

## Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas

### Antibacterial and antifungal activity from extracts of Venezuelan marine algae

Nurby Ríos\*<sup>1</sup>, Gerardo Medina<sup>2</sup>, José Jiménez<sup>2</sup>, Carlos Yáñez<sup>3</sup>, María Y. García<sup>3</sup>,  
María L. Di Bernardo<sup>3</sup>, María Gualtieri<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Investigación Dr. Ramón Massini Osuna. Cátedra de Medicamentos Orgánicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Apartado postal 5101. Teléfono: 01158-274-2403486. Fax: 01158-274-2403453. \*Email Nurby Ríos: nurby1728@hotmail.com

2 Instituto de Investigaciones- Sección Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

3 GITAEF. Grupo de Investigación en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

#### Resumen

En este trabajo se evaluaron las propiedades bioactivas antibacterianas y antimicóticas de 33 extractos (etanol, diclorometano, hexano) obtenidos de 11 especies de algas marinas recolectadas en las localidades de San Juan de Los Cayos y Chichiriviche, Estado Falcón, Venezuela. La actividad antibiótica y antimicótica de los extractos se evaluó mediante la aparición de halos de inhibición contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) y el hongo *Candida albicans*. De los 33 extractos ensayados sólo 17 presentaron actividad antibacteriana (5 con etanol, 6 con diclorometano y 6 con hexano), resultando activos 14 frente a las especies Gram(-) y 4 contra la especie Gram(+). Las especies algales que mostraron actividad antibacteriana fueron: *Acanthophora* sp., *Bryothamnion triquetrum*, *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp., *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa* sp., *Caulerpa* spp., *Halimeda incrassata*, *Ulva* sp., *Codium decortatum*, *Sargassum* sp. Ninguno de los extractos de algas ensayados presentó actividad antimicótica sobre *Candida albicans*. Los resultados obtenidos permiten concluir que las algas de la costa occidental de Venezuela, presentan compuestos bioactivos con actividad antibacteriana.

**Palabras Claves:** compuestos bioactivos, algas marinas, propiedades bioactivas.

#### Abstract

This study assessed the antibacterial and antifungal properties of 33 extracts (ethanol, dichloromethane, hexane) from 11 species of marine algae collected in the villages of San Juan de Los Cayos and Chichiriviche, Estado Falcon, Venezuela. The antibiotics and antifungal activity of extracts was evaluated by the appearance of halos of inhibition against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) and the fungus *Candida albicans*. Of the 33 tested extracts showed antibacterial activity only 17 (5 with ethanol, 6 and 6 with dichloromethane-hexane), resulting assets compared to 14 species Gram(-) and 4 against the kind Gram(+). The algae species that showed antibacterial activity were: *Acanthophora* sp., *Bryothamnion triquetrum*, *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp., *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa* sp., *Caulerpa* spp., *Halimeda incrassata*, *Ulva* sp., *Codium decortatum*, *Sargassum* sp.. None of the tested extracts from algae introduced antifungal activity on *Candida albicans*. The findings suggest that the algae on the west coast in Venezuela have bioactive compounds with antibacterial activity.

**Keywords:** bioactive compounds, marine algae, bioactive properties

Presentado: 13/05/2009  
Aceptado: 23/06/2009  
Publicado online: 28/08/2009

#### Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos (Aruoma et al., 2003). Numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos (Bhakuni & Silva 1974, Faulkner 1984, Stein & Borden 1984, Hay 1996), en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos (Carlucci et al. 1999), con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardioprotectores, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes (Freile 2001) entre otros.

A partir de las algas han sido aislados compuestos con actividad antibacteriana como: el ácido acrílico obtenido de *Phaeocystis pouchetii* (Sieburth 1960), ácido  $\lambda$ -linolénico en de los extractos metanólicos de *Spirulina platensis* (Colla et al. 2004), y *Chlorococcum* HS-101 (Ohta et al. 1993, 1994). Lima-Filho et al. (2002) ensayaron la actividad antibacteriana de extractos de hexano, cloroformo y etanol por el método de difusión en disco de 6 macroalgas marinas; los resultados obtenidos demostraron que todos los extractos con solventes orgánicos de *Amansia multifidica* inhibieron tanto las especies Gram(-) *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. cholerae-suis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae* como las bacterias Gram(+) *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados de la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los ex-

tractos en etanol, diclorometano y hexano de 11 algas marinas recolectadas en las costas del Estado Falcón, Venezuela.

#### Materiales y métodos

##### Muestras

Para la elaboración del presente estudio, se recolectaron 11 algas marinas en San Juan de Los Cayos y Chichiriviche, Estado Falcón, Venezuela, (Tabla 1), durante el periodo comprendido entre agosto y noviembre del año 2003. Las muestras botánicas fueron desecadas, prensadas, tratadas, determinadas, rotuladas, y depositadas en el Herbario MERF Luis Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

##### Recolección y preparación de las muestras

El material recolectado fue lavado con agua de mar para remover el exceso de arena y organismos epífitos, luego se colocó en bolsas de plástico, drenando el exceso de agua por gravedad. Las algas se transportaron en hielo hasta el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde se congelaron y almacenaron en un refrigerador hasta su uso. Previo al procesamiento las muestras fueron descongeladas, y limpiadas manualmente con agua destilada para eliminar arena, epífitos y fauna que no pudo ser eliminada en el lavado *in situ*.

##### Extracción de los compuestos bioactivos

Las algas se secaron durante 24 horas a temperatura ambiente y aquellas que no secaron en este periodo de tiempo fueron

**Tabla 1.** Especies de microalgas analizadas, número de colección, lugar de recolección y coordenadas.

Orden	Especie	N° colección	Localidad	Coordenadas
Ceramiales	<i>Acanthophora</i> sp.	1	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68°20' 07"W
Ceramiales	<i>Bryothamnion triquetrum</i> (S.G. Gmelin)	2	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68°20' 07"W
Gigartinales	<i>Gracilaria</i> sp.	3	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68°20' 07"W
Gelidiales	<i>Gelidium</i> sp.	4	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68°20' 07"W
Bryopsidales	<i>Caulerpa mexicana</i> Sonder ex Kützinger	5	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Bryopsidales	<i>Caulerpa</i> sp.	6	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Bryopsidales	<i>Caulerpa</i> spp.	7	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Bryopsidales	<i>Codium decortcatum</i> (Woodward) M.A. Howe	9	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Bryopsidales	<i>Halimeda incrassata</i> (J. Ellis) J.V. Lamouroux	10	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Ulvales	<i>Ulva</i> sp.	8	San Juan de Los Cayos	10° 58' 24"N, 68° 20' 07"W
Fucales	<i>Sargassum</i> sp.	11	Cayo Sal, Chichiriviche	10° 56' 00"N, 68° 15' 45"W

colocadas en estufa a 40 °C durante 24 horas, una vez secas se procedió a la preparación de los extractos de la siguiente manera: Las algas se trituraron cada una por separado en un molino, y el polvo obtenido se pesó y almacenó en bolsas de papel. Este material fue sometido a extracción continua en un Extractor de Soxhlet. El proceso de extracción se realizó empleando de 1 a 5 g de polvo de alga y solventes de baja (hexano), mediana (diclorometano), y alta (etanol) polaridad. El extracto obtenido se sometió a concentración a presión reducida para separar el solvente, luego el residuo se resuspendió con 2 mL del solvente con el cual se realizó la extracción (etanol, hexano, diclorometano). Un mililitro de este extracto se colocó en un tubo Eppendorf y se evaporó a temperatura ambiente, posteriormente se procedió a pesar el residuo y resuspenderlo con 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y cantidad suficiente de agua destilada para 1 mL (1000 µL).

#### Activación de las cepas y efecto bactericida

Las cepas (Tabla 2) fueron aisladas de cuñas de un medio de agar conservación tripticasa de soya, y sembradas en caldo Myuller Hinton, dejándolas crecer por 12 h. Posteriormente se midió la densidad óptica a 600 nm para verificar la fase de crecimiento de la cepa. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo por triplicado (De Lara-Isassi et al. 1989) en capsulas de Petri usando agar Myuller Hinton. En estas se agregó una mezcla de 2 mL de agar Myuller Hinton y 1 mL de un cultivo de 12 h en caldo Myuller Hinton de cada una de las cepas para obtener así, un crecimiento confluyente sobre toda la placa (Medina, 1994). A continuación se procedió a colocar sobre las placas, ya sembradas con cada una de las cepas, 2 µL del extracto, se dejó secar y se incubó a 37 °C por 24 h. La actividad antibacteriana se midió por la presencia de un halo de inhibición del crecimiento; además se colocaron como controles el solvente de extracción y el solvente con el cual se resuspendido el residuo.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas ensayadas con los extractos de macroalgas.

Microorganismos	
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

#### Activación del hongo y efecto antimicótico

El hongo fue aislado de un medio de conservación y sembrado en caldo dextrosa Sabouraud, dejándolo crecer por 12 h a 37 °C, posteriormente se midió la densidad óptica a 600 nm para verificar la fase de crecimiento de la cepa. El ensayo se realizó por triplicado (De Lara-Isassi et al. 1989) en capsulas de Petri usando agar dextrosa Sabouraud. En estas se agregó una mezcla de 2 mL del mismo agar y 1 mL del cultivo de 12 h de *Cándida albicans* en caldo dextrosa Sabouraud para obtener así un crecimiento confluyente sobre toda la placa (Medina, 1994) luego de haber incubado por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, se procedió a colocar sobre las placas ya sembradas, 2 µL del extracto, se dejó secar y se incubó a 37 °C por 24 horas. La actividad antifúngica se evaluó por la presencia de un halo de inhibición. Se colocaron como controles el solvente de extracción y el solvente con el cual se resuspendió el residuo en el Eppendorf.

#### Resultados y discusión

##### Actividad antibacteriana

De los 33 extractos ensayados, 17 inhibieron el crecimiento de las bacterias empleadas, mientras que 16 de los extractos no presentaron actividad antibacteriana. De los 17 extractos con actividad antibacteriana, 6 extractos con hexano, 6 con diclorometano y 5 con etanol inhibieron el crecimiento de las cepas (Tabla 3). Solo 14 extractos de los 17 fueron activos contra las especies Gram negativas y 4 contra la especie Gram positiva. Las bacterias que reportaron sensibilidad fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativas) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva).

Se observó notoria actividad sobre *S. aureus* del extracto en hexano de *Sargassum* sp. en comparación con los extractos en etanol de *Acanthophora* sp., y *Caulerpa* spp.

Entre los extractos con potencial antibacteriano contra la cepa *Pseudomonas aeruginosa* se encontraron tres en etanol (*B. triquetrum*, *Acanthophora* sp., *Caulerpa* spp.), uno en diclorometano (*Acanthophora* sp.), y uno en hexano (*Caulerpa maxima*), siendo los 2 últimos extractos los más relevantes.

*Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria más sensible a los extractos ensayados. Los extractos en diclorometano de *Codium decortcatum*, *Gelidium* sp., y *Halimeda incrassata* causaron inhibición moderada, e igual efecto presentaron los extractos

**Tabla 3.** Actividad antibacteriana mostrada por los extractos algales sobre las cepas. Diámetros de inhibición: (-) <6 mm ninguna actividad antibacteriana; (1+) 6—8 mm poca actividad antibacteriana; (2+) 8—10 mm mediana actividad antibacteriana; (3+) 10—14 mm alta actividad antibacteriana.

Extracto	Alga	Gram Negativas			Gram Positivas
		<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Etanol	<i>Acanthophora</i> sp.	1+	-	-	1+
	<i>B. triquetrum</i>	3+	-	-	-
	<i>Gracilaria</i> sp.	-	2+	-	-
	<i>Caulerpa</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Caulerpa</i> spp.	1+	-	-	1+
Diclorometano	<i>Acanthophora</i> sp.	3+	3+	-	-
	<i>Gelidium</i> sp.	-	2+	-	-
	<i>Caulerpa</i> spp.	-	-	-	1+
	<i>Ulva</i> sp.	-	3+	-	-
	<i>C. decorticatum</i>	-	2+	-	-
	<i>H. incrassata</i>	-	2+	-	-
Hexano	<i>Gracilaria</i> sp.	-	1+	-	-
	<i>Gelidium</i> sp.	-	3+	-	-
	<i>C. mexicana</i>	3+	-	-	-
	<i>Ulva</i> sp.	-	3+	-	-
	<i>H. incrassata</i>	-	2+	-	-
	<i>Sargassum</i> sp.	-	-	-	3+

etanólicos de *Gracilaria* sp. y hexénico de *Halimeda incrassata*, por el contrario los extractos en diclorometano de *Acanthophora* sp., en diclorometano y en hexano de *Ulva* sp. y en hexano de *Gelidium* sp. mostraron la mayor inhibición sobre la cepa.

#### Actividad antimicótica.

Ninguno de los extractos de algas ensayados presentó actividad antimicótica sobre *Cándida albicans*.

La actividad antibacteriana puede ser considerada como un indicador de la capacidad del alga marina para sintetizar compuestos bioactivos de interés terapéutico, aunque esta actividad puede depender tanto de la especie como de la extracción eficiente de los compuestos bioactivos (González et al. 2001, Lima-Filho et al. 2002). Los trabajos dirigidos a evaluar el potencial antibacteriano de extractos algales, mencionan que el proceso de extracción en caliente con solventes orgánicos como etanol ofrecen mayores ventajas en la obtención de sustancias bioactivas (Vlachos et al., 1996; González et al. 2001). Así mismo, la adición del extracto en pocillos realizados en el agar es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad del extracto, facilitando la evaluación del potencial antibacteriano (Magallanes et al. 2003).

Los resultados obtenidos permiten afirmar que especies del *Phylum*, *Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Phaeophyta*, son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano, iguales resultados presenta Magallanes et al., 2003. Estas especies se sumarían a las reportadas por Balta (1988, citado en Magallanes et al. 2003) *Enteromorpha intestinales*, y *Polysiphonia paniculata*, como algas con potencial bioactivo.

Las algas pardas y rojas resultaron ser los grupos con mayor número de especies con potencial antibacteriano, esto coincide con estudios realizados por Kumar & Rengasamy (2000) al sur de África, Italia e India. Aunque en nuestro caso los extractos de algas verdes ensayados también mostraron actividad bactericida. Nagayama et al. (2002) encuentran que los taninos presentes en

algas marinas son los responsables de la actividad antibacteriana o bactericida sobre bacterias patógenas y *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes.

La mayoría de las investigaciones realizadas con extractos crudos de algas marinas (Rao & Parekh 1981, Vlachos et al. 1996, González et al. 2001) mencionan gran actividad contra bacterias Gram positivas. Entre ellas, el *S. aureus* es considerada como una de las especies más susceptibles a los exudados y extractos algales (Vlachos et al. 1996). Esto concuerda con nuestros resultados, los cuales evidenciaron inhibición del crecimiento de la cepa de *S. aureus*. La otra especie que presentó actividad sobre esta bacteria fue *Caulerpa* spp., resultado que coincide con lo reportado por Freile et al (2001), quienes hacen responsables de dicha actividad sobre las bacterias Gram (+) a los compuestos caulerpin y caulerpicina presentes en esta alga marina.

Los extractos con hexano de *Ulva* sp., *Caulerpa prolifera*, *Gracilaria* sp. no crearon halos de inhibición sobre *S. aureus* y *Ps. aeruginosa* resultados que coinciden con la investigación de Lima-Filho et al (2002) los cuales evaluaron la actividad antibacteriana de extractos obtenidos con los solventes orgánicos de hexano, cloroformo y etanol de seis macroalgas (*Rhodophyta* y *Chlorophyta*) recolectadas en las costas del estado Ceará, Brazil. Hornsey & Hide (1974), reportaron que especies de *Chlorophyta* tienen un gran espectro de actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo cual coincide con nuestros resultados. Pesando & Caram (1984), Padmini et al. (1988) y Campos et al. (1988), sugieren que la diferencia de sensibilidad entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas se debe a la naturaleza química de los extractos.

El alto porcentaje de especies activas encontradas nos confirma la existencia de sustancias de origen algal con actividad biológica y nos muestra el potencial que tienen las algas para ser estudiado. En este estudio no se apreció la inhibición del hongo *Cándida albicans* por parte de alguno de los extractos ensayados.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) Mérida, Venezuela por el financiamiento para el Proyecto: FA-328-04-03-EM. Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, Adscrito al Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT)

## Literatura citada

- Aruoma O.I., T. Bahorun & L.S. Jen. 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, 544:203-215.
- Bhakuni D. & M. Silva. 1974. Biodynamic substances from marine flora. *Botanica Marina*, 27: 40-51.
- Carlucci M., L. Scolaro & E. Damonte. 1999. Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes Simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. *Chemotherapy*, 45: 429-436.
- Colla L., T. Bertolin & J. Costa. 2004. Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperature and Nitrogen Concentrations. *Zeitschrift fuer Naturforsch*, 59: 55-59.
- Campos G., M. Diu, M. Koenig, & E. Pereira. 1988. Screening of marine algae from Brazilian northeastern coast for antimicrobial activity. *Botanica Marina*, 31: 375- 377.
- De Lara-Issasi G., A. Sobrino-Figueroa, C. Lozano-Ramírez, M. Ponce & E. Dreckman. 1989. Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de la costa de Michoacán, México. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Univ. Oriente*, 28: 99-104.
- Faulkner D. 1984. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Journal of Natural Products*, 1: 251-280.
- Freile Y. (2001). Algas en la "Botica". *Rev. Avance y Perspectiva*. 20,283-293. <<http://www.eclipse.red.Cinvestav.mx/publicaciones/avaper/sepoct/ALGAS.pdf>> (Acceso 22/02/2004)
- González A., G. Platas, A. Basilio, et al. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol*, 4:35-40.
- Hay M. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 103-134.
- Hornsey I. & D. Hide. 1974. The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *British Phycological Journal*, 9: 353-361.
- Kumar K. & R. Rengasamy. 2000. Evaluation of antibacterial potencial of seaweeds occurring along the coast of Tamil Nadu, India against the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae p.v. oryzae* (Ishiyama) Dye. *Botanica Marina*, 43: 409-415.
- Lima-Filho J.V.M., A.F.F.U. Carvalho, S.M. Freitas & V.M.M. Melo. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz. J. Microbiol.* 33(4): 311-314
- Magallanes C., C. Córdova, R. Orozco. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa del Perú. *Revista peruana de Biología*, 10: 125-132.
- Medina G. 1994. Estudio Bioquímico y Determinación de la Actividad Biológica de Extractos de Algas Marinas. Trabajo de ascenso. Universidad de los Andes. Mérida, pp. 1-94.
- Nagayama K., I. Yoshitoshi, S. Toshiyuki, H. Izumi & N. Takashi. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 889-893.
- Ohta S., T. Chang, N. Ikegami, M. Kondo & H. Miyata. 1993. Antibiotic Substance Produced by a Newly Isolated Marine Microalga, *Chlorella* HS-101. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 50:171-178.
- Ohta S., T. Chang, A. Kawashima, et al. 1994. Anti Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity by Linolenic Acid Isolated from the Marine Microalga *Chlorella* HS-101. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 673-680.
- Padmini P., P. Sreenivasa, M. Karmarkar. 1988. Antibacterial activity from Indian species of *Sargassum*. *Botanica Marina*, 31: 295-298.
- Pesando D. & B. Caram. 1984. Screening of Marine Algae from the French Mediterranean Coast for Antibacterial and Antifungal Activity. *Botanica Marina*, 27: 381-386.
- Rao P. & K. Parekh, 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. *Botánica Marina*, 24: 577-582.
- Sieburth J. 1960. Acrylic Acid, an "Antibiotic" Principle in *Phaeocystis* Blooms in Antarctic Waters. *Science*, 132: 676-677.
- Stein J. & C. Borden. 1984. Causative and beneficial algae in human disease conditions: a review. *Phycologia*, 23: 485-501.
- Vlachos V., A. Critchley & A. Holy. 1996. Establishment of protocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae. *Microbios*, 88: 115-123.