



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 846**

51 Int. Cl.:
A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05798580 .6**

96 Fecha de presentación : **14.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1811848**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Producto bacteriano de origen marino útil para prevenir las macro y las microincrustaciones biológicas causadas por macroalgas e invertebrados marinos.**

30 Prioridad: **15.10.2004 CL 200402658**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2011

73 Titular/es: **Universidad de Antofagasta
Avenida Angamos 601
Antofagasta, CL
Fernando Rodrigo Silva Aciaras,
Manuel Francisco Zapata Arcos,
Mario Andrés Lody Cortes,
Yery Alan Luza Pizarro,
Marcela Clarke Guerra y
Carlos Eduardo Riquelme Salamanca**

72 Inventor/es: **Riquelme Salamanca, Carlos Eduardo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 846 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a productos bacterianos de origen marino con propiedades inhibitorias de la adherencia o fijación contra las microalgas, macroalgas e invertebrados marinos, que se pueden fijar o adherir a sustratos en un ambiente marino.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención describe productos bacterianos extracelulares provenientes de una bacteria marina *Alteromonas* sp, denominada Ni1 LEM, depositada en la colección de cultivos para Investigación Agrícola con el número de acceso NRRL B-30784. Dichos extractos son útiles para inhibir el asentamiento y la fijación de microalgas bentónicas marinas (diatomeas), macroalgas y larvas de invertebrados marinos, principalmente los que están involucrados en problemas como "bioincrustaciones" o "Biofouling" en el medio ambiente marino. Además, la presente invención divulga el procedimiento de obtención de estos extractos, que tienen propiedades biocidas.

Una superficie sumergida en un ecosistema marino es susceptible a ser rápidamente colonizada. Dicho fenómeno se denomina "biofouling" o "bioincrustación", que corresponde a la acumulación indeseada de microorganismos, algas y animales en superficies o estructuras sumergidas en el mar; en una primera instancia dicho fenómeno se inicia mediante la formación de una película que contiene materia orgánica y macromoléculas disueltas, tales como polisacáridos, proteínas y fragmentos de proteínas, seguido de bacterias, microalgas, protozoos, algas e invertebrados. Dichos organismos constituyentes de las bioincrustaciones se pueden dividir en "micro-bioincrustaciones" y "macro-bioincrustaciones". Las micro-incrustaciones o películas microbianas inician el proceso de colonización de superficies expuestas, para luego dar paso a la colonización por los organismos responsables de las macro-bioincrustaciones (tunicados, balánidos, moluscos y algas). Sin embargo, la bioincrustación no sólo se encuentra sobre objetos inanimados, sino que puede colonizar la superficie de plantas e invertebrados marinos. En algunos estudios de investigación se ha demostrado que el desarrollo de la bioincrustación sobre superficies de estructuras inanimadas difiere de la de los organismos colonizados, más aún, los constituyentes y estructuras de la bioincrustación difieren de un organismo a otro. Sin embargo, las algas e invertebrados marinos son los principales colonizadores en el mar.

La presencia de la "bioincrustación" causa problemas sustanciales en las estructuras sumergidas en el mar, con las consecuentes pérdidas económicas. Entre los principales problemas originados por la "bioincrustación" en los ambientes marinos se encuentran los relacionados con los sistemas de cultivo en acuicultura y estructuras marinas, tales como los pilares de las plataformas petrolíferas y los cascos de barcos. Por tanto, en acuicultura, por ejemplo, la acumulación de la "bioincrustación" en las redes de las jaulas usadas para el cultivo de peces en acuicultura provoca el hundimiento de éstas, así como la reducción del flujo de agua a través de la malla, originando una drástica disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el interior de estos sistemas de cultivo. Problemas similares se producen con los sistemas de cultivos usados en el cultivo de moluscos filtradores (vieira, ostras y mejillones), donde los organismos que se están cultivando compiten con los organismos de las "bioincrustaciones" por el oxígeno y los nutrientes. Lo anterior genera la necesidad de retirar los sistemas de cultivo periódicamente del mar a la tierra para su limpieza. Este mantenimiento del material de cultivo representa un alto coste para las empresas de acuicultura. El problema del fenómeno de las "bioincrustaciones" no sólo se restringe a los sistemas de cultivos en mar, por tanto este es el modo mediante el cual los sistemas en tierra no escapan a los problemas causados por las "bioincrustaciones". Por ejemplo, las cañerías utilizadas para la distribución de agua de mar en criaderos de larvas y semillas de invertebrados marinos de importancia comercial sufren la colonización biológica en su interior, reduciendo de esta manera la tasa de bombeo y el flujo de agua necesario.

Para combatir la "bioincrustación" en estructuras marinas se han utilizado varios compuestos tóxicos, siendo el más eficiente los compuestos basados preferentemente en tri- butil estaño (TBT) o cobre. Estas pinturas que contienen TBT son altamente efectivas en el control de la bioincrustación en barcos, alcanzando periodos de siete años sin requerir mantenimiento. No obstante, las políticas de control ambiental han restringido el uso de pinturas que contienen TBT en ambientes marinos en embarcaciones superiores a los 25 m de longitud y debido a sus efectos perjudiciales sobre el medio ambiente, el uso de TBT debería estar erradicado para el año 2008. Estas normas se basan en numerosos estudios sobre los efectos del TBT, que han notificado efectos tóxicos, en concentraciones bajísimas, sobre organismos marinos como moluscos.

Una alternativa a las pinturas que contienen TBT, son aquéllas cuyo constituyente principal es el cobre y otros metales pesados como el zinc. Estas pinturas se usan principalmente en la mayoría de las embarcaciones pequeñas, siendo efectivas durante un periodo de 1-2 años. No obstante, entidades gubernamentales de diversos países han señalado los riesgos del uso de estas pinturas para el ambiente y el riesgo para el hombre, sugiriendo su prohibición. De esta forma, la Comisión Marítima Internacional (International Maritime Organization) ha prohibido el uso de estaño en pinturas anti-bioincrustación a partir del año 2003. El uso de cobre en pinturas anti-bioincrustación se encuentra bajo una clasificación similar, estando prohibido su uso en el Mar Báltico desde 2002. El cobre es

tóxico sobre algunas especies de algas y es acumulado por los moluscos filtradores. Se ha notificado que un tercio de las emisiones de iones de cobre en las aguas costeras de Noruega provienen de agentes anti-bioincrustaciones, usados en jaulas de cultivo acuícolas, un tercio provino de las pinturas anti-bioincrustaciones usadas en cascos de embarcaciones y el tercio restante de otras fuentes. Actualmente, en Noruega, la regulación de emisión de estas sustancias producirá una espectacular reducción de las emisiones de estas sustancias: las nuevas compañías de limpieza de redes tendrán que adaptarse a la nueva legislación a partir de enero de 2001, las compañías antiguas tendrán un plazo para adaptarse hasta el año 2005. Estas restricciones y limitaciones han provocado billonarias pérdidas en la industria naviera internacional, provocando la urgente necesidad de elaborar tecnologías "anti-bioincrustaciones" efectivas que reemplacen a las pinturas con metales tóxicos y que no representen riesgos ambientales para la salud humana.

Por otra parte existen algunos productos que usan la naturaleza como fuente de las sustancias químicas que pueden usarse tanto en pinturas anti-bioincrustaciones como en plásticos, sin embargo, aunque en la actualidad existen algunos de ellos en el mercado, todavía se necesita mayor investigación al respecto, pues son muchas las sustancias que tienen un uso potencial en la prevención de la bioincrustación. La mayoría de estos proyectos o productos de investigación se basan en el hecho de que muchos organismos sésiles acuáticos se encuentran libres de bioincrustación, ya que presentan mecanismos naturales como la producción de metabolitos con propiedad anti-incrustación, a nivel de suministro de protección contra la colonización, reduciendo la competitividad por el espacio en ambientes competitivos. También existen bacterias, principalmente del género *Pseudoalteromona*, que producen sustancias de alto peso molecular con propiedades tóxicas e inhibidoras de bacterias grampositivas y gramnegativas. Hasta ahora, la especie bacteriana *Pseudoalteromona tunicata* se ha estudiado ampliamente en relación a la producción de una variedad de componentes extracelulares que son responsables de la inhibición del establecimiento de organismos habituales de la bioincrustación, tales como bacterias, hongos, microalgas bentónicas, esporas de algas e invertebrados marinos.

En el documento EP 1170359, HAYASE N. y col.: "Polymero film produced by a marine bacterium" JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 95, nº 1, 2003, páginas 72-76 y O'CONNOR N.J. y col.: "Attachment of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) larvae: Responses to bacterial films and extracellular materials" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY, vol. 226, nº 1, 1998, páginas 115-129 se divulgan propiedades anti-macro-bioincrustaciones de algunos casos de *Alteromonas*.

Algunos proyectos de investigación desarrollados para el FONDEF (Fondo de Fomento al Desarrollo científico y Tecnológico: Funds for the Promotion of the Scientific and Technologic Development) en nuestro laboratorio han permitido aislar e identificar una bacteria marina denominada Ni1 LEM, que corresponde a una *Alteromonas* sp que, en estudios *in vitro* a nivel de laboratorio y en posteriores estudios *in situ* en el medio ambiente marino han mostrado la capacidad de disminuir significativamente el porcentaje de asentamiento y fijación de los principales componentes de las "bioincrustaciones" sin afectar los organismos de cultivo de importancia comercial, además de ser inocuos para el medio ambiente.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Uno de los objetivos principales de la presente invención es inhibir el asentamiento y la fijación de los principales organismos que forman parte de la "bioincrustación", principalmente microalgas bentónicas (diatomeas), macroalgas y larvas de invertebrados marinos.

De acuerdo con la invención, el objetivo se alcanza al proveer sustancias bioactivas provenientes de la bacteria marina *Alteromonas* sp (Ni1 LEM) cultivada artificialmente, que (las sustancias) se aplican y adhieren a los sustratos de fijación de los organismos pertenecientes al grupo de "bioincrustaciones".

En una forma de realización preferida, la presente invención está relacionada con un producto extracelular, que actúa como agente anti-bioincrustaciones contra invertebrados marinos habituales de las bioincrustaciones, en el que el producto comprende un extracto del sobrenadante del cultivo de *Alteromonas* sp, cultivo con nº de acceso NRRL B-30784, en el que dicho extracto está formado por el sobrenadante de dicho cultivo de *Alteromonas* sp, que se ha sometido a diferentes tratamientos, entre los que se encuentran la filtración a través de membranas o el calentamiento del extracto o la diálisis de dicho extracto.

En una forma de realización adicional, la presente invención está relacionada con una composición anti-bioincrustaciones, que está formada por el producto extracelular tratado o sin tratar de acuerdo con lo anterior, con un biopolímero, para formar un gel que comprenda el producto y que permita su liberación controlada al ambiente en el que se desea inhibir o prevenir la adherencia o fijación de micro-bioincrustaciones o macro-bioincrustaciones. El biopolímero que se va a usar se puede seleccionar de fuentes de biopolímeros disponibles comercialmente, siendo preferibles los siguientes biopolímeros disponibles comercialmente, como Alginato, Phytigel®, Gelrite®, agar Nobel®, Agargel®, Transfergel®. Siendo Phytigel® el biopolímero más preferido.

Dicha composición en forma de gel comprende dicho producto extracelular en una proporción (v/v) comprendida en el intervalo de alrededor de 1:2 hasta alrededor de 1:10, siendo preferible la composición que comprende el producto extracelular en una proporción comprendida en el intervalo de alrededor de 1:2 a alrededor de 1:5, siendo la más preferida una

5 composición que comprende al producto extracelular en una proporción de 1:2, en base al volumen final de la composición.

10 En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere al uso de dicho producto extracelular anti-bioincrustaciones en la preparación de una composición, que es útil para evitar o inhibir las micro-bioincrustaciones y las macro-bioincrustaciones, en el que dichos fenómenos de macro-bioincrustaciones se producen mediante la fijación o adherencia de uno o más invertebrados marinos y/o macroalgas, como, por ejemplo, los organismos seleccionados del grupo formado por *Ulva lactuca*, *Pyura praeputialis*, *Ciona intestinalis*, y *Semimytilus algosus*, y en el que dichas micro-bioincrustaciones se producen mediante la fijación o adherencia de uno o más organismos del tipo de las microalgas bentónicas o diatomeas, como, por ejemplo, los seleccionados del grupo formado por *Nitzschia sp1*, *Amphora sp*, *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia ovalis amott*, *Chaetoceros minutissimus*, *Navicula sp1*, *Navicula sp2* y *Nitzschia sp2*.

15 En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de dicho producto extracelular anti-bioincrustaciones, que comprende las etapas de aislar el sobrenadante del cultivo de *Alteromonas sp* con nº de acceso NRRL B-30784 y la posterior filtración o ultrafiltración del sobrenadante obtenido. Opcionalmente, dicho procedimiento de preparación comprende la etapa adicional de calentar el sobrenadante a una temperatura comprendida entre alrededor de 70°C y 100°C, durante alrededor de 20 minutos, siendo preferible un calentamiento a una temperatura comprendida entre alrededor de 90 a 100°C, siendo más preferible el calentamiento a 100°C.

20 En el procedimiento para obtener el producto extracelular anti-bioincrustaciones de la presente invención se puede realizar, de manera opcional, una etapa de diálisis del sobrenadante a través de una membrana de diálisis que tiene un tamaño de exclusión comprendido entre 3.500 da y 10.000 da. Siendo preferible la diálisis a través de una membrana cuyo tamaño de exclusión es de 3.500 da.

25 En una forma de realización adicional del procedimiento para obtener el producto extracelular anti-bioincrustaciones de la presente invención, el dializado obtenido con anterioridad se somete a una etapa de concentración, ya sea dializado a través de la membrana de 10.000 da o de la membrana de 3.500 da, en el que dicha etapa de concentración se realiza hasta obtener un producto dializado y concentrado entre 2 hasta 30 veces, o se concentra entre 5 a 25 veces, siendo preferible una concentración del dializado de 20 veces. De forma adicional, dicho concentrado se puede usar de acuerdo con el objetivo descrito en la presente solicitud y/o para preparar la composición anti-bioincrustaciones, con un biopolímero.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35 Los siguientes protocolos experimentales describen las formas de realización preferidas de la invención.

En la presente invención, el término "SSM" quiere decir Solución Salina Marina, que corresponde a una solución que comprende una mezcla de NaCl, KC1 y MgSO₄ en una proporción de 24:1:8, disuelta en un volumen de agua destilada (1 l), con un valor de pH de 7,0, y esterilizada en autoclave.

40 En la presente invención, el término "Am" quiere decir "Agua de Mar", compuesta por agua de mar que se ha sometido a filtración a través de 0,45 µm y que posteriormente se esteriliza en autoclave.

Uso experimental de sustancias extracelulares bioactivas de bacterias marinas en el laboratorio

-Aislamiento de bacterias marinas con potencial actividad anti-bioincrustaciones

45 Las bacterias seleccionadas que exhiben capacidad "anti- bioincrustación" se aislaron de sustratos artificiales y naturales, que exhibían una colonización significativamente baja 'de "macro-bioincrustaciones", respecto a otros sustratos adyacentes.

Sustratos artificiales.

50 En el caso de un sustrato artificial, se procedió a demarcar un área de 1 cm² raspando de forma aséptica la película adherida al mismo. El raspado obtenido se dispuso en recipientes que contenían 10 ml de solución salina marina (SSM) estéril. Además, se seleccionó un pequeño trozo de los sustratos; se lavó reiteradamente con agua de mar estéril y se dispuso en un recipiente con 10 ml de SSM estéril. Posteriormente, el raspado y/o el trozo de

sustrato se sometió durante 60 segundos a tratamientos de ultrasonidos con el fin de obtener una suspensión que contiene los microorganismos asociados.

Sustratos naturales

5 Se seleccionaron invertebrados marinos, algas, esponjas y cnidarios, en los que su superficie externa estaba libre de "macro- bioincrustaciones" y se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Antofagasta. Posteriormente, éstos fueron lavados reiteradamente con agua de mar estéril y mediante el uso de material de disección estéril se tomó una muestra de tejido de la superficie. El tejido recuperado se homogeneizó con 10 ml de SSM estéril mediante un homogenizador Stomacher.

Para sembrar las muestras y mantener los microorganismos se usó el siguiente procedimiento:

10 Para el aislamiento de la flora bacteriana asociada se realizaron diluciones apropiadas de cada muestra, que se sembraron en placas con los siguientes medios de cultivo: (1) agar triptona suplementado con NaCl 2% (TSA2, Oxoid Co.), (2) agar para *Pseudomonas* (AP, Oxoid Co.), (3) agar marino Zobell 2216 (AM, Difco Co.), (4) agar V de nueve sales (VNSS, Albertson y col. 1990) y (5) agar tiosulfato-citrato- sales biliares-sacarosa suplementado con NaCl 2% (TCBS2, Oxoid Co.). Tras la siembra en placas con agar y el cultivo durante una semana a 20°C se procedió a aislar los morfotipos dominantes para su posterior caracterización mediante procedimientos generales de identificación bacteriana (Hansen & Sorheim 1991 Seeley y col. 1995, Gerhardt y col. 1994, Holt y col. 1994). Respecto a las especies bacterianas aisladas, estas se mantuvieron en ultra-refrigeración (~80°C) en caldo de triptona (TSB, Oxoid Co.) suplementado con NaCl 2%.

20 Protocolo Experimental 1: En las Figuras 1 a 8 se ilustra el efecto de productos extracelulares bacterianos sobre la fijación de diatomeas habituales en las "bioincrustaciones".

• El objetivo del presente experimento, pretende cuantificar y evaluar el efecto de productos extracelulares bacterianos sobre la fijación de los cultivos unialgales de diatomeas, que forman el sustrato habitual de fijación de semillas de vieira (*Argopecten purpuratus*) y abalón (*Haliotis discus hanai*) en sustrato de poliestireno y caracterizar preliminarmente la naturaleza del producto.

• Microalgas que se van a usar: *Nitzschia sp1* (Nc), *Amphora sp* (Nv), *Nitzschia ovalis arnott* (Fp), *Cylindrotheca closterium* (Cc), *Chaetoceros minutissimus* (Nm), *Navicula sp1* (Nav sp1), *Navicula sp2* (Nav sp2) y *Nitzschia sp2* (Nitz sp2).

• Productos bacterianos que se van a usar: Productos extracelulares bacterianos provenientes de 3 bacterias perifíticas con actividad contra las "micro-bioincrustaciones": *Pseudoalteromonas tunicata* (Pt) (Cepa de colección), *Halomonas marina* (Hm) (Cepa de colección), *Alteromonas sp* (Ni1 LEM). Además, se utilizó como control positivo la bacteria marina *Halomonas sp* (NC1).

• Obtención de productos extracelulares: En 1 litro de medio mínimo de cultivo (M9) se cultivaron bacterias con actividad inhibitoria de las micro-bioincrustaciones hasta la fase estacionaria a temperatura ambiente. Los sobrenadantes bacterianos se cosecharon por centrifugación a 11.000 rpm x 15 minutos, se esterilizaron mediante doble filtración a 0,22 µm. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se dividió en 6 porciones a las cuales se aplicaron los siguientes tratamientos:

1. Sobrenadante A: Sobrenadante sin ningún tratamiento. (Pt, Hm, Ni1 LEM y NCI).
2. Sobrenadante B: Sobrenadante calentado a 100°C por 20 minutos.(Pt, Hm, Ni1 LEM).
- 40 3. Sobrenadante C: Sobrenadante dializado a 3.500 da. (Ni1 LEM) .
4. Sobrenadante D: Sobrenadante dializado a 10.000 da. (Ni1 LEM) .
5. Sobrenadante E: Sobrenadante dializado a 3.500 da concentrado. (Ni1 LEM).
6. Sobrenadante F: Sobrenadante dializado a 10.000 da concentrado. (Ni1 LEM).

En relación a los controles estos fueron: Control agua de mar (Am) y control con medio mínimo (M9).

45 • Concentración de inoculación microalgal: $3,5 \times 10^5$ células x ml⁻¹.

• Duración del experimento: 24 horas.

• Volumen por pocillo: 0,2 ml (0,1 ml de sobrenadante y 0,1 ml de cultivo de diatomeas previamente lavado con AM 0,45 μ m sometido a autoclave, para eliminar todo efecto del medio de cultivo microalgal F/2 (Guillard, 1975).

5 • Procedimiento: Placas multipocillo de poliestireno de 6 mm de diámetro se equilibraron con 0,1 ml de un cultivo microalgal proveniente de cultivos en fase pre- estacionaria más 0,1 ml de sobrenadante bacteriano (según tratamiento) con una concentración total inicial de $3,5 \times 10^5$ células x ml⁻¹ ($2,5 \times 10^5$ células x cm⁻²), después se mantuvieron en una sala de ambiente controlado a 20°C y con un fotoperíodo de 12:12 horas. Los recuentos de microalgas se realizaron a las 24 horas de la incubación. Conforme se cumplió el tiempo de incubación, las placas multipocillo se lavaron con Am sometida a autoclave 5 veces, después, usando un microscopio invertido con un aumento de 100 veces se realizó un recuento de las microalgas adheridas. Los resultados se expresaron en células x cm⁻².

Am control : Control agua de mar.

Control M9: Control con medio mínimo.

100°C= Productos extracelulares tratados a 100°C.

Sob: Sobrenadantes sin ningún tratamiento.

15 >3,500: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da.

>10,000: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da.

[3,500]: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da y concentrados.

[10,000]: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da y concentrados.

Los resultados por productos extracelulares bacterianos bioactivos son:

20 • *Pseudoalteromona tunicata* (Pt): Efecto inhibitorio sobre las 8 diatomeas sometidas a ensayo, termoestable.

• *Halomonas marinas* (Hm) : Efecto inhibitorio sobre 6 diatomeas a excepción de *Amphora* sp y *Navicula* sp1, termoestable.

• *Halomonas* sp (NC1): Sin actividad inhibitoria.

25 • *Alteromonas* sp (Ni1 LEM): Efecto inhibitorio sobre las 8 diatomeas testeadas, termoestable, exhibe un peso molecular mayor o igual a 3.500 dalton.

Conclusión

30 En base a la caracterización inicial mostrada en este experimento, el componente antimicroalgal producido por *Alteromonas* sp (Ni1 LEM) tiene un bajo peso molecular, es termoestable, es soluble en agua que puede liberarse de forma eficiente desde biopelículas bacterianas sobre superficies en el medio ambiente marino. El uso de estas sustancias tiene una potencial aplicación para prevenir la fijación de uno de los primeros eslabones de la formación de "bioincrustaciones".

Protocolo experimental 2: En la Figura 9 se ilustra el efecto de productos extracelulares bacterianos sobre la fijación de la macroalga *Ulva lactuca*

35 1. Se colectaron muestras de *Ulva lactuca* antes de la esporulación (las algas deben tener el borde marrón verdoso, comprobando en un microscopio las condiciones de las células reproductivas [esporofito o gametofito])

Esporofito → las esporas tienen 4 flagelos.

Gametofito → los gametos masculino y femenino tienen

2 flagelos

40 2. Las algas se lavaron con abundante agua de mar (Am) filtrada a 0,45 μ m y esterilizada en autoclave.

3. Las algas se secaron durante dos horas a temperatura ambiente, en presencia de luz natural o luz artificial.

4. Las algas se colocaron en un vaso de precipitados con Am 0,45 μm esterilizada en autoclave (1 alga por vaso de precipitados de 200 o 500 ml). Este vaso se posicionó cerca de una fuente de luz artificial (lámpara de escritorio). Opcionalmente, en lugar de colocar el alga completa en el vaso de precipitados, se puede seleccionar (cortando) las áreas de las algas en las que se pueden encontrar las esporas.
- 5 5. Se recogieron las esporas encontradas cerca de la fuente de luz y se colocaron en un lado de un vidrio reloj de 10 cm de diámetro con Am 0,20 μm esterilizada en autoclave (en el lado opuesto a la fuente de luz). Después de 5-10 minutos se extrajo las esporas que habían alcanzado el otro lado del vidrio reloj. Se repitió esta etapa para asegurarse que las esporas estuvieran libres de todo microorganismo asociado.
- 10 6. Se recogieron las esporas y se añadieron a 10 ml de Am 0,20 μm esterilizada en autoclave. Se realizó el recuento de esporas en una cámara de Neubauer (células $\times \text{ml}^{-1}$)
7. Se añadió una cantidad de alrededor 2.800 esporas por pocillo (cámaras multipocillo de 6 mm de diámetro cada uno).
- Área del pocillo 0,28 $\text{cm}^2 \rightarrow 2,8 \times 10 \mu^2$.
- Si hay 2.800 esporas en 0,28 $\text{cm}^2 \rightarrow$ hay 10.000 esporas en 1 cm^2 .
- 15 Volumen por pocillo 200 $\mu\text{l} \rightarrow$ 2.800 esporas.
- 1000 $\mu\text{l} \rightarrow$ 14000 esporas.
8. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante dos horas en oscuridad para permitir el asentamiento de las esporas.
- 20 9. Se incubó durante 10-15 horas a temperatura ambiente y con luz natural y posteriormente se revisó bajo microscopio invertido para asegurarse que las esporas no hayan germinado.
10. Se extrajo el Am de los pocillos y se realizó el recuento de las esporas fijadas.
- Productos bacterianos que se van a usar: Productos extracelulares bacterianos de 3 bacterias perifíticas con actividad contra las micro-bioincrustaciones: *Pseudoalteromonas tunicata* (Pt), *Halomonas marina* (Hm), *Alteromonas* sp (Ni1 LEM) . Además se utilizó el sobrenadante de la bacteria *Halomonas* sp (NC1) como control positivo por no tener efecto negativo contra diatomeas.
 - Obtención de productos extracelulares: Se cultivó bacterias con actividad inhibitoria de las micro-bioincrustaciones en 1 litro de medio de cultivo mínimo (M9) hasta llegar a la fase estacionaria a temperatura ambiente. Los sobrenadantes bacterianos se cosecharon mediante centrifugación a 11.000 rpm x 15 minutos, se esterilizaron usando doble filtración a 0,22 μm . Posteriormente, dicho sobrenadante obtenido se divide en 6 porciones a las cuales se les realizará los siguientes tratamientos:
- 30 1. Sobrenadante A: Sobrenadante sin ningún tratamiento. (Pt, Hm, Ni1 LEM y NC1).
2. Sobrenadante B: Sobrenadante tratado a 100°C durante 20 minutos (Pt, Hm, Ni1 LEM).
3. Sobrenadante C: Sobrenadante dializado a 3.500 da. (Ni1 LEM) .
4. Sobrenadante D: Sobrenadante dializado a 10.000 da. (Ni1 LEM) .
- 35 5. Sobrenadante E: Sobrenadante dializado a 3.500 da Concentrado. (Ni1 LEM).
6. Sobrenadante F: Sobrenadante dializado a 10.000 da Concentrado. (Ni1 LEM).
- En relación con los controles estos serán: Control Am y Control M9.
- Control Am: Control agua de mar.
- Control M9: Control medio mínimo.
- 40 100°C= Productos extracelulares tratados a 100°C.
- Sob: Sobrenadantes sin ningún tratamiento.
- >3,500: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da.

>10,000: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da.

[3,500]: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da y concentrados.

[10,000]: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da y concentrados.

Los resultados por productos extracelulares bacterianos bioactivos son:

- 5
- *Pseudoalteromona tunicata* (Pt) : Efecto inhibitorio de la fijación de *Ulva lactuca*, termoestable.
 - *Halomonas marinas* (Hm): Efecto inhibitorio de la fijación de *Ulva lactuca*, termoestable. • *Halomonas sp* (NC1): Sin actividad inhibitoria.
 - *Alteromonas sp* (Ni1 LEM): Efecto inhibitorio de la fijación de *Ulva lactuca*, termoestable de un peso molecular mayor o igual a 3.500 dalton.

10 **Conclusión**

En base a la caracterización inicial mostrada en esta experiencia, el componente inhibitorio de la fijación de la macroalga cosmopolita *Ulva lactuca* producido por *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) tiene un peso molecular bajo, es termoestable, es soluble en agua y puede liberarse y transportarse de forma eficiente en el medio ambiente marino. El uso de estas sustancias tiene una potencial aplicación para prevenir la fijación de esta macroalga habitual de "bioincrustaciones".

15 Protocolo Experimental 3: En la figura 10 se ilustra el efecto de productos extracelulares bacterianos en la fijación de larvas de *Ciona intestinalis*.

El objetivo del presente experimento fue cuantificar y evaluar el efecto de productos extracelulares bacterianos en la fijación de larvas de *Ciona intestinalis* en sustrato de poliestireno.

20 • Productos bacterianos que se van a usar: Productos extracelulares bacterianos de 3 bacterias perifíticas con actividad contra las micro-bioincrustaciones: *Pseudoalteromona tunicata* (Pt), *Halomonas marina* (Hm), *Alteromonas sp* (Ni1 LEM). Además se utilizó el sobrenadante de la bacteria *Halomonas sp* (NC1) como control positivo por no tener efecto negativo contra diatomeas.

25 • Obtención de productos extracelulares: Se cultivó bacterias con actividad inhibitoria de las "micro-bioincrustaciones" en 1 litro de medio de cultivo mínimo (M9) hasta alcanzar la fase estacionaria a temperatura ambiente. Los sobrenadantes bacterianos se cosecharon mediante centrifugación a 11.000 rpm x 15 minutos, se esterilizaron a través de doble filtración a 0,22 µm. Posteriormente, este sobrenadante obtenido se divide en 6 porciones a las cuales se les aplicarán los siguientes tratamientos:

1. Sobrenadante A: Sobrenadante sin ningún tratamiento.
- 30 2. Sobrenadante B: Sobrenadante diluido en Am 1:2
3. Sobrenadante C: sobrenadante diluido en Am 1:10
4. Sobrenadante D: Sobrenadante calentado a 100°C por 20 minutos.
5. Sobrenadante E: Sobrenadante dializado a 3.500 da.
6. Sobrenadante F: Sobrenadante dializado a 10.000 da.

35 En relación con los controles, estos serán: Control agua de mar (Am) y Control medio mínimo (M9).

- Duración del experimento: 48 horas.
- Volumen por pocillo: 3 ml.
- Procedimiento: Se cultivó las cepas bacterianas seleccionadas en agitación en un litro de caldo VNSS durante 24 horas a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 13.200 g durante 30 minutos a 10°C y se descartó el sobrenadante. Se recolectó el sobrenadante y se filtró a 0,22 µm para el posterior uso de dichos sobrenadantes en los bioensayos con larvas de *Ciona intestinalis*. El sobrenadante en bruto se sometió a ensayo con dichas larvas, las diferentes diluciones del mismo (1:2; 1:10), los tratamientos dializados a 3.500 y 10.000 dalton se sometieron a ensayos con estas larvas (en una cantidad de 25-30 larvas por pocillo de la cámara multipocillo), se combinaron y después se incubaron durante 48 horas en oscuridad. Como control se realizaron bioensayos sin la

40

incorporación del sobrenadante celular (solamente con agua de mar y medio mínimo (M9)). Se realizó los recuentos de larvas (larvas fijadas) en un microscopio invertido con un aumento de 100 veces.

Control Am: Control agua de mar.

Control M9: Control medio mínimo.

5 100°C= Productos extracelulares tratados a 100°C.

Sob: Sobrenadantes sin ningún tratamiento.

>3,500: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da.

>10,000: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da.

Los resultados por productos extracelulares bacterianos bioactivos son:

- 10
- *Pseudoalteromona tunicata* (Pt) : Efecto inhibitorio de la fijación de *Ciona intestinalis*, termoestable.
 - *Halomonas marinas* (Hm): Efecto inhibitorio de la fijación de *Ciona intestinalis*, termoestable.
 - *Halomonas sp* (NC1): Sin actividad inhibitoria.
 - *Alteromonas sp* (Ni1 LEM): Efecto inhibitorio de *Ciona intestinalis*, termoestable, de un peso molecular menor o igual a 3.500 dalton.

15 Conclusión

Em base a la caracterización inicial presentada en esta experiencia, el componente antilarval producido por *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) tiene un peso molecular bajo, es termoestable, es soluble en agua y puede liberarse y transportarse de forma eficiente en el medio ambiente marino. El uso de estas sustancias tiene una potencial aplicación para prevenir la fijación de uno de los componentes comunes de las "macro- bioincrustaciones".

20 Protocolo Experimental 4: En la figura 11 se ilustra el efecto de productos extracelulares bacterianos en la fijación de larvas de *Pyura praeputialis*.

El objetivo del presente experimento fue cuantificar y evaluar el efecto de productos extracelulares bacterianos en la fijación de larvas de *Pyura praeputialis* en un sustrato de poliestireno.

25 • Productos bacterianos que se van a usar: Productos extracelulares bacterianos de 3 bacterias perifíticas con actividad contra las micro-bioincrustaciones: *Pseudoalteromona tunicata* (Pt), *Halomonas marina* (Hm), *Alteromona sp* (Ni1 LEM). Además se utilizó el sobrenadante de la bacteria *Halomonas sp* (NC1) como control positivo por no tener efecto negativo contra diatomeas.

30 • Obtención de los productos extracelulares: Se cultivó bacterias con actividad inhibitoria de las "micro-bioincrustaciones" fueron cultivadas en 1 litro de medio de cultivo mínimo (M9) hasta alcanzar la fase estacionaria a temperatura ambiente. Los sobrenadantes bacterianos se cosecharon mediante centrifugación a 11.000 rpm x 15 minutos, se esterilizaron a través de doble filtración a 0,22 µm. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se divide en 6 porciones a las cuales se aplicarán los siguientes tratamientos:

1. Sobrenadante A: Sobrenadante sin ningún tratamiento.
2. Sobrenadante B: Sobrenadante diluido en Am 1:2
- 35 3. Sobrenadante C: sobrenadante diluido en Am 1:10
4. Sobrenadante D: Sobrenadante tratado a 100°C durante 20 minutos.
5. Sobrenadante E: Sobrenadante dializado a 3.500 da.
6. Sobrenadante F: Sobrenadante dializado a 10.000 da.

En relación a los controles estos serán: Control agua de mar (Am) y Control medio minimo (M9).

40 • Duración del experimento: 24 horas.

• Volumen por pocillo: 3 ml.

- 5 • **Procedimiento:** Se Cultivó en un litro de caldo VNSS en agitación, las cepas bacterianas seleccionadas por 24 horas a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 13.200 g. durante 30 minutos a 10°C y se descartó el sobrenadante. Se recolectó el sobrenadante y se filtró a 0,22 µm para el posterior uso de estos sobrenadantes en los bioensayos con larvas de *Pyura praeputialis*. El sobrenadante en bruto se sometió a ensayo con dichas larvas, las diferentes diluciones del mismo (1:2; 1:10) y los tratamientos dializados a 3.500 y 10.000 dalton se sometieron a ensayo con estas larvas (en una cantidad de 20-25 larvas por pocillo de la cámara multipocillo), estas se combinaron y después se incubaron durante 24 horas en oscuridad. Como control se realizaron bioensayos sin la incorporación de sobrenadante celular (solamente con agua de mar y medio mínimo (M9)). Se realizó los recuentos de larvas fijadas en un microscopio invertido con un aumento de 100 veces.
- 10 Control Am: Control agua de mar.
Control M9: Control medio mínimo.
100°C= Productos extracelulares tratados a 100°C.
Sob: Sobrenadantes sin ningún tratamiento.
>3.500: Sobrenadantes dializados a 3.500 Da.
- 15 >10.000: Sobrenadantes dializados a 10.000 Da.
Los resultados por productos extracelulares bacterianos bioactivos son:
 - *Pseudoalteromona tunicata* (Pt) : Efecto inhibitorio de la fijación de *Pyura praeputialis* termoestable.
 - *Halomonas marinas* (Hm): Efecto inhibitorio de la fijación de *Pyura praeputialis*, termoestable.
 - *Halomonas sp* (NC1): Sin actividad inhibitoria.
- 20 • *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) : Efecto inhibitorio de *Pyura praeputialis*, termoestable, de un peso molecular menor o igual a 3.500 dalton.

Conclusión

- 25 En base a la caracterización inicial presentada en esta experiencia, el componente antilarval producido por *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) tiene un peso molecular bajo, es termoestable, es soluble en agua y puede ser liberado y transportado de forma eficiente en el medio ambiente marino. El uso de estas sustancias tiene una potencial aplicación para prevenir la fijación de este componente habitual de las "bioincrustaciones".

Protocolo Experimental 5: En la figura 12 se ilustra el efecto de productos extracelulares bacterianos en la fijación de larvas del mejillón *Semimytilus algosus*.

- 30 El objetivo del presente experimento fue cuantificar y evaluar el efecto de productos extracelulares bacterianos de la cepa *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) en la fijación de larvas de *Semimytilus algosus* en un sustrato de poliestireno.

- 35 • Obtención de los productos extracelulares: Los productos extracelulares bacterianos se obtuvieron cultivando las bacterias en caldo M9 (Medio mínimo: ácidos de Casaminoácidos 1 g, Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, NH₄Cl 1 g, NaCl 21 g. Se ajustó a pH 7,1 y se suplementó con una fuente carbono al 0,0065%, 10 ml de MgSO₄ 0,1M x 7 H₂O; 10 ml de de CaCl₂ 0,01M x 2 H₂O y B1 al 1%) durante 120 horas, en botellas de 1 litro. Después, el medio se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se cosechó en botellas tipo schott de 2 litros y posteriormente se congelaron a -20°C.

Monitorización de la fijación de *Semimytilus algosus* expuestos a la solución de productos extracelulares:

- 40 La Figura 13 muestra la cobertura por microincrustación in situ durante los días 7 y 14 de los productos extracelulares dializados a 3.500 y a 10.000 kDa de las bacterias Pt, Hm y Ni1. La Figura 14 muestra la presencia de clorofila en una biomasa en la microincrustación in situ durante los días 7 y 14 en una matriz de fitagel con productos extracelulares dializados a 3.500 y 10.000 Da de las bacterias Pt, Hm y Ni1.

El objetivo de este experimento es determinar la inhibición *in situ* de microorganismos epibiontes por productos extracelulares de bacterias marinas.

• Productos bacterianos que se van a usar: Productos obtenidos de las bacterias marinas *Pseudoalteromonas tunicata* (Pt), *Halomonas marina* (Hm) y *Alteromonas sp* (Ni1 LEM).

• Obtención de productos extracelulares:

5 Se cultivaron las bacterias marinas (Pt, Hm y Ni1 LEM) durante la noche, en caldo de cultivo de soja con triptona (TSB) a temperatura ambiente con agitación (60 rpm). Las bacterias se inocularon en 1 l de medio mínimo (M9) a una concentración de $1 \cdot 10^6$ cel/ml que contenían 500 g de conchas estériles de *Turritella cingulata* que se usaron como sustrato para el crecimiento bacteriano durante 5 días. Teniendo en cuenta que estas bacterias son de vida bentónica (adherida a cualquier superficie marina). Los productos se cosecharon mediante centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos. Luego, se filtraron a $0,2 \mu\text{m}$ y posteriormente se dializaron a 3.500 o 10.000 Da durante 24 horas.

• Duración del experimento: Catorce días.

15 • Procedimiento: Los productos dializados a 3.500 y 10.000 Da de cada bacteria se combinaron en Phytigel® sobre 6 láminas de policarbonato (2,5 x 7,5 cm) y se diluyeron a 1/10. Para los controles se reemplazó los productos por agua destilada y M9, además se agregó un concentrado 20 veces en rotavapor de la bacteria Ni1 LEM a 75°C durante 30 minutos solo hasta 7 días. Las láminas se colocaron en un recipiente de acrílico con un peso de 3 Kg de tal manera que puedan mantenerse sumergidas en la zona submareal en una playa de la costa del océano Pacífico. Se retiraron un número de láminas a los 7 y 14 días de cada tratamiento. Después, las láminas retiradas del mar se colocaron sobre una placa petri y se observaron en el microscopio invertido (Olympus IX 50) con un aumento total de 200X. Tomando fotografías de las láminas en un microscopio de campo claro (Olympus BX 51) y por último se determinó análisis de clorofila a utilizando la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975) en espectrofotómetro (ANTHIE Advanced).

Resultados

25 De las tres cepas utilizadas en el estudio, los productos extracelulares (PE) de Ni1 LEM dializados a 10.000 Da presentaron la menor cobertura de micro-bioincrustaciones a los 7 y 14 días con $9,4 \cdot 10^3$ y $1,26 \cdot 10^4$ células/cm², mientras que Hm fue de $1,3 \cdot 10^4$ respectivamente. La biomasa de Chl a en Hm dializada a 3.500 KDa a los 7 días fue de 72.56 Chl a mg/m³, en cambio a los 14 días se obtuvieron los menores valores en los tratamientos Hm dializada a 3.500 Da y Ni1 LEM dializado a 10.000 Da con valores de 88,55 y 93,77 Chl a mg/m³.

Conclusión

30 Los resultados muestran una fuerte inhibición *in situ* de microorganismos epibiontes de los PE de *Alteromonas sp* (Ni1 LEM) y *Halomonas marina* (Hm) utilizando dializados a 10.000

Da.

Protocolo Experimental 7: Efecto de los productos extracelulares bacterianos inmovilizados en Phytigel® sobre las "micro-bioincrustaciones" en las figuras 15 y 16.

Objetivos:

- 35
1. Evaluar el efecto de bacterias marinas sobre de las "micro-bioincrustaciones."
 2. Determinar de manera preliminar el extracto mayor actividad "anti-bioincrustaciones".

Productos extracelulares bacterianos que se van a usar:

- 40
1. *Pseudoalteromonas tunicata* (Pt)
 2. *Halomona marina* (Hm)
 3. Ni1-LEM (*Alteromonas sp*)

Obtención de productos extracelulares:

45 Se obtuvieron las fracciones extracelulares de las cepas bacterianas Pt, Hm, Ni1-LEM. Éstas se cultivaron hasta la fase estacionaria en medio mínimo (M9) con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 11.000 rpm por 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante o fracción extracelular se filtró dos veces a $0,2 \mu\text{m}$ y se almacenó a -20°C.

Preparación de la matriz inerte:

5 Para el control de adherencia a la matriz, 0,326 g de Phytigel®, se diluyeron en 20 ml de agua libre de nucleasas utilizando un mezclador eléctrico. La mezcla se calienta por 60 segundos en un microondas. Paralelamente los extractos se calientan y se mantienen en un baño María a 45-50°C, y se incorporan a la solución de Phytigel® en una dilución de 1:10. La matriz con los extractos se incorporan en placas de poliestireno de 30 mm de diámetro, para preparar pastillas y una vez solidificadas estas pastillas son retiradas de las placas, y colocadas en un estanque de 1.000 litros de agua de mar con un flujo constante de 1 litro x 15 segundos.

Duración del experimento: 14 días.

Procedimiento:

10 1. Las pastillas de Phytigel que contienen los extractos, los controles de M9 y los controles de Phytigel se fijaron a tubos de PVC sumergidos en el estanque de 1000 litros con flujo constante. Se recuperaron semanalmente pastillas con los extractos y los respectivos controles. Se registró el peso de cada pastilla antes y después de la exposición a las macro-bioincrustaciones, utilizando una balanza analítica Sartorius BP-221S. Los resultados se registraron como % de adherencia de organismos sobre las pastillas de Phytigel®.

15 La concentración de proteínas en los extractos bacterianos obtenidos se midió mediante absorción a 562 nm (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce) . Se utilizó un espectrofotómetro SECOMAN (Anthelie Advanced).

20 El porcentaje de adherencia de las "micro- bioincrustaciones" durante la primera semana, se mantuvo constante para todos los tratamientos, registrándose para la segunda semana una disminución para las bacterias probadas y para el control Phytigel®, no así para el control M9, el cual se mantuvo similar a la primera semana. Los productos extracelulares de la bacteria Ni1 LEM registraron los valores más bajos durante el transcurso del experimento.

CONCLUSIÓN

25 La concentración de proteínas de las "micro- bioincrustaciones" fijadas o adheridas a las pastillas de Phytigel® con los productos extracelulares de la bacteria Ni1 LEM, fue la menor registrada, con 21,4 µg/ml para la primera semana y con 59,2 µg/ml para la segunda semana del experimento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto extracelular anti-bioincrustaciones contra invertebrados marinos habituales de las bioincrustaciones, que comprende un extracto del sobrenadante de cultivo de *Alteromonas sp* n° de acceso NRRL B-30784.
2. Producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto corresponde al sobrenadante tratado de dicho cultivo de *Alteromonas sp* n° de acceso NRRL B-30784 y en el que dicho sobrenadante se ha filtrado o sometido a calentamiento o a diálisis.
- 10 3. Producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el extracto corresponde a dicho sobrenadante, el cual se ha filtrado dos veces a través de un filtro de 0,22 µm.
4. Producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el extracto corresponde al sobrenadante dializado a través de membranas de diálisis.
- 15 5. Producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha membrana de diálisis se selecciona del grupo formado por las membranas de diálisis que tienen un tamaño de exclusión comprendido en el intervalo de 3.500 a 10.000 Da.
6. Producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el que dicha membrana de diálisis tiene un tamaño de exclusión de 3.500 Da.
7. Composición anti-bioincrustaciones, que comprende el producto extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un biopolímero.
- 20 8. La composición anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho producto extracelular está comprendido en una proporción desde alrededor 1:2 a 1:10 v/v, en base al volumen final del producto en forma de gel.
- 25 9. La composición anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha proporción de producto extracelular está comprendida en una proporción desde alrededor 1:2 a 1:5 v/v, en base al volumen final del producto en forma de gel.
10. La composición anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha proporción de producto extracelular está comprendida en una proporción de alrededor 1:2 v/v, en base al volumen final del producto en forma de gel.
- 30 11. Uso del producto extracelular anti- bioincrustaciones de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, para inhibir las micro-bioincrustaciones y las macro- bioincrustaciones.
12. El uso del producto extracelular anti- bioincrustaciones o a la reivindicación 11, en el que dichas macro-bioincrustaciones se producen por la fijación o adherencia de uno o más organismos seleccionados del grupo formado por *Ulva lactuca*, *Pyura praeputialis*, *Ciona intestinalis* y *Semimytilus algosus*.
- 35 13. El uso del producto extracelular anti- bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichas micro-bioincrustaciones se producen por la fijación o adherencia de uno o más organismos seleccionados del grupo formado por *Nitzschia sp1*, *Amphora sp*, *Cylindroteca closterium*, *Nitzschia ovalis amott*, *Chaetoceros minutissimus*, *Navicula sp1*, *Navicula sp2* y *Nitzschia sp2*.
14. Procedimiento para preparar un producto extracelular anti-bioincrustaciones, que comprende las etapas de:
- 40 a) aislar el sobrenadante de un cultivo de *Alteromonas sp* n° de acceso NRRL B-30784;
- b) filtrar dos veces el sobrenadante obtenido a través de una membrana de 0,22 µm.
15. El procedimiento para preparar un producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho procedimiento además comprende la etapa de calentar dicho sobrenadante reobtenido en la etapa b) a 100°C durante 20 minutos.
- 45 16. El procedimiento para preparar un producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho procedimiento además comprende la etapa de dializar dicho sobrenadante obtenidoe la etapa a través de una membrana de diálisis de 3.500 Da.

17. El procedimiento para preparar un producto extracelular anti-bioincrustaciones de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho procedimiento además comprende la etapa de concentrar 20 veces dicho dializado.

Figura 1
% Adherencia de *Nitzschia sp1*

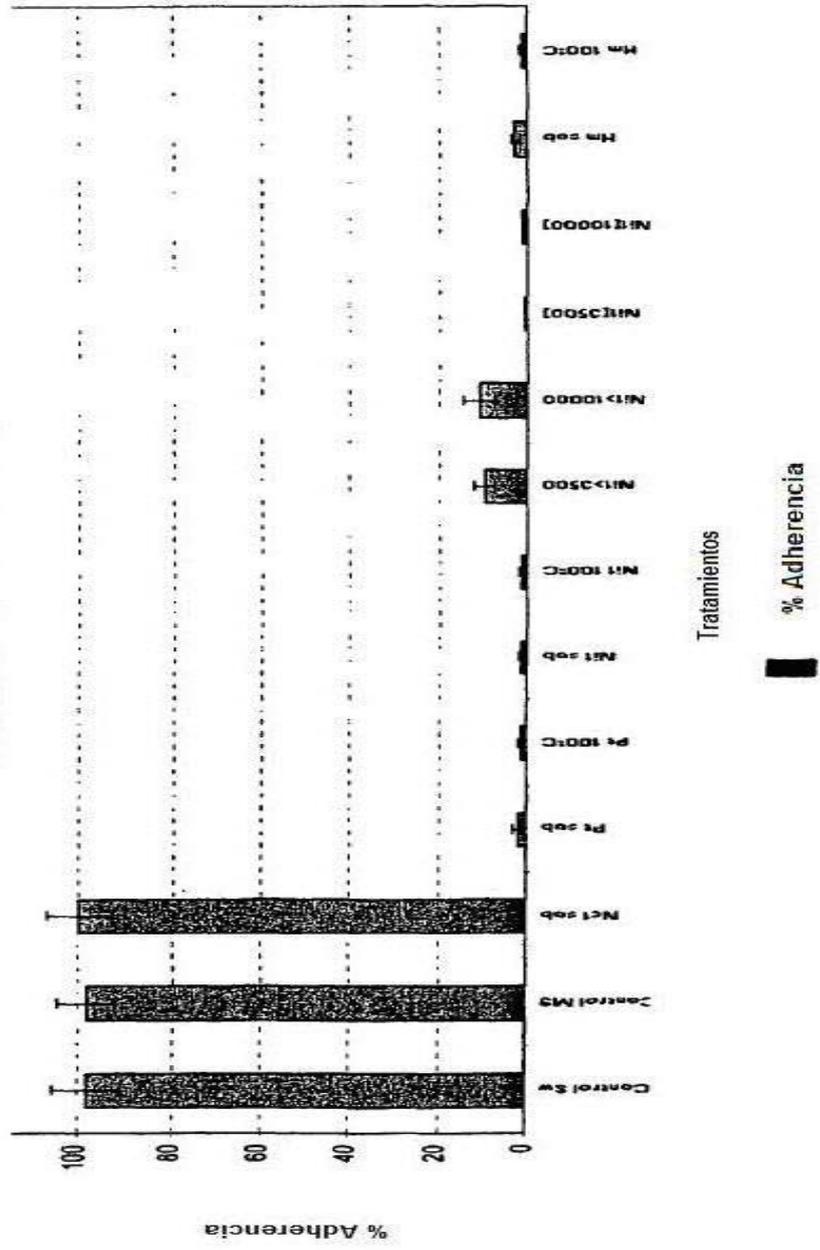


Figura 2
% Adherencia de *Amphora sp*

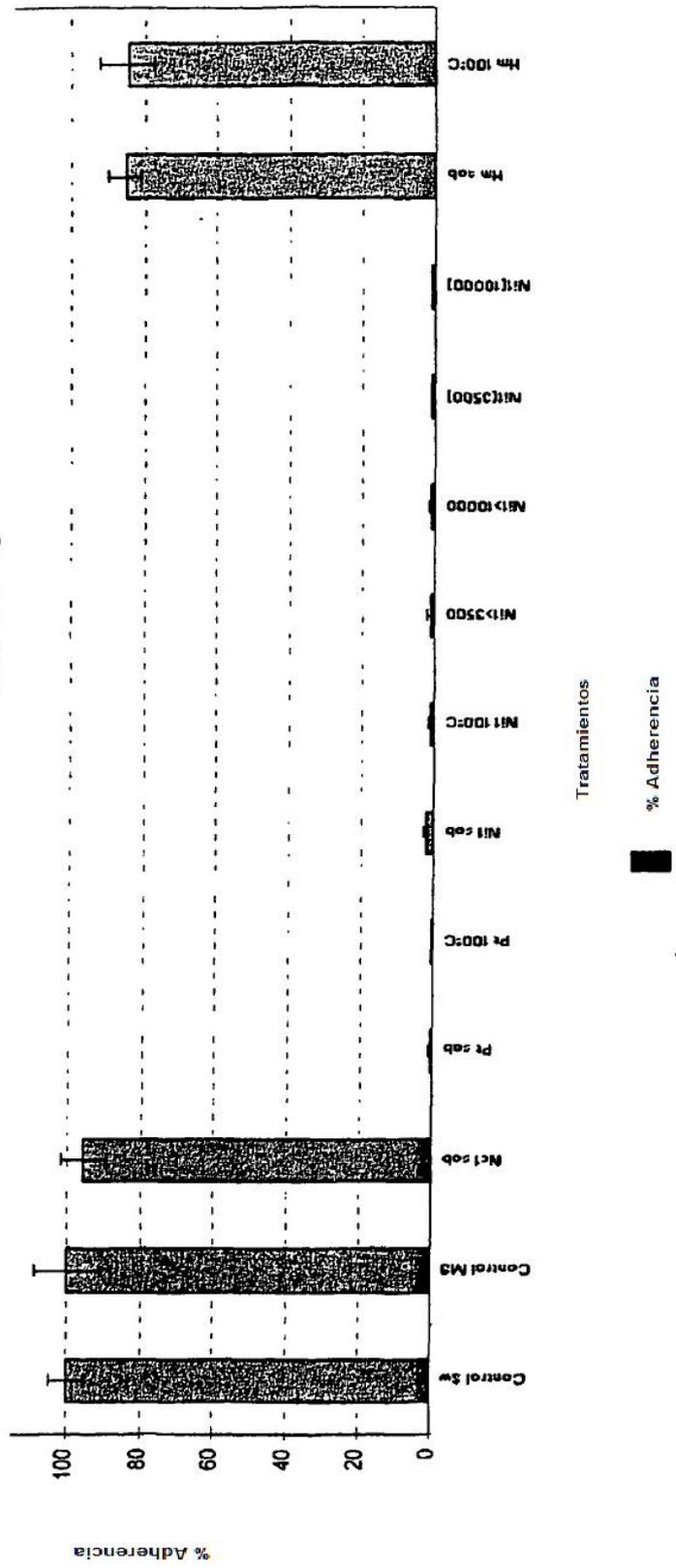


Figura 3

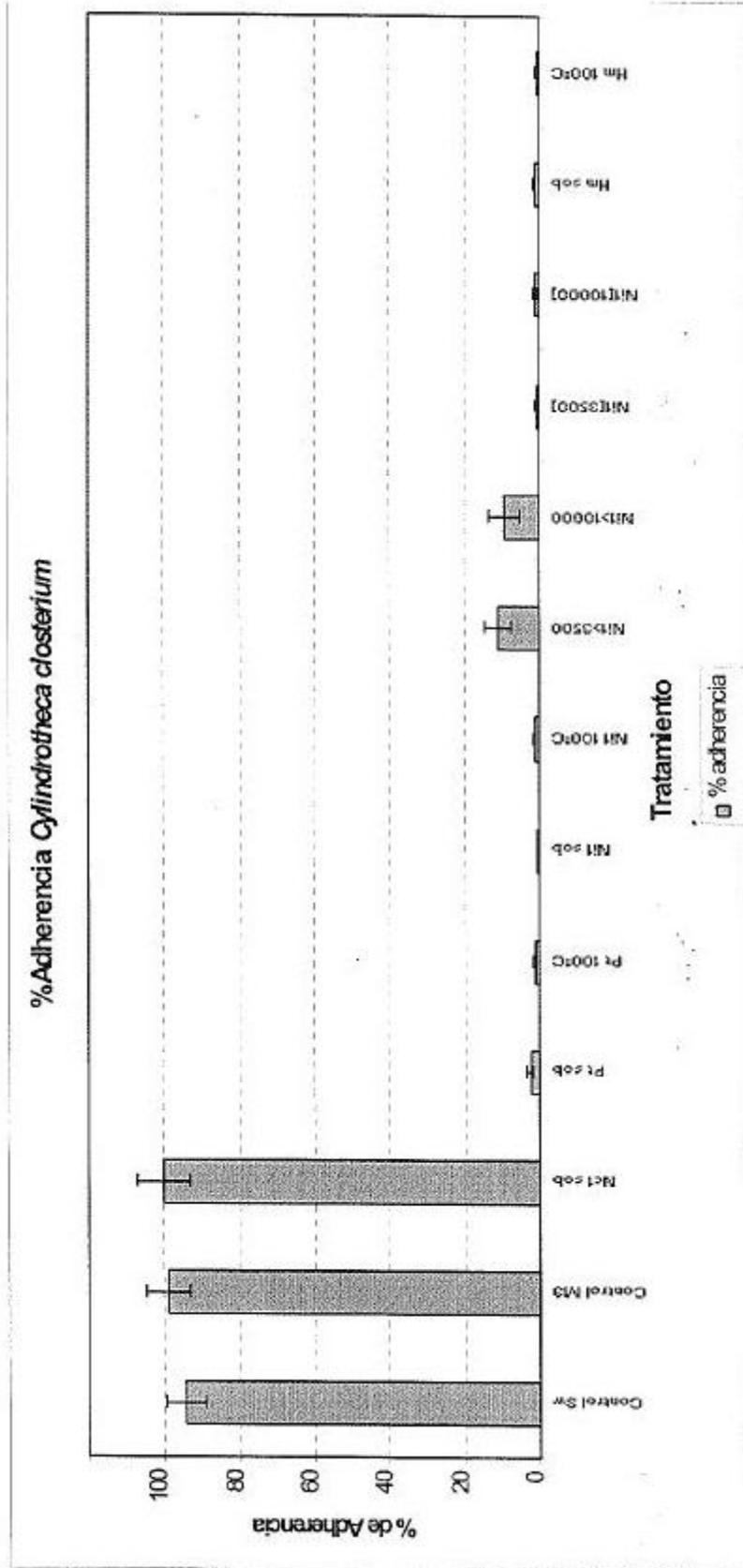


Figura 4

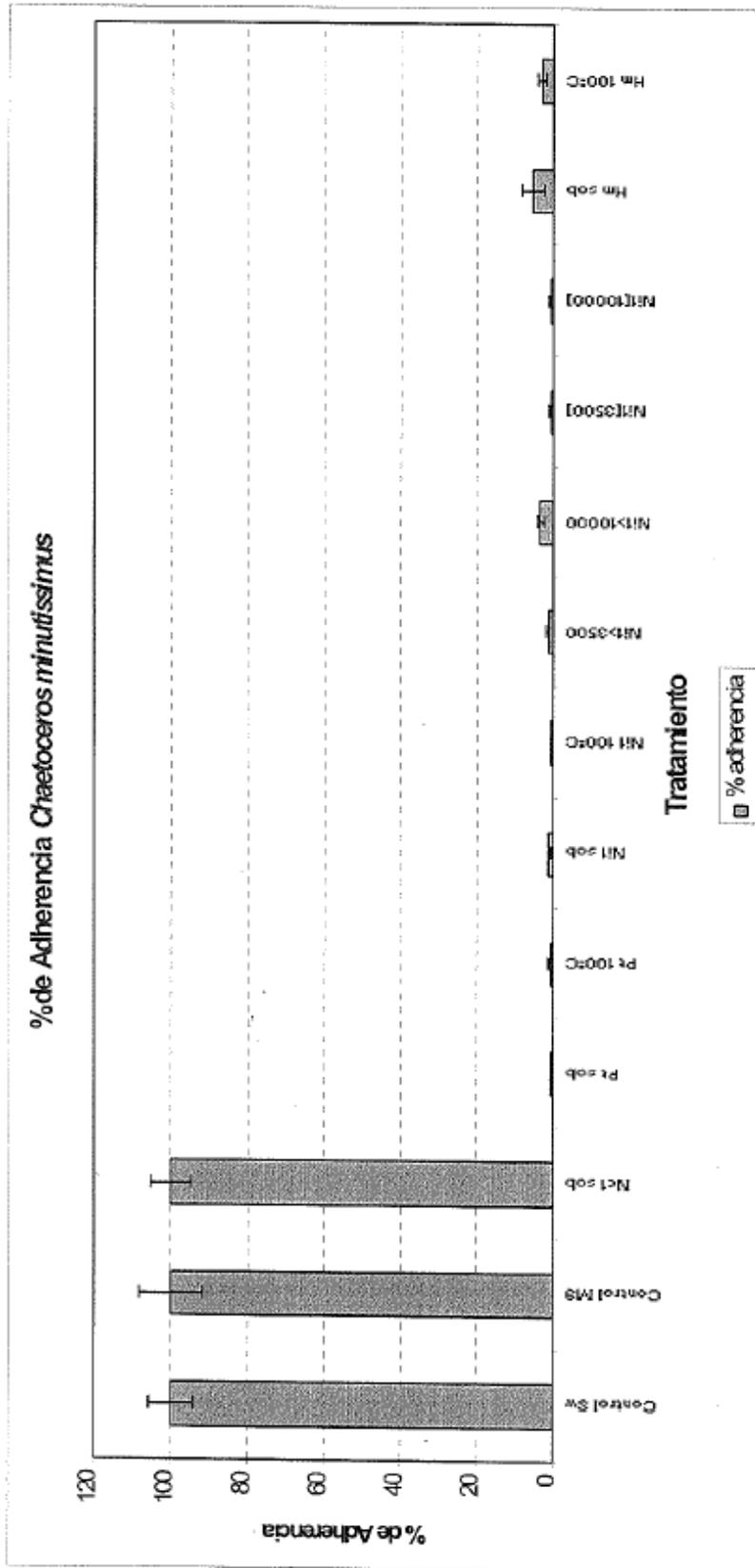


Figura 5

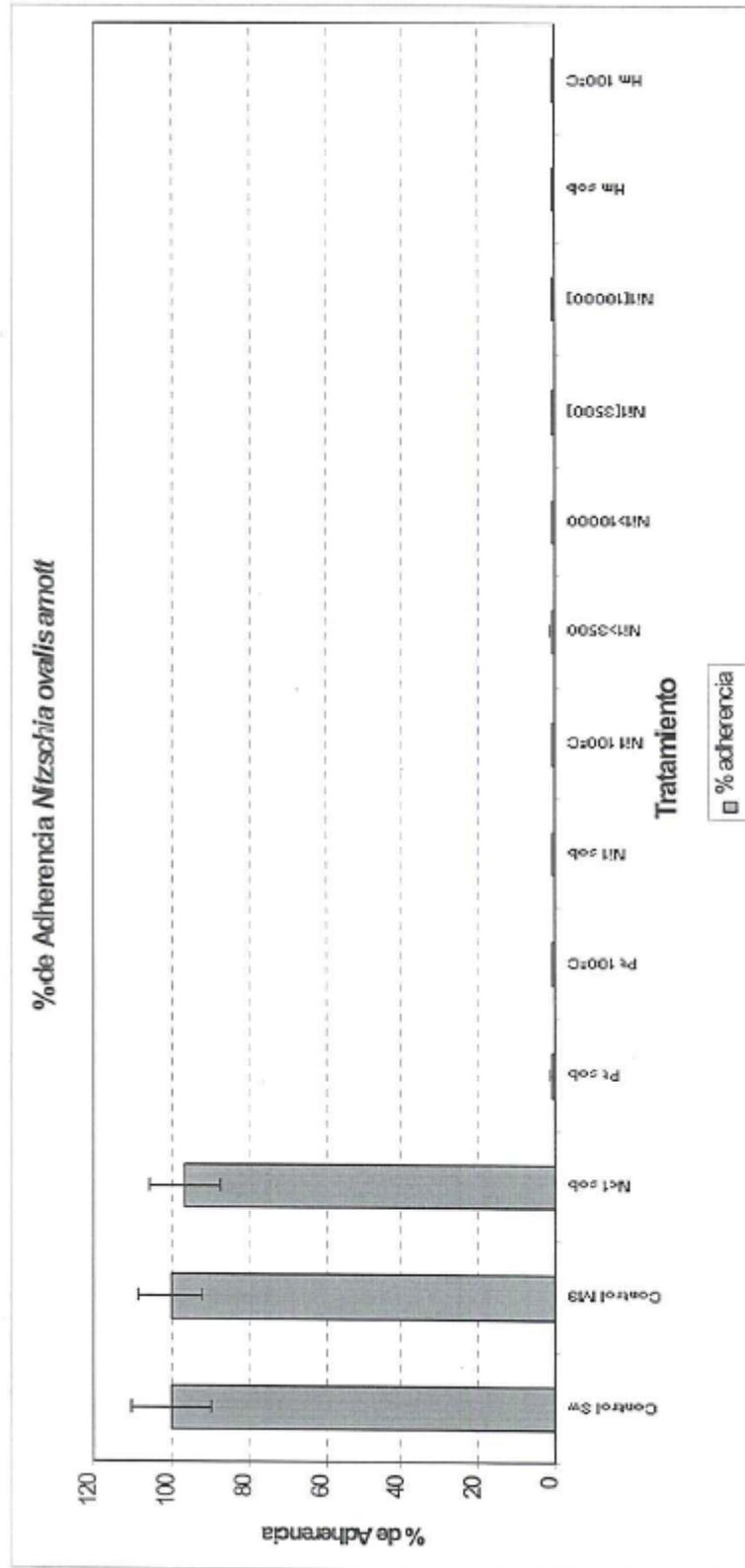


Figura 6
%Adherencia *Navicula sp1*

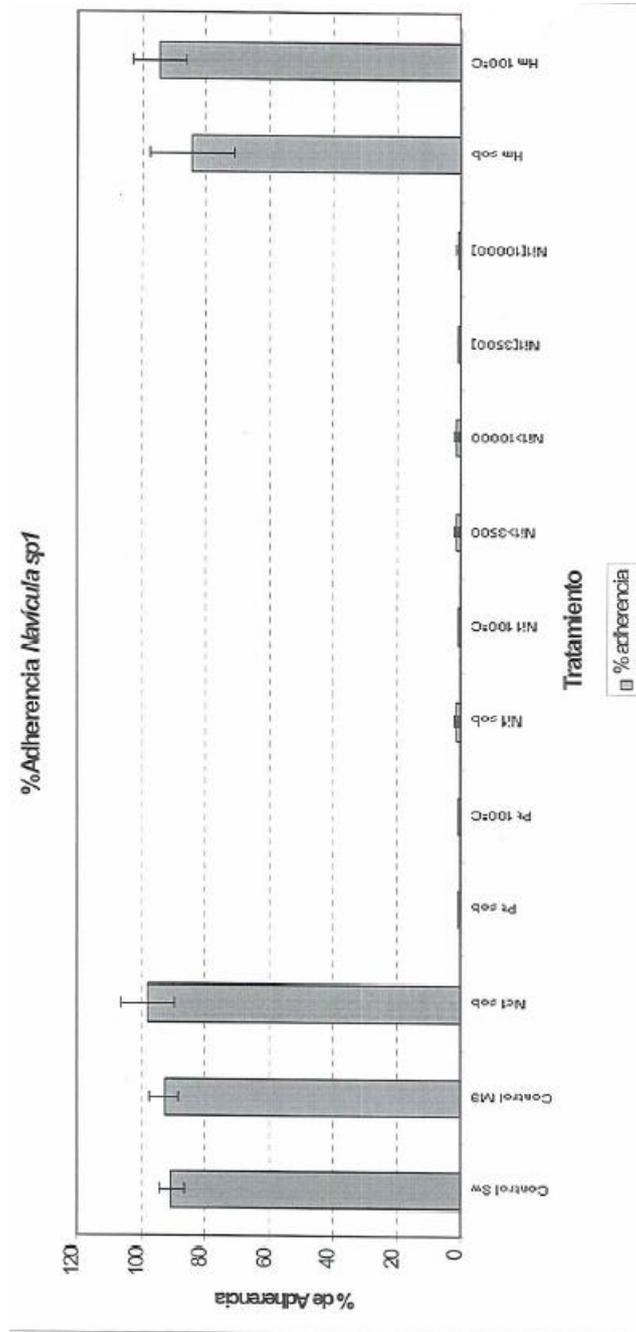


Figura 7

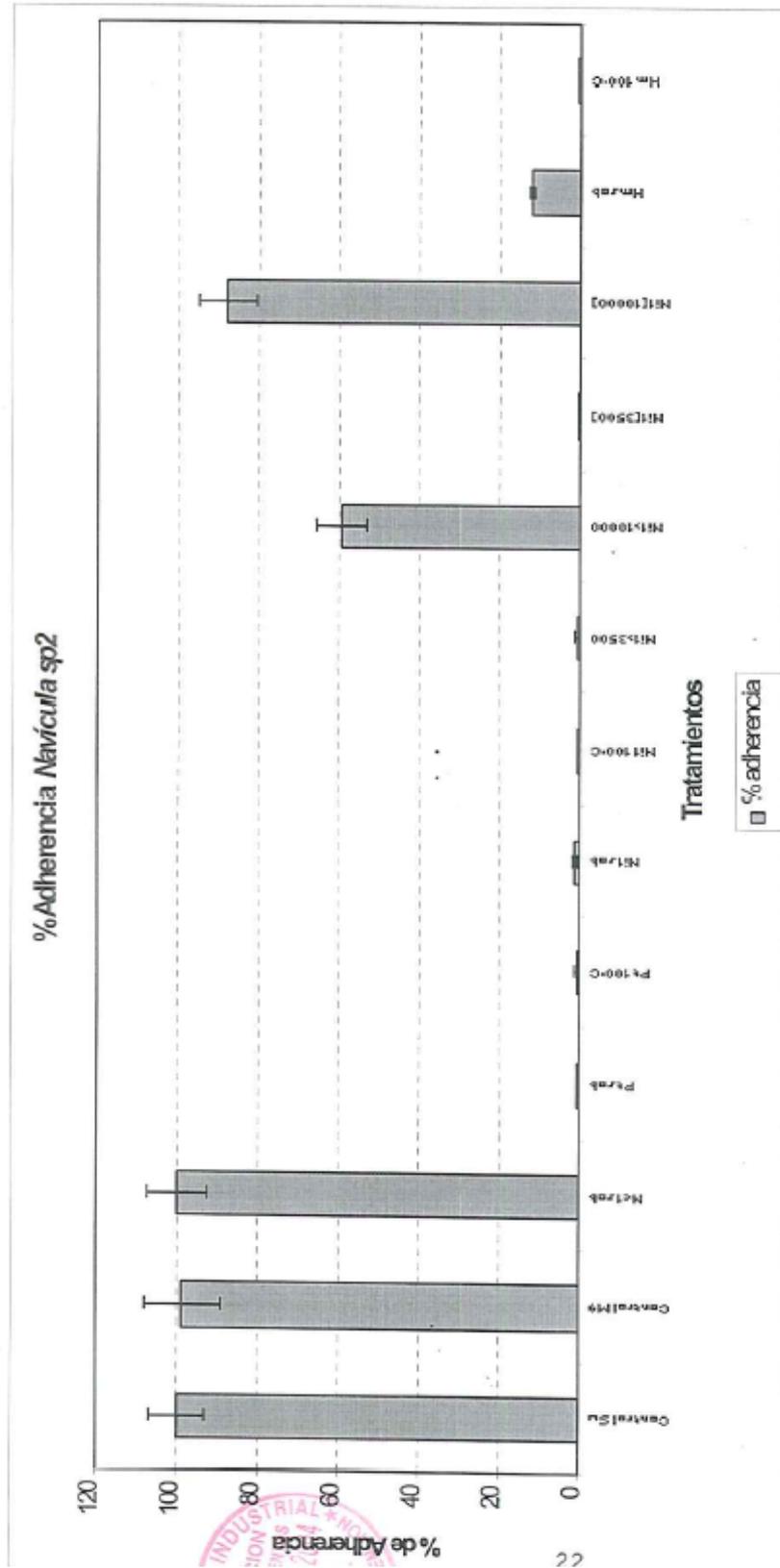


Figura 9

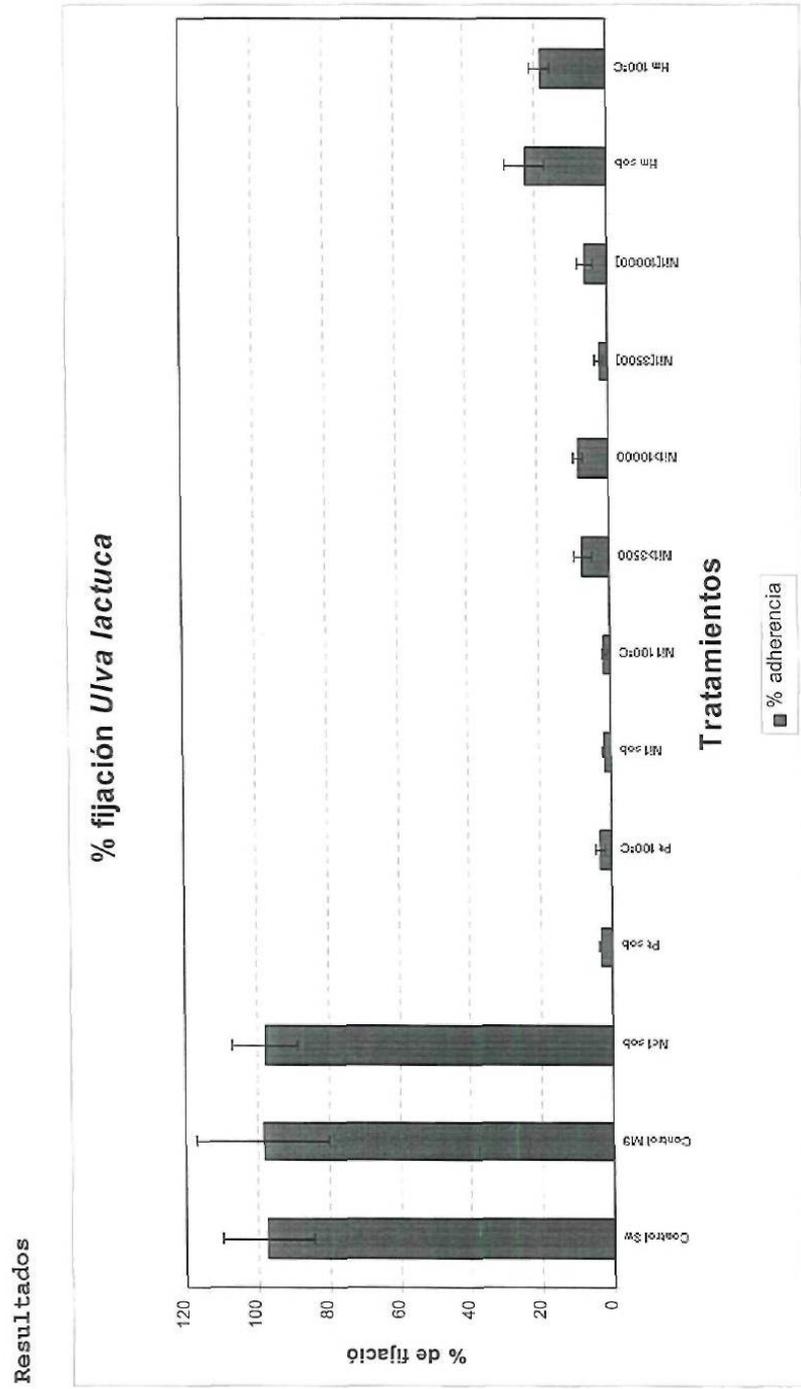


Figura 10

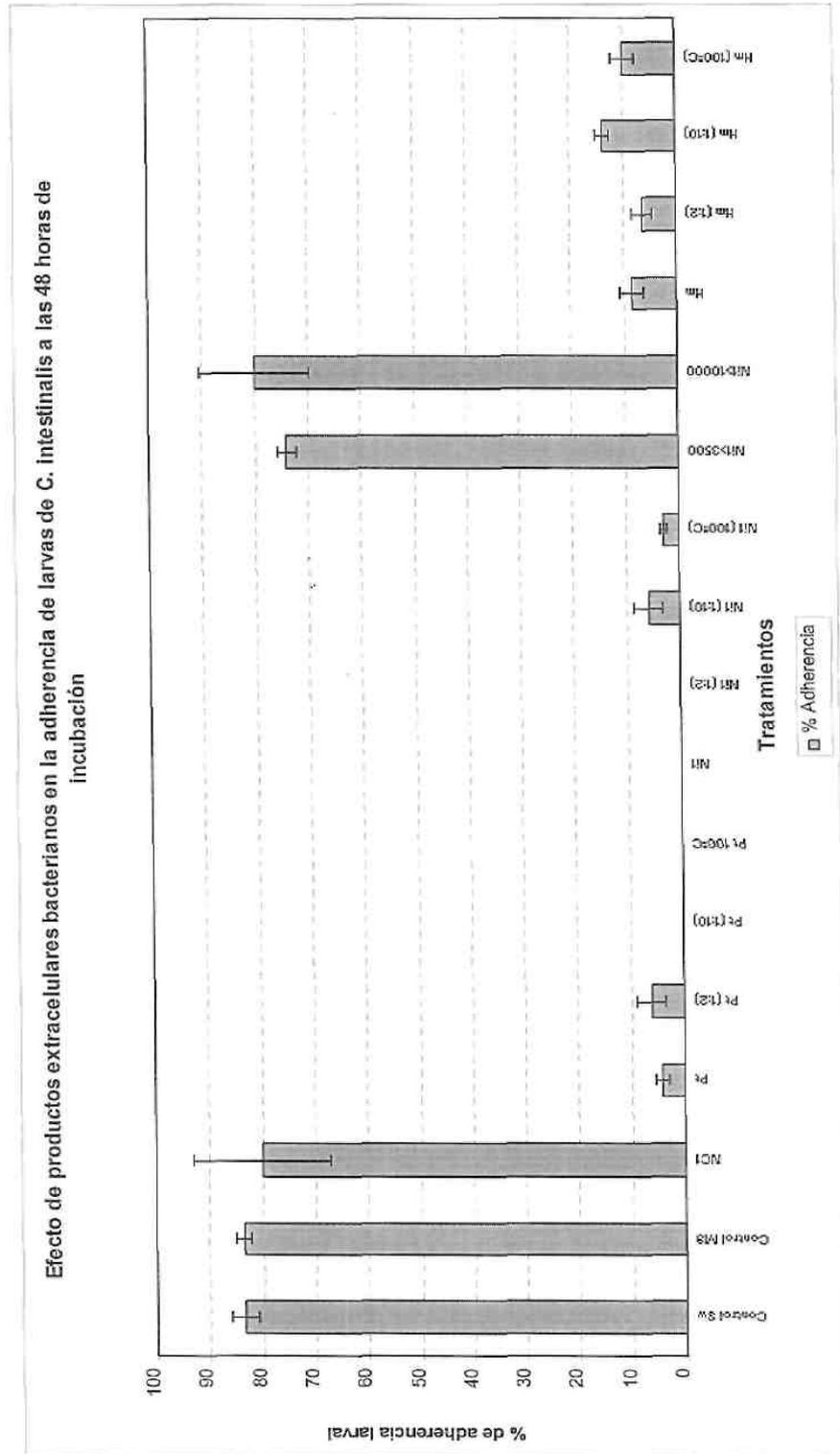


Figura 11

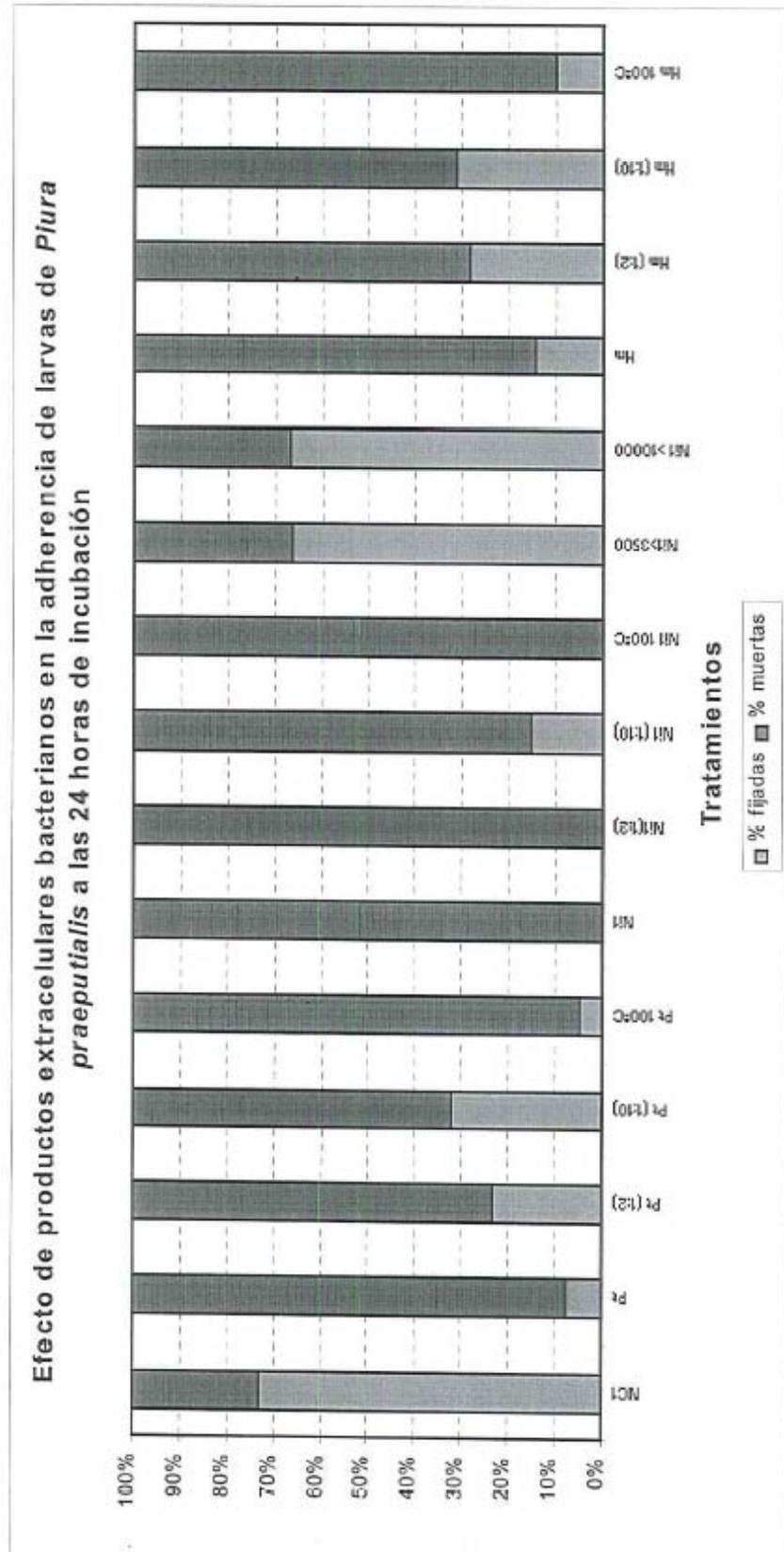


Figura 12

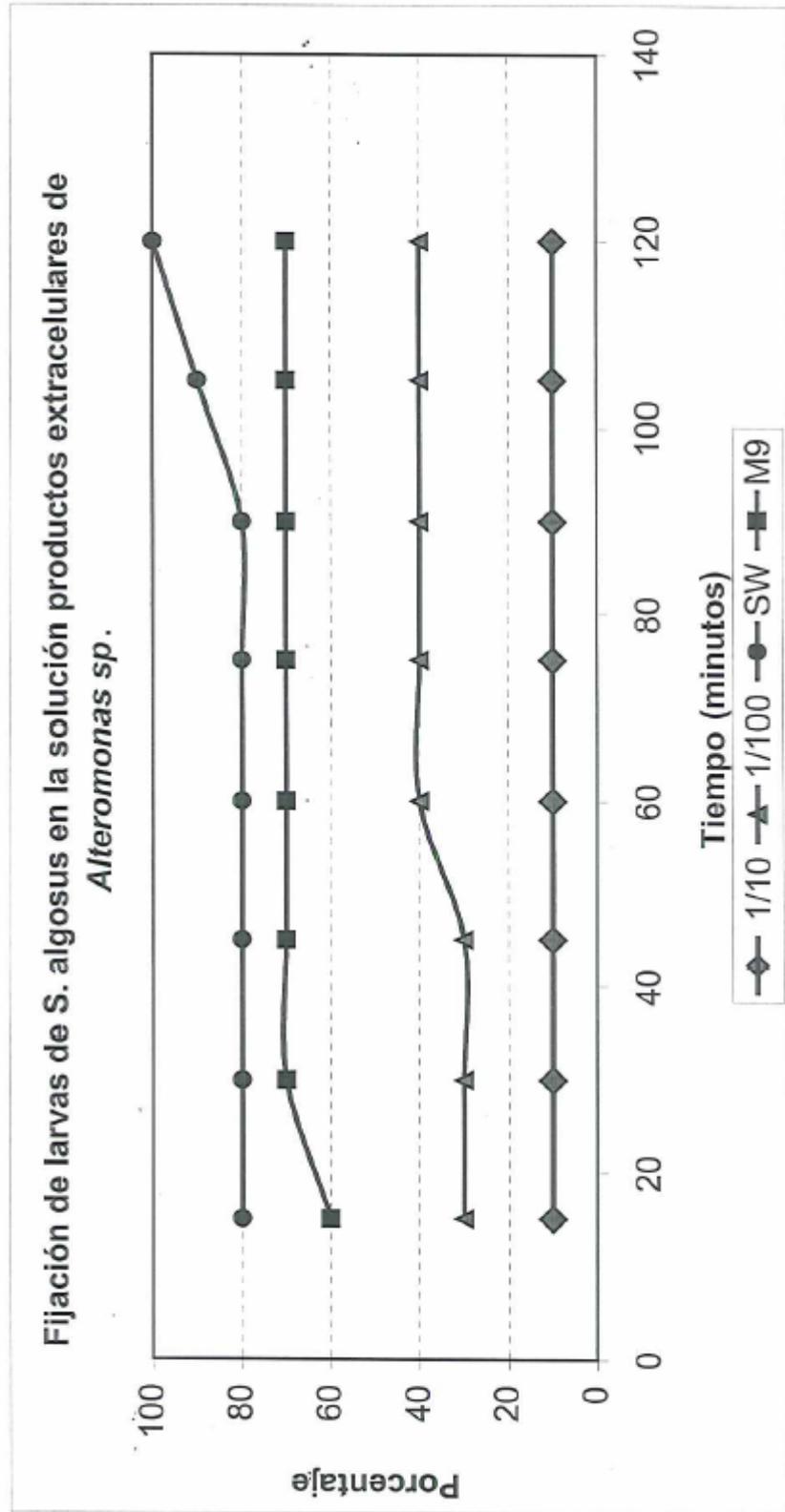


Figura 14

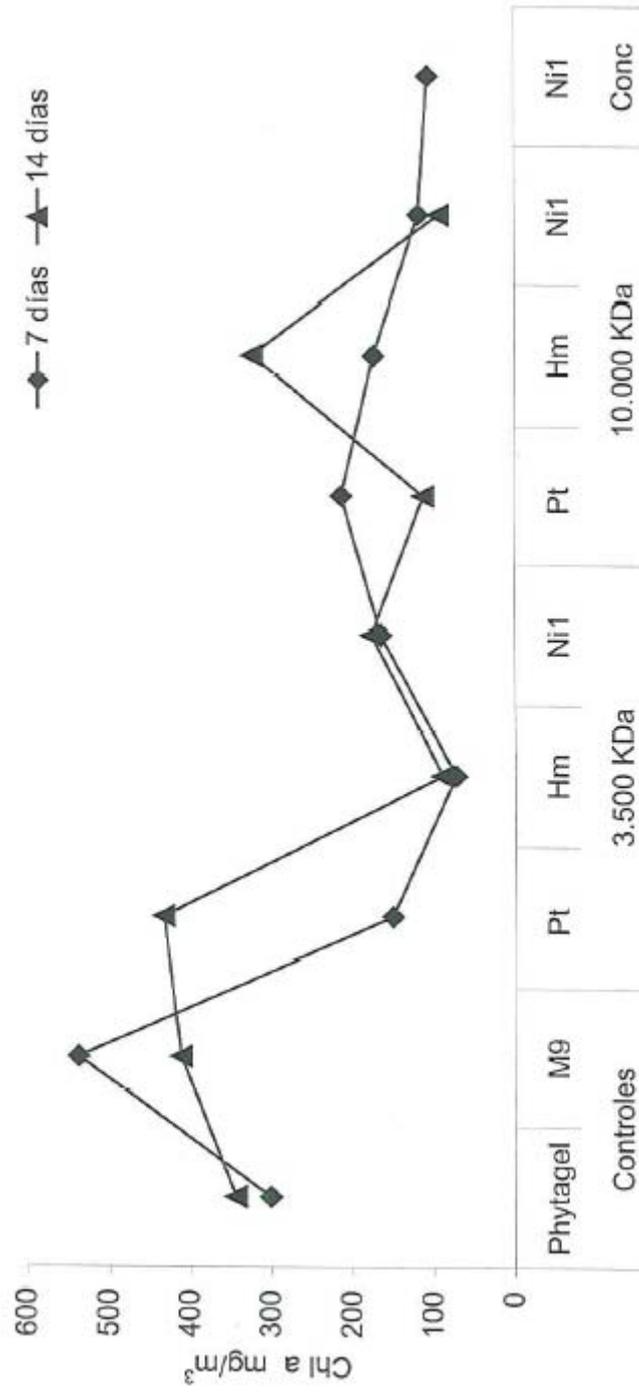
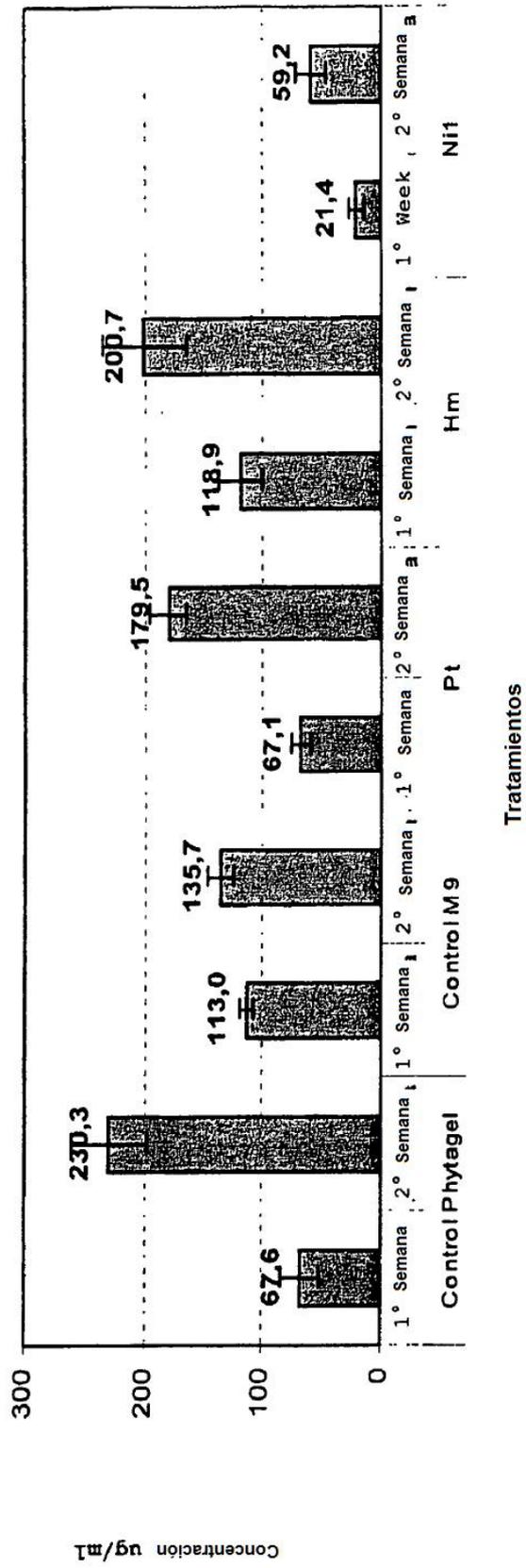
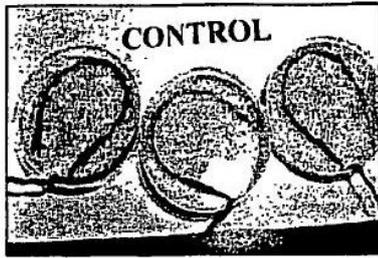
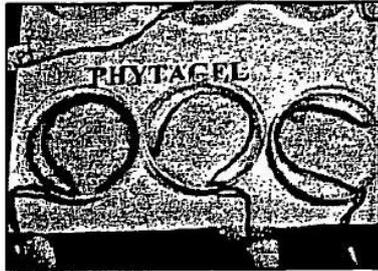


Figura 15
 Concentración de proteínas de la microincrustación adherida a la pastilla de Phytage|®

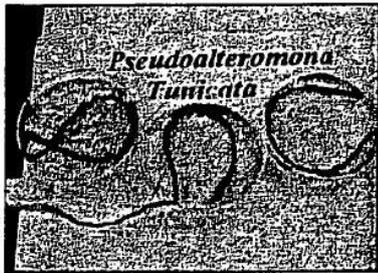




A) Control M9 la segunda semana .



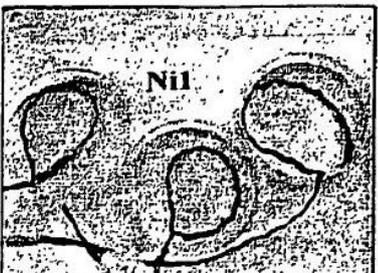
B) Control con Phytigel la segunda semana



C) Pt la segunda semana .



D) Hm la segunda semana .



E) Nil LEM la segunda semana .

Figura 16