a las microalgas al probarlo en el campo, esto se deduce puede ser debido a los cambios de temperatura en el ambiente. Martínez-Rodríguez et al. (2014) recientemente pusieron a prueba la cepa, sometiénola a variaciones de temperatura y observaron que tenía una susceptibilidad a estos cambios, perdiendo con ello sus propiedades *antifouling*.

Como bien lo dijeron Mieszkin et al. (2013) al proponer la aplicación de pinturas *antifouling* se debe tener en consideración que las propiedades de los extractos microbianos podrán variar con respecto a las condiciones físico químicas del medio, así como por el tipo de especie que interactúen en el sitio y sobre todo tener en cuenta las especies dominantes que se pretenden atacar como objetivo particular.

A pesar de la eficiencia *in vitro* de los extractos bacterianos, el resultado al probarlas *in situ* no ha sido tan eficaz como en las pruebas de laboratorio.

Esto en gran medida debido a que las pruebas realizadas en laboratorio se realizaron con cepas que no pertenecían a la región. Ahora, al tener las especies de la zona de estudio que se presentaron en todos los extractos, a pesar de la variedad, se podrá posteriormente trabajar *in vitro* directamente con las diatomeas endémicas que están causando los problemas de *biofouling* y con esto aumentar los resultados positivos con mayor impacto *antifouling*.

CONCLUSIÓN

Los resultados del estudio con el propósito de evaluar la actividad inhibitoria de diferentes compuestos ante la formación de *biofouling* permiten evaluar primeramente *in vitro* a los extractos con propiedades antiincrustantes, para después *in situ* probar realmente su efectividad, con ello también conocer a las especies más difíciles de erradicar en la zona de estudio.

El estudio *in vitro* permitió seleccionar siete extractos que mostraron eficiencia en las pruebas y llevarlas a campo para someterlas a condiciones reales.

El método de identificación por medio de taxonomía clásica es relativamente sencilla de aplicar, práctica para realizarse en cualquier sitio y de muy bajo costo. Su utilización permitió identificar satisfactoriamente la mayoría de las diatomeas involucradas en el proceso de *biofouling* en los extractos.

Los extractos con potencial para ser inhibidores de *biofouling* son los extractos M (co-cultivo de *Bacillus spp.*) y 28 (*Staphylococcus sp.*).

Con base en los resultados obtenidos sobre el control con cobre, se infiere que el uso de los extractos antivegetativos podría ser una mejor opción para combatir el problema que las sustancias actualmente utilizadas con metales pesados.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- Águila-Ramírez, R.N., A. Arenas-González, C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta, J.M. Borges-Souza, B. Verón, J. Pope y C. Hellio. 2012. Antimicrobial and antifouling activities achieved by extract of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiológica*. 22 (1):8-15.
- Águila-Ramírez R.N., C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta, Ghezlane Id-Daoud, Samantha Hewitt, Josephine Pope, Claire Hellio. 2014. Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina gerardogreeni*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90: 64-70.
- Águila Ramírez, R.N., S. Martínez Díaz, B. González Acosta, C. Hellio. 2015. Evaluación de sustancias antifouling derivadas de microorganismos marinos en la elaboración de pinturas antivegetativas. Informe técnico. CICIMAR-IPN.
- Algaebase.org. (2017). Algaebase. Listing the World's Algae. [en línea] Recuperado el 18 de abril del 2016: <http://www.algaebase.org>.
- Anil, A. C. 1986. Studies on marine biofouling in the Zuari estuary (Goa) west coast of India. India: University of Karnataka.
- Anderson, C. 2002. TBT-free antifouling coatings in 2003 for better or for worse? *Corros. Management* 40 (2): 1-4.
- BioMed Central. (23 de Abril de 2014). Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de BMC Microbiology: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-102>
- Briand, J.F. 2009. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biufouling*, 25 (4): 297-311.
- Bryant, P. J. (2012). Pennate diatom: *Pleurosigma* sp. Recuperado el 15 de enero de 2017, de Diatoms of Orange County, California: <http://nathistoc.bio.uci.edu/Diatoms/Pleurosigma.htm>

- Buendía-Flores, M., R. Tavera y E. Novelo. (2015). Florística y ecología de diatomeas bentónicas de la zona lacustre de Xochimilco-Tláhuac, México. *Botanical sciences*, 93(3), 531-558.
- Burgess, J. G., K. G. Boyd, E. Armstrong, Z. Jiang, L. Yang, M. Berggren, M. D. R. Adams. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19, 197-205.
- Carballo J. L. 2002. Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. Perspectiva actual, en *El mar como fuente de moléculas bioactivas*, A. J. Laborda y Secretariado de Publicaciones Universidad de León (ed.). León, España. P. 83-115.
- Cárdenas, T.G. 2010. Composición de pintura anti-incrustante a base de complejo de quitosano-cobre (i) y metodo para obtenerla. Generic, Google Patents: <https://www.google.com/patents/WO2010032197A1?cl=es>
- Castelló-Orvay, F. (1993). *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Edicions Universitat Barcelona.
- Characklis, W. G. y K. E. Cooksey. 1983. *Biofilm and microbial fouling*. Academy Press, 83-138 pp.
- Chaves, A. 2003. Evaluación del posible papel ecológico de los extractos orgánicos crudos de las esponjas excavadoras *Cliona aprica* Panc, 1971, *C. caribbaea* Carter, 1882, *C. delitrix* Pang, 1973 y *C. tenuis* Zea y Weil, sp. nov. Trabajo de grado para optar al título de Bióloga Marina, Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta.
- Christie, A. O. y R. Dalley. 1987. *Barnacle fouling and its prevention*. A.A. Balkema, Rotterdam: Barnacle Biology.
- Cook, L.L. y S.A. Whipple. 1982. The distribution of edaphic diatoms along environmental gradients of a Louisiana salt marsh. *Journal of Phycology* 18: 64-71.
- Cooksey, B., K. E. Cooksey, C. A. Millar, J. H. Paul, R. Rubin y D. Webster. 1984. The attachment of microfouling diatoms. 167-172 pp.
- Covarrubias-Rubio, Y., A. Rocha-Urbe y J. V. García-Meza. (s.f.). IZT. Recuperado el 26 de Febrero de 2017, de UAM:

<http://www.izt.uam.mx/cime21/trabajos/BR-3%20Covarrubias-Rubio.pdf>

- Da Gama, B. A. P., C. R. Pereira, A. R. Soares, V. L. Teixeira y Y. Yoneshigue-Valentin. 2003. Is the mussel test a good Indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*, 19 (1): 161-169.
- Dang, H. y C. R. Lovell. 1999. Bacterial primary colonization and early succession on surface in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2), 467-475.
- Demain A. L. y J. L. Adrio. 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* 38: 41-55.
- De Nys, R. y P. D. Steinberg. (1999). Role of secondary metabolites from algae and seagrasses in biofouling control, en *Recent advances in marine biotechnology*, M. Fingerman y R. Nagabhusanam (ed.). Enfield: Science Publishers. 223-244 pp.
- De Nys, R., P. D. Steinberg, P. Willemsen, S. A. Dworjanyn, C. L. Gabelish, y R. J. King. 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in anti-fouling assays. *Biofouling*, 8, 259-271.
- Devendra, H. D., R. S. Damare, V. Y. Nanchaiah, N. Ramaiah, P. V. Venugopalan, R. A. Kumar y S. S. Zinjarde. (15 de Mayo de 2013). Plos One. Recuperado el 1 de Octubre de 2011, de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064501>
- Devendra, H. D., S. R. Damare, Y. V. Nanchaiah, N. Ramaiah, V. P. Venugopalan, A. R. Kumar y S. S. Zinjarde. 2013. Disruption of Microbial Biofilms by an Extracellular Protein Isolated from Epibiotic Tropical Marine Strain of *Bacillus licheniformis*. (M. J. Virolle, Ed.) *Plos On*, 8(5).
- Dobretsov, S. y P. Y. Qian. 2004. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya sp.* in the inhibition of larval settlement. *J Exp Mar Biol Ecol*, 299, 35-50.
- Dobretsov, S., H. U. Dahms y P. Y. Qian. 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, 22, 43-54.

- Dworjany, S. A., R. de Nys y P. D. Steinberg. 2006. Chemically mediated antofouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar Ecol Prog Ser*, 318, 153-163.
- Eguía-López, E. 2000. Patentes antiincurstantes de base vinílica y de clorocaucho aplicadas sobre estructuras artificiales en la bahía Santander. *Estudios e Investigaciones Marinas*, 1, 5-12.
- Epstein, N. 1981. Fouling: technical aspects, en *Fouling of heat transfer equipment*, E. Somerscales y J. Knudsen (ed.). Washington: Hemisphere. P. 31-53.
- Evans. 1988. Marine biofouling, en *Algae and Human Affairs*, C. A. Lembi y J. R. Walland (ed.). Cambridge University Press. P. 433-453.
- Foged, N. 1975. Some littoral diatoms from the coast of Tanzania. *Bibliotheca Phycologica*. 47-225 pp.
- Foged, N. 1984. Freshwater and littoral diatoms from Cuba. Cramer. Germany. 243 p.
- Guiry, M.D. y G. M. Guiry. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 05 April 2016.
- Hellio, C., J. P. Marechal, B. Véron, G. Bremer, A. S. Clare y Y. Le Gal. 2004. Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany coast (France). *Marine Biotechnology*, 6, 67-82.
- Hernández-Guerrero C.J., R.N. Aguila Ramírez, V.H. Cruz Escalona, B. González Acosta, J.M. Borges Souza, I. Murillo Álvarez, y M. Muñoz Ochoa. 2009. Bioactividad de metabolitos secundarios derivados de macroalgas y esponjas y su papel ecológico en un arrecife rocoso del Golfo de California. Informe técnico final SEP-CONACYT 79707
- Hölmstrom, C. y S. Kjelleberg. 1999. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 30 (4), 285-293.
- Hustedt, F. 1955. Marine littoral diatoms of Beaufort North Carolina. *Duke University Marine Station Bulletin*. 6:1-67.
- Hustedt. F. 1930. Bacillariophyta. Pascher. Ed. Die Susswasserflora Mitteleuropas. Otto Koeltz Science Publ. Koenigstein. Germany. 466 p.

- Hustedt. F. 1959. Die Kieselalgen Deutschlands, Ostrrreichs un der Schweiz., en Kryptogammenflora. Band VII: 1, 2, 3., L. Rabenhortst (ed.). Johnson Rep. Co. New York.
- Hustedt. F. 1961-66. Die kieselalgen Deutschland, Osterreichs un der Schweiz. en Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich un Schweiz, VII Band, III Teil, L.Rabenhorst (ed.). Koeltz Scientific Books (Rep. 1991). Germany. 816 p.
- Jimenez-Taracido, L. 2009. Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad Quorum Sesting de las especies implicadas en el proceso. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, Departamento de tecnología del Medio Ambiente.
- Kato, J., Amie, J. Murata, Y. Kuroda, A. Mitsutani, y H. Ohtake. 1998. Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium. Applied and Environmental Microbiology, 64 (6), 2061-2064.
- Klein, G. L., E. Soum-Soutéra, Z. Guede, A. Bazire, C. Compère y A. Dufort, 2011. The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 27 (8), 931-940.
- Kobayashi, N. y H. Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Mar. Pollut. Bull., 44: 748-751.
- Lam, C, T. Harder y P. Y. Qjan. 2003. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by surface associated settlement cues of marine benthic diatoms. Marine Ecology Progress Series: 263, 83–92.
- Lee, S. O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani y H. Ohtake. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the mairne bacterium *Pseudoalteromonas sp* strain A28. Applied and Enviromental Microbiology, 66 (10), 4334-4339.
- Licea S., M. E. Zamudio, J. L. Moreno-Ruiz, R. Luna. 2011. A suggested local regions in the Southern Gulf of Mexico using a diatom database (1979-2002) and oceanic hydrographic features. Journal of Environmental Biology 32: 443-453.

- López-Fuerte, F.O., D.A. Siqueiros Beltrones y J.N. Navarro. 2010. Benthic diatoms associated with mangrove environments in the northwest region of Mexico. CONABIO-UABCS-IPN, La Paz, México. 206 p.
- López-Fuerte, F. O. y D. A. Siqueiros-Beltrones. 2016. A checklist of marine benthic diatoms (Bacillariophyta) from Mexico. *Phytotaxa*, 283 (3), 201-258.
- Lovejoy, C., J. Bowman y G. Hallegraef. 1998. Gustaaf Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma sub-division) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 97(2), 199-206.
- Marechal, J. P., C. Hellio, M. Sebire y A. S. Clare. 2004. Settlement behavior of marine invertebrate larvae measured by EthoVision 3.0. *Biofouling*, (4), 211-217.
- Marinespecies.org. (2016). WoRMS - World Register of Marine Species. [en línea] disponible en: <http://www.marinespecies.org>
- Martínez-Rodríguez, A. J., A. González-Orive., A. Hernández-Creus, A. Morales, R. Dorta-Guerra, M. Norte y J. J. Fernández. 2014. On the Influence of the culture in bacterial antifouling bioassays and biofilms properties: *Shewanella algae*, a case study. *BMC Microbiology*.
- Martínez-Díaz, Y.R. 2010. Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 90 p.
- Maximilien, R., R. De Nys, C. Holmström, L. Gram, M. Givskov, K. Crass, S. Kjelleberg y P. D. Steinberg. 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 15: 233-246.
- Mieszkina, S, M. E. Callow y J. A. Callow. 2013. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. *Biofouling*: 29 (9), 1097–1113.
- Mitbavkar, S., y A. Chandrashekar. 2006. Cell damage and recovery in cryopreserved microphytobenthic diatoms. *Cryobiology*, 53, 605-619.

- Mitbavkar, S. y A. C. Anil. 2002. Diatoms of the microphytobenthic community: population structure in a tropical intertidal sand flat. *Mar. Biol.* 140:41-57.
- Mitbavkar, S. y A. C. Anil. 2004. Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. *Mar. Biol.* 1455-20 pp.
- Mitbavkar, S. y A. C. Anil. 2006. Diatoms of the microphytobenthic community in a tropical intertidal sand flat influenced by monsoons: spatial and temporal variations. *Mar. Biol.* 148: 693-709.
- Montes Plascencia, C.I. 2010. Variación estacional de la actividad biológica de extractos orgánicos de la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Guadalajara, Jalisco, México, Universidad de Guadalajara. 52 p.
- Moraga-Alcaino, N. 2012. Preparación In- Situ de Materiales Compuestos de Polipropileno con Partículas de Cobre y Estudio de su Lixiviación y Propiedades. Universidad de Chile, Departamento en Ingeniería química y biotecnología, Santiago de Chile. Obtenido de Repositorio de la Universidad de Chile.
- Moreno. J.L., S. Licea y H. Santoyo. 1996. Diatomeas del Golfo de California. UABCS. SEP-FOMES-PROMARCO. México. 273 p.
- Navarro. N.J. 1982. Marine Diatoms Associated with Mangrove Prop Roots in the Indian River, Florida, USA. 151 p.
- Navarro, N.J. y R. Torres. 1987. Distribution and community structure of marine diatoms associated with mangrove prop roots in the Indian River, Florida, USA. *Nova Hedwigia.* 45: 101-112.
- Newmark, F., M. Santos-Acevedo, A. Chaves-Fonnegra, J. Mora, J. Arias y S. Zea. 2005. Manual de métodos de bioactividad. INVEMAR.
- Nylund, G. M., P. E. Gribben, R. de Nys, P. D. Steinberg y H. Pavia. 2007. Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Mar Ecol Prog Ser*, 329, 73-84.
- Ortíz-Aguirre I. 2012. Actividad biológica de esponjas y su relación con la complejidad de la comunidad bentónica en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 112 p.

- Patil, J.S. y A. C. Anil. 2005a. Biofilm diatom community structure: influence of temporal and substratum variability. 21: 189-206.
- Patil, J.S. y A. C. Anil. 2005c. Epibiotic community of the horseshoe crab, *Tachypleus gigas*. Mar. boil. 136: 699-713.
- Patil, J.S. y A. C. Anil. 2002. Quantification of diatoms in biofilms: standardization of methods. 21: 181-88. BioMed Central. (23 de Abril de 2014). Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de BMC Microbiology: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-102>
- Peragallo. H. y M. Peragallo. 1908. Diatomées marines de France et districts maritimes voisins. Ed. M. J. Tempere, France. 491 p.
- Qian, M., S. Tian, X. Li, X., J. Zhang, Y. Pan y X. Yang. 2006. Ethanol production from dilute-Acid softwood hydrolysate by co-culture. Appl Biochem Biotechnol, 134 (3), 273-284.
- Qian, P. Y., S. C. Lau, H. U. Dahms, S. Dobretsov y T. Harder. 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. Mar. Biotechnol., 9: 399-410.
- Raveendran, T. V., P. D. Sankaran y A. B. Wagh. 1991. Composition of microfouling on aluminium and fibreglass panels exposed in Agatti waters (LakshawEEP Island). Indian J. Mar. Sci, 20, 75-77.
- Readman , J. W., L. L. Kwong, D. Grondin, J. Bartocci, J. P. Villeneuve y L.D. Mee. 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antofouling paints. Environ. Sci. Technol, 27(9), 1940-1942.
- Round. F.E., R.M. Crawford y D.G. Mann. 1990. The Diatoms. Cambridge University. Press. 747 p.
- Santos-Acevedo, M., C. Puentes, K. Carreño, J. Gómez-Leóna, M. Stupak, M. García y G. Blustein. 2013. Antifouling paints based on marine natural products from Colombian Caribbean, Int. Biodeterior. Biodegrad, 83, 97-104.
- Sawant, S. S., S. Sonak y A. Garg. 1995. Growth inhibition of biofouling bacteria and diatoms by extract of terrestrial plant, *Derris scandens*

- (Dicotyledonae: Leguminosae). Indian Journal of Marine Sciences, 24, 229-230.
- Siqueiros-Beltrones, D.A. 2002. Diatomeas bentónicas de la península de Baja California; diversidad y potencial ecológico. Oceánides-CICIMAR-IPN-UABCS. México. 102 p.
- Siqueiros_beltrones, D. A., y D. Voltolina. 2000. Grazing selectivity of red abalone *Haliotis rufescens* postlarvae on benthic diatom films under culture conditions. Journal of the World Aquaculture Society, 31, 239-246.
- Tsoukatou, M., C. Hellio, C. Vagias, C. Harvala y V. Roussis. 2002. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. Z Naturforsch, 161-171 pp.
- Vishwakir, Y. y A. C. Anil. 1999. Record of imposex in *Cronia konkanensis* (Gastropoda, Murcidae) from Indian waters. Marine Environmental Research, 48, 123-130.
- Wacher-Rodarte, M. C. 2012. Ventajas del uso de Cocultivos en Biotecnología. BioTecnología, 12 (1).
- Wahl, M. 1989. Fouling and antifouling: some basic aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser, 58, 175-189.
- Witkowski, A., H. Lange-Bertalot y D. Metzeltin. 2000. Diatom flora of marine coasts I. Gantner Verlag, Ruggell. 925 p.
- Xu, J., J. Kim, T. Danhorn, P. M. Merritt y C. Fuqua. 2012. Phosphorus limitation increases attachment in *Agrobacterium tumefaciens* and reveals a conditional functional redundancy in adhesion byosynthesis. Res. Microbiol, 163, 674-684.
- Yebra, D., S. Kiil, K. Dam-Johansen. 2004. Antifouling Technology: Past, Present and Future Steps Towards Efficient And Environmentally Friendly Antifouling Coatings. Progress in Organic Coatings. 75-104 pp.
- Yoshinaga, I., T. Kawatai Y. Ishida. 1997. Analysis of algicidal rangers of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*

isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref. Japan. Fish. Science, 63, 94-98.