

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y SU RELACION CON LA MICROALGA *Chaetoceros  
muelleri* (Bacillariophyceae) EN CULTIVO ESTÁTICO**

**TESIS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**JULIETA DEL CARMEN GARCÍA LÓPEZ**

Ensenada, Baja California, Mexico, Julio de 2007

TESIS DEFENDIDA POR  
**Julieta del Carmen García López**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



M. en C. María Victoria Orozco Borbón  
*Director del Comité*



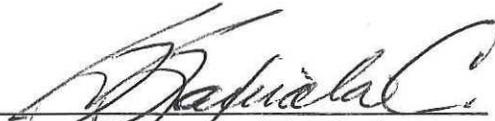
M. en C. Enrique Valenzuela Espinoza  
*Miembro del Comité*



Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
*Miembro del Comité*



Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez  
*Miembro del Comité*



Dr. Gilberto Gaxiola Castro  
*Miembro del Comité*



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

*Coordinador del Programa de  
Posgrado en Ciencias con  
Orientación en Acuicultura*



Dr. Edgar Gerardo Pavía López

*Director de Estudios de Posgrado*

9 de Julio de 2007

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

---

**ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y SU RELACIÓN CON LA MICROALGA *Chaetoceros  
muelleri* (Bacillariophyceae) EN CULTIVO ESTÁTICO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

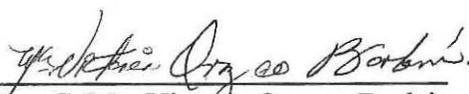
**JULIETA DEL CARMEN GARCÍA LÓPEZ**

Ensenada, Baja California, México, Julio del 2007.

**RESUMEN** de la tesis de **Julieta del Carmen García López**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Julio, 2007.

**ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y SU RELACIÓN CON LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) EN CULTIVO ESTÁTICO.**

Resumen aprobado por:

  
M. en C. Ma. Victoria Orozco Borbón  
Director de Tesis

Las microalgas son importantes en el desarrollo de la acuicultura, dentro de éstas, la diatomea *Chaetoceros muelleri* es una de las especies más utilizadas en los laboratorios dedicados a esta actividad. En el cultivo de organismos acuáticos frecuentemente se encuentra el desarrollo de bacterias y, en algunas ocasiones, pueden presentarse especies patógenas como el género *Vibrio*, por lo cual, es necesario realizar un control riguroso de las condiciones de cultivo, principalmente en lo concerniente a la calidad de agua y la fuente de alimentación. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue determinar la relación que existe entre la carga bacteriana y *Chaetoceros muelleri* en cultivo estático. Se realizó un cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri* el cual fue escalado hasta 400 L, se determinó el crecimiento microalgal, la concentración de nutrientes (nitratos, nitrito, amonio), abundancia de bacterias heterótrofas, *Vibrio*, nitrificantes y bacterias totales. La mayor tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de la microalga se presentó en los primeros días de cultivo (de 0.88 a 2.29). Las mayores densidades celulares fueron de  $6.3$  a  $7.6 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> coincidiendo con la mayor abundancia de bacterias heterótrofas y totales. La alta correlación encontrada en los primeros tres niveles indica una relación entre microalgas y bacterias. La correlación negativa en columna ( $r = 0.2734$ ) se puede explicar por variables ambientales cuando la temperatura disminuyó de 21.5 a 18.5 °C. El consumo total de nitratos fue mayor en 2 L (97.8 %) y 18 L (98 %) que en 400 mL (60.8 %) y 400 L (59.8 %). Se encontró una sucesión de bacterias nitrificantes, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* lo cual indica procesos de nitrificación. La abundancia de bacterias no afectó el cultivo de microalgas sin embargo es necesario establecer un control sanitario en estos cultivos ya que las bacterias pueden crecer asociadas a los mismos.

Palabras clave: *Chaetoceros muelleri*, abundancia de bacterias, concentración de nutrientes

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Julieta del Carmen García López** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. July, 2007.

**ABUNDANCE OF BACTERIA AND RELATION WITH MICROALGAE *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) IN BATCH CULTURE.**

Abstract approved by:

  
M. en C. Ma. Victoria Orozco Borbón  
Thesis Supervisor

The microalgae is important in the development of the aquaculture, within these, the diatom *Chaetoceros muelleri* is one of the most common species in laboratories dedicated to this activity. Bacteria development frequently is in aquatic organism's culture and in occasions, pathogenic species can appear like the *Vibrio* then is necessary to make a rigorous control in the culture conditions, mainly water quality and the power supply. Due to this, the primary goal of this work was to determine the relation that exists between the bacteria load and *Chaetoceros muelleri* in batch culture. Cultures of *Chaetoceros* were scaled up to 400 L. The microalgal growth was determined, the nutrients concentration (nitrates, nitrites, ammonium), heterotrophic bacteria abundance, *Vibrio*, nitrifying and total bacteria's. The greater specific growth rate ( $\mu$ ) was register in the first two days of culture (from 0.88 to 2.29). The greater cellular densities were from 6.3 to  $7.6 \cdot 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, this agree with the greater bacteria heterotrophic and totals abundance. The high correlation found in the first three levels indicates a relation between microalgae and bacteria. The negative correlation in column ( $r = 0.2734$ ) can be explained by environmental variables when the temperature decreased (21.5 to 18.5 °C). The total nitrate uptake was greater in 2 L (97.8 %) and 18 L (98 %) that in 400 mL (60.8 %) and 400 L (59.8 %). There was a succession of nitrifying bacteria, *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* indicative of nitrification processes. The bacteria abundance did not affect the culture of microalgae nevertheless is necessary to establish a sanitary control in these cultures since the bacteria can growth associated to the culture.

Key words: *Chaetoceros muelleri*, abundance of bacteria, concentration of nutrients.

## DEDICATORIA

Por el gran esfuerzo que han hecho junto a mí las personas que me rodean al interesarse por mis metas y al apoyarme con sus comentarios edificantes:

A mi esposo **Omar** porque estuvo a mi lado siempre y aguantó mis angustias y depresiones, porque ha sido una bendición tenerlo a mi lado y espero que sigamos juntos por la eternidad.

A mi mamá **Lupita** que a pesar de la distancia sigue pendiente de mis tristezas y alegrías y viaja una gran distancia para estar a mi lado y no se perdió mi exposición y también por que no a Ramiro que de una forma u otra y sin querer ha formado parte de mi vida.

A mis hermanos: Félix, Mireya, Ramiro, Diego, Inés, Raúl, Selene y Eduardo.

A mis sobrinas: Kenia, Karina, Carolina, Abigail, Cristina, Lizyuth, Nicole y mi sobrinito Alexis.

A mis hermanos espirituales porque a pesar de no entender mucho lo que estaba haciendo me dieron su apoyo y se preocuparon por mí.

A mis amigas en ensenada Yesica, Gloria y Jael, que de alguna forma u otra han estado conmigo.

## AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT**, por el apoyo económico brindado durante dos años para la maestría.

Al **CICESE** por disfrutar de sus jardines y diferentes instalaciones y de la calidad humana de su personal en especial, Dolores, Citlali, Ivonne, Amelia, Bibi, Ceci y Don Agustín.

A la **Universidad Autónoma de Baja California** en especial al **Instituto de Investigaciones Oceanológicas** por facilitarme las instalaciones del laboratorio de microalgas y de bacteriología.

A mi directora de tesis M. en C. **María Victoria Orozco Borbón** que me rescato cuando no tenía anteproyecto y me dio la oportunidad de conocerla mejor, me brindo su amistad, además de que me dio su apoyo incondicional y siempre confío en mí.

A los miembros de mi comité de tesis Dra. **Rosa R. Mouriño Pérez**, por sus valiosos consejos y su amistad. Dra. **Beatriz Cordero Esquivel** por su apoyo moral y económico. M. en C. **Enrique Valenzuela Espinoza** por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio bajo su supervisión y por sus consejos. Dr. **Gilberto Gaxiola** por sus palabras de ánimo y estímulo. Gracias a todos por sus correcciones y comentarios.

A las chicas del laboratorio de bacteriología, **Celia, Mónica y Lulú**.

Al océanólogo **Filiberto Núñez**, por su apoyo incondicional durante la realización de los experimentos en el laboratorio de microalgas.

A mis compañeros de generación, **José Luís, Francisco, Emmanuel y Diego** para quienes deseo lo mejor y que tengan éxito en su vida personal como profesional.

Al Dr. **Helmut** y colaboradores en el laboratorio: Cesar, Alejandrina y Mari Carmen.

A mi **familia** que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas.

Y lo más importante en mi vida gracias **Jehová**, por haberme permitido concluir con esta meta. Y por tus consejos que has dejado en tu palabra la **Biblia** para que el ser humano pueda guiarse en su vida familiar y profesional ya que solo aplicando esta guía el ser humano puede conservar la cordura, mantener el equilibrio y no perderse en este mundo.

Y aquellos que de alguna u otra manera se relacionaron conmigo durante mi estancia en el CICESE.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. HIPOTESIS</b>	<b>9</b>
<b>III. OBJETIVO</b>	<b>9</b>
III.1. Objetivo general	9
III.1.2. Objetivos específicos	9
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
IV.1. Microalgas	10
IV.2. Bacterias	12
IV.2.1. Bacterias heterótrofas y <i>Vibrio</i>	12
IV.2.2. Bacterias nitrificantes	13
IV.2.3. Bacterias conteo directo	14
IV.3. Microscopía de epifluorescencia	14
IV.4. Nutrientes	15
IV.5. Parámetros poblacionales	15
IV.6. Análisis de los datos	16
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
V.1. Variables físico-químicas	17
V.2. Crecimiento microalgal	17
V.3. Crecimiento bacteriano	20
V.3.1. Abundancia de bacterias heterótrofas	20
V.3.2. Abundancia de bacterias mediante conteo directo	24
V.3.3. Abundancia de bacterias <i>Vibrio</i> spp.	28
V.3.4. Abundancia de bacterias nitrificantes	28
V.4. Consumo de Nitratos	31
V.5. Nitritos y amonio	35
V.6. Análisis bacteriológico y nutrientes en el agua de mar	37
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
VI.1. Variables físico-químicas	40
VI.2. Crecimiento de las microalgas	40
VI.3. Crecimiento de las bacterias	42

## CONTENIDO (continuación)

	Página
VI.3.1. Bacterias heterótrofas	44
VI.3.2. Bacterias tipo <i>Vibrio</i>	46
VI.3.3. Bacterias nitrificantes y su relación con los nutrientes	48
VI.4. Fuentes de Nitrógeno	50
VI.4.1. Consumo de Nitratos	50
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Crecimiento promedio de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en (a) 400 mL, (b) 2 L, (c) 18 L y (d) 400 L, con el medio f/2. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).	18
2	Concentración promedio de bacterias conteo directo y heterótrofas de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en: (a) 400 mL, (b) 2 L y control sin microalgas. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).	25
3	Concentración promedio de bacterias conteo directo y heterótrofas de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en: (a) 400 mL, (b) 2 L y control sin microalgas. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).	26
4	Coefficiente de correlación microalgas y bacterias conteo directo del cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> en: (a) 400 mL, (b) 2 L y (c) 18 L.	29
5	Tinción con DAPI. Bacterias adheridas a la superficie de las microalgas (epifitas) y algunas de vida libre. Cultivo de microalgas en garrafón, día quinto.	30

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Formulación y componentes para el medio f/2	11
II	Valores poblacionales promedio de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en (A) 400 mL, (B) 2 L, (C) 18 L y (D) 400 L con el medio f/2, $\mu$ = tasa de crecimiento, TD= tiempo de duplicación, D= divisiones por día y PD= producción diaria.	19
III	Concentración promedio de bacterias heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> ), conteo directo (células mL <sup>-1</sup> ), porcentaje de bacterias cultivables con respecto a conteo directo, <i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> ) y nitrificantes <i>Nitrosomonas</i> y <i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> ), en el nivel Erlenmeyer (A), Fernbach (B) y control sin microalgas en Fernbach (C).	22
IV	Concentración promedio de bacterias heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> ), conteo directo (células mL <sup>-1</sup> ), porcentaje de bacterias cultivables con respecto a conteo directo, <i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> ) y nitrificantes <i>Nitrosomonas</i> y <i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> ), en el nivel garrafón (A), control sin microalgas en garrafón (B) y columna (C).	23
V	Concentración residual promedio y consumo diario promedio de nitratos en <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en: (A) 400 mL (B) 2 L y (C) control sin microalgas con el medio f/2.	33
VI	Concentración residual promedio y consumo diario promedio de nitratos en <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en: (A) 18 L, (B) control sin microalgas y (C) 400 L, con el medio f/2.	34

CONTINUACION

Tabla		Página
VII	Concentración promedio de nitritos en el agua de cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> en el nivel (A) matraz, Fernbach y control sin microalgas, (B) garrafón, control sin microalgas y columna.	36
VIII	Concentración promedio de Amonio ( $\mu\text{M}$ ) en el agua de cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> en el nivel (A) Erlenmeyer, Fernbach y control sin microalgas, (B) Garrafón, Control sin microalgas y Columna.	37
IX	Concentración de bacterias heterótrofas (UFC $\text{mL}^{-1}$ ) conteo directo (células $\text{mL}^{-1}$ ), <i>Vibrio</i> spp. (UFC $\text{mL}^{-1}$ ), nitrificantes <i>Nitrosomonas</i> y <i>Nitrobacter</i> (NMP $100 \text{ mL}^{-1}$ ), en el agua de mar de la pila de abastecimiento (P) y agua de mar filtrada y pasada por UV para ser usada al inicio del cultivo en Erlenmeyer (UVE), en el nivel Fernbach (UVF) y en el nivel columna (UVC), respaldo para el control en el Fernbach (RF) y respaldo para el control en el garrafón (RG).	38
X	Concentración de nutrientes ( $\mu\text{M}$ ) en el agua de mar P (pila de abastecimiento) UV e, f y c, (agua de mar filtrada y pasada por UV e = usada para el cultivo a nivel Erlenmeyer, UV f = usada para el cultivo en Fernbach y UV c = para el cultivo en columna).	39
XI	Variables fisico-químicas en los cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada por duplicado en A (Fernbach de 2 L), B (Garrafón 18 L) y C (Columna 400 L).	61
XII	Variables fisico-químicas en los controles sin microalgas A (Fernbach de 2 L), B (Garrafón 18 L), con medio f/2.	62

## **ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y SU RELACIÓN CON LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) EN CULTIVO ESTÁTICO.**

### **I. INTRODUCCIÓN**

Las microalgas constituyen el primer nivel trófico en los distintos ambientes acuáticos y transfieren su energía a otros organismos. Tienen la capacidad de absorber energía solar, transformarla y almacenarla en forma de energía química (ATP), para reducir sustancias inorgánicas como  $\text{NO}_3^-$  e incorporar dióxido de carbono a través del proceso de fotosíntesis, para producir compuestos complejos y de alto contenido energético, como carbohidratos, lípidos y proteínas (Margalef y Vives, 1967; Fogg y Thake, 1987).

Las microalgas son importantes en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos cultivados, principalmente moluscos, peces y crustáceos, así como para algunas especies intermedias como son copépodos, rotíferos y artemias, siendo altamente nutritivas y fáciles de ingerir debido al tamaño que poseen (Brown *et al.*, 1997; Ritar *et al.*, 2004).

A pesar de que se han buscado alimentos alternativos a las microalgas estas siguen siendo la principal o la única dieta en los criaderos comerciales, debido a este motivo, en todos los laboratorios productores de larvas se encuentra una sección especial, diseñada y operada con el fin exclusivo de producir una o varias especies de microalgas a nivel masivo (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Brown *et al.*, 1997; Martínez-Córdova, 1999; López-Elías, 2002).

Dentro de las microalgas utilizadas en acuicultura, se distinguen las diatomeas centrales ya que han demostrado ser un buen alimento (Brown *et al.*, 1989). En los laboratorios de producción de postlarvas de camarón una de las diatomeas comúnmente utilizadas es *Chaetoceros muelleri* por su excelente aceptación y su elevado contenido proteico de ácidos grasos poliinsaturados PUFA (por sus siglas en inglés), especialmente los ácidos docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3) eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3) y araquidónico (ARA 20:4 n-6) (Brown, 2002; Piña *et al.*, 2006), con la cual se han obtenido altas tasas de sobrevivencia en las larvas (Valenzuela *et al.*, 1999; Pacheco-Vega, 2003; López-Elías, *et al.*, 2005a, Piña *et al.*, 2005, 2006).

Los principales medios por los que se introducen agentes patógenos a los cultivos, es el agua y el alimento vivo que se les suministra en la fase de producción larvaria, ya que los organismos sometidos a cultivo son aún más propensos a desarrollar patologías debido a diversos factores, como: calidad y cantidad de alimento, altas densidades de confinamiento, estrés, baja calidad del agua, etc. (Lightner y Redman, 1998; Lavilla Pitogo *et al.*, 1998; Regunathan y Wesley, 2004).

Por tal motivo, uno de los factores importantes a considerar son los estudios de bacteriología aplicada a la acuicultura, los cuales han cobrado importancia por la incidencia de enfermedades bacterianas y pérdidas económicas (Regunathan y Wesley, 2004).

Las bacterias y las microalgas son microorganismos comunes en ambientes acuáticos. Diversos trabajos muestran la influencia que tienen una sobre otra al estimular o

inhibir el crecimiento (Suminto y Hirayama, 1996; Fukami *et al.*, 1997; Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

Las bacterias pueden incrementar el crecimiento microalgal (Berland *et al.*, 1970; Suminto y Hirayama, 1996, 1997), mediante la producción de algunas vitaminas y factores de crecimiento (Haines y Guillard, 1974; De-Bashan y Bashan, 2003).

A su vez las microalgas exudan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano (Servais y Billen, 1993; Munro *et al.*, 1995), lo cual dificulta producir cultivos microalgales axénicos, principalmente en cultivos masivos (Rico-Mora, 1995). También algunos autores han reportado el efecto negativo del uso de antibióticos en las microalgas (Campa-Córdova *et al.*, 2006), debido a que el alimento utilizado en los sistemas de producción acuícola es mixto y conlleva una o varias bacterias asociadas dependiendo del tipo de microalga que se esté cultivando (Suminto y Hirayama, 1996).

Se tiene conocimiento que en algunos casos cultivos mixtos microalga-bacteria son fácilmente ingeridos y digeridos por los organismos cultivables, provocando un mayor crecimiento y sobrevivencia de los mismos. Experimentos realizados con larvas de bivalvos han demostrado que las bacterias participan en procesos de digestión de las microalgas mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Prieur *et al.*, 1990). Por ejemplo, Brown *et al.* (1997), encontraron que si las larvas de la ostra *Saccostrea commercialis* (Gould, 1850), se alimentan con mezclas de bacterias y algas, se

tiene un incremento de 67 % en la talla de la concha, porcentaje superior al encontrado si se alimentan a las larvas únicamente con microalgas.

Por consecuencia, varios estudios han destacado algunas propiedades nutritivas de las bacterias, siendo propuestas como un suplemento benéfico en la alimentación de moluscos bivalvos (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Ejemplo de esto son los estudios de Albert y Valiela (1995, 1996), quienes mencionan que los agregados microbianos son una fuente importante de nutrición para el pectínido *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). Resultados similares han sido encontrados en cultivos de *Artemia* (Intriago y Jones 1993; Olsen *et al.*, 2000).

Brown *et al.* (1996), determinaron la composición bioquímica de las bacterias presentes en el agua de cultivo de *Saccostrea commercialis* encontrando una alta composición de proteínas y aminoácidos esenciales, siendo similares a los encontrados en sus tejidos así como en los de *Crassostrea gigas*.

Por lo que se refiere a la función que desempeñan las bacterias en un estanque de camarón, no sólo debe ser enfocado desde el punto de vista de las enfermedades, sino que estos microorganismos también cumplen un papel importante en el reciclamiento de los nutrientes y la degradación del detritus en el estanque y contribuyen por lo tanto a mantener la calidad del agua (Gómez-Gil *et al.*, 2001). Además las especies de bacterias patógenas en

los camarones (especialmente *Vibrios*) han sido también reportadas como parte de su flora microbiana normal (Vanderzant *et al.*, 1971; Yasuda y Kitao, 1980).

La importancia de las bacterias no se limita únicamente a que pueden servir como alimento de organismos cultivados, desempeñan también un papel muy importante en los flujos de carbono y energía en los sistemas de cultivos, en donde existe una interrelación entre las microalgas y bacterias. Una de las principales fuentes de carbono para las bacterias son las sustancias orgánicas liberadas extracelularmente por el fitoplancton (Kogure *et al.*, 1982; Wolter, 1982; Moller, 1983; Riquelme, 1989) y al utilizarlas, las bacterias ponen a disposición del fitoplancton una serie de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , entre otros), estableciendo así una retroalimentación metabólica.

De los nutrientes esenciales, el nitrógeno es clave ya que controla el crecimiento de las microalgas en los sistemas de cultivo, en donde se llevan a cabo diversos procesos biológicos como son: amonificación; asimilación de nitrógeno y nitrificación. De estos tres procesos, el de mayor importancia es la nitrificación, que es la oxidación biológica de compuestos nitrogenados reducidos a nitrito y nitrato. El proceso ocurre en dos pasos diferentes, cada uno mediado por un grupo específico de bacterias. El grupo *Nitrosomonas*, que incluye varios géneros de bacterias, las cuales pueden oxidar el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) mientras que el grupo *Nitrobacter* oxida el nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Wheaton, 1977).

Estos procesos de transformación metabólica bacteriana son una fuente importante de nitrógeno para las microalgas. Simental-Oceguera (2001), en un estudio realizado con

las microalgas *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. encontró una sucesión de bacterias nitrificantes, en donde se presentó primeramente un incremento de *Nitrosomonas* sp., y posteriormente otro de *Nitrobacter* sp. Estas bacterias siguieron el patrón de comportamiento típico en los sistemas de cultivo para la generación de nitritos y nitratos.

Finalmente es necesario mencionar que las bacterias desempeñan un doble papel en los cultivos de microalgas, el de ser benéficas: al servir como alimento y mineralizadoras de materia orgánica (González-Del Valle, 1997), y el de ser patógenas, al causar enfermedades a los organismos cultivados y colapsar los cultivos de microalgas.

Una de las bacterias patógenas que se encuentran mayormente en los cultivos de microalgas y que pueden ser transferidas a través del alimento a los organismos cultivados es *Vibrio*.

El género *Vibrio* incluye microorganismos anaerobios facultativos en forma de bacilos o de bacilos curvos, gram negativos y oxidasa-positivos, requieren de 2-3% de NaCl y en términos generales son fermentadores de sacarosa (colonias amarillas en su mayoría, en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa, TCBS). Se encuentran en el agua de mar en asociación con organismos acuáticos como peces, moluscos y crustáceos (Baumann y Schubert, 1991), ocasionándoles la enfermedad llamada vibriosis. También se asocian con un crecimiento irregular de las microalgas, la mayoría de las veces inestable, con fases de retraso muy largas y estacionarias muy cortas (Okauchi, 1991).

Entre las especies bacterianas que causan vibriosis consideradas de importancia sanitaria en acuicultura se pueden mencionar, *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* entre otras. Aunque pueden presentarse epizootias por los géneros *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Moraxella* y bacterias filamentosas como *Leucotrix mucor*, *Flexibacter* spp. y *Flavobacterium* spp., (Lightner, 1993).

Por tanto, es necesario establecer un control sanitario desde el punto de vista bacteriológico, incluyendo el tipo de alimento microalgal con el fin de detectar, evitar y controlar las enfermedades más comunes y que causan pérdidas económicas en acuicultura (Sindermann, 1990; Pillay, 1990).

En el ambiente marino las bacterias han cobrado mayor importancia a medida que los métodos para su estudio y su detección han sido mejorados. Además del método tradicional de conteo en placa, han sido usados varios métodos para detectar las bacterias presentes y su actividad en ambientes acuáticos. Estos incluyen micro-autoradiografía con marcadores radiactivos (Hoppe, 1976), medir la tasa de respiración (Zimmermann *et al.*, 1978) y el número más probable de bacterias (NMP) en medios líquidos (Button *et al.*, 1993).

La característica que tienen en común estos métodos es que el número de bacterias activas detectadas es siempre menor que el número detectado como conteo total determinado por microscopía de epifluorescencia. Se ha encontrado que únicamente

alrededor del 1% de las bacterias totales se han podido cuantificar con estos métodos (Hoppe, 1976; Meyer-Reil, 1978; Porter y Feig, 1980; Zweifel y Hagström, 1995). Una manera de tener una aproximación de las bacterias presentes en el agua, es realizar de forma simultánea el conteo de bacterias con diversos métodos.

La supervivencia y desarrollo larval de las diferentes especies de organismos en cultivo dependen del tipo, calidad y cantidad del alimento ingerido, las microalgas como uno de los primeros alimentos son importantes ya sea que sean suministradas en forma individual o mixta (Milke *et al.*, 2004), por tal motivo se propone la presente investigación con la diatomea *Chaetoceros muelleri* por su rápido crecimiento, tamaño y valor nutricional (Treece y Fox, 1993; Brown, 2002; Piña *et al.*, 2006), con la finalidad de determinar la relación *Chaetoceros muelleri*- bacterias heterótrofas, el papel de las bacterias nitrificantes, así como la abundancia de bacterias *Vibrio* que pueden ocasionar enfermedades en organismos cultivados.

## II. HIPÓTESIS

Existe una relación entre la concentración de *Chaetoceros muelleri* y la abundancia de bacterias heterótrofas, totales y *Vibrio*. Se espera además una sucesión de especies nitrificantes, primeramente se presentará *Nitrosomonas* y posteriormente *Nitrobacter*.

## III. OBJETIVO

### III.1 Objetivo general

Determinar la relación que existe entre la carga bacteriana y *Chaetoceros muelleri* en cultivo estático, escalada a diferentes niveles.

### III.1.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar la concentración celular de la microalga *Chaetoceros muelleri* y la abundancia de bacterias.
- 2.- Cuantificar bacterias heterótrofas, nitrificantes y *Vibrio* sp. en el cultivo de *Chaetoceros muelleri*.
- 3.- Determinar los cambios en la concentración de nutrientes en el agua del cultivo.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Producción de Microalgas y Bacteriología Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Se realizó un bioensayo preliminar con el objetivo de establecer las condiciones adecuadas para el cultivo de microalgas y las diluciones óptimas para el conteo de bacterias.

### IV.1. Microalgas

La microalga *Chaetoceros muelleri* se cultivó durante cinco días en el medio f/2 (Tabla I) propuesto por Guillard (1975) y se escaló a diferentes niveles Erlenmeyer (400 mL), Fernbach (2 L), garrafón (18 L) y Columna (400 L). Adicionalmente se realizaron controles sin microalgas en Fernbach y garrafón. Cada nivel se hizo por duplicado.

La biomasa obtenida se utilizó como inóculo para el siguiente nivel. Para el control sin microalgas en Fernbach y en garrafón se usaron 100 mL y 200 mL respectivamente. Las alícuotas se centrifugaron dos veces a 1644 g durante 15 minutos, después se filtraron con filtros de fibra de vidrio (GF/F) para obtener un medio que tuviera únicamente las bacterias asociadas al cultivo y los nutrientes que constituyen el medio f/2.

Previo a la inoculación el agua de mar con el medio f/2 para los niveles Erlenmeyer y Fernbach, se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 libras de presión  $\text{cm}^{-2}$  durante 15 minutos.

En el nivel garrafón el agua de mar a utilizar fue irradiada con lámparas de UV, después se trató con hipoclorito de sodio a una razón de  $0.30 \text{ mL L}^{-1}$  y se dejó reposar por

Tabla I. Formulación y componentes para el medio f/2

Componente	Formula	Cantidad	Concentración $\mu\text{Molar}$
Nitrato de Sodio	$\text{NaNO}_3$	75 mg	883
Fosfato de Sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5 mg	36.3
Metasilicato de Sodio	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	30 mg	107
EDTA	$\text{Na}_2$ EDTA	4.36 mg	11.7
Cloruro férrico	$\text{FeCl}_3$	3.15 mg	11.7
Sulfato cúprico	$\text{CuSO}_4$	0.01 mg	0.04
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4$	0.022 mg	0.08
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2$	0.01 mg	0.05
Cloruro manganoso	$\text{MnCl}_2$	0.18 mg	0.9
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0.006 mg	0.03
Biotina		0.5 $\mu\text{g}$	
Cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ )		0.5 $\mu\text{g}$	
Tiamina ( $\text{B}_1$ )		0.1 mg	

24 horas sin aireación, posteriormente se agregó tiosulfato de sodio ( $0.15 \text{ mL L}^{-1}$ ) para neutralizar el cloro y se dejó con aireación por 2 horas. En el nivel columna, el agua de mar se irradió con lámparas de UV.

A intervalos de 24 horas y a partir del día del inóculo, los cultivos en Erlenmeyer y Fernbach fueron agitados manualmente. Del nivel de Fernbach en adelante las muestras que se tomaron para la densidad celular también se usaron para obtener información sobre la temperatura, pH y salinidad.

En cada uno de ellos se realizó una cuantificación diaria de células de microalgas con un contador de partículas marca Counter Count Multisizer 3.

Se realizaron análisis bacteriológicos (bacterias heterótrofas, *Vibrio*, nitrificantes y conteo directo) y análisis de nutrientes (nitratos, nitrito y amonio con un autoanalizador de flujo segmentado SKALAR) en el agua de mar de la pila de abastecimiento y agua de mar

filtrada e irradiada con UV, en diferentes días, coincidiendo con el día de la transferencia al siguiente nivel.

## **IV.2. Bacterias**

Para la cuantificación de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y nitrificantes, diariamente se tomaron muestras del cultivo de microalgas en todos los niveles por duplicado, se depositaron en frascos de plástico estériles y se trasladaron al laboratorio de Bacteriología Marina para su análisis inmediato.

### **IV.2.1. Bacterias heterótrofas y *Vibrio***

Una vez obtenidas las muestras y tomando como referencia los datos registrados en el bioensayo anterior, se hicieron diluciones seriadas utilizando agua de mar envejecida estéril, seleccionando las más apropiadas, hasta alcanzar una concentración que permitiera contar entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>).

Para la inoculación de bacterias heterótrofas y *Vibrios*, se utilizó el método de veteado en placa en los medio Zobell y el medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) respectivamente. Ambos medios se inocularan por duplicado con 0.1 mL de cada una de las diluciones de la muestra de agua de cultivo de microalgas y se incubaron a 25°C. (para las bacterias del género *Vibrio* no se realizaron diluciones).

El conteo de colonias se realizó cinco días después del sembrado en placa para heterótrofas y a las 48 y 72 horas para *Vibrio*, mediante un contador de colonias tipo Québec, y se registraron como UFC mL<sup>-1</sup>.

#### IV.2.2. Bacterias nitrificantes

Las muestras tomadas del agua de cultivo para bacterias nitrificantes se inocularon en series de cinco tubos para cada dilución con tres diluciones por muestra (15 tubos en total) se incubaron a 28 °C por 21 días (U. S. Geological Survey, 1977).

Los medios que se utilizaron son: amonio calcio carbonatado para *Nitrosomonas* sp y el medio nitrito calcio carbonatado para *Nitrobacter* sp.

Las lecturas de las bacterias nitrificantes se realizaron con el reactivo Griess-Ilosvay. Se agregó una gota del reactivo esperando cinco minutos para la reacción, donde el crecimiento de *Nitrosomonas* se detecta por la presencia de una placa de color roja en el fondo del tubo y una coloración rojo-púrpura en el líquido. Cuando no registraron color después de este tiempo se les añadió aproximadamente un miligramo de una mezcla de dióxido de zinc, cobre y manganeso (U. S. Geological Survey, 1977). Si al añadir esta mezcla desarrollaban color se confirman positivas para *Nitrosomonas*. En este caso la lectura negativa inicial para nitrito indica que el nitrito formado por *Nitrosomonas* fue oxidado a nitrato por *Nitrobacter*. Todos los tubos de nitrito calcio carbonatado que no desarrollaron el color rojo-púrpura característico, formado por la reacción de nitrito con el reactivo Griess-Ilosvay, se consideraron positivos para *Nitrobacter* y no se les añadió la mezcla.

Se cuantificaron mediante el método del número más probable (NMP) propuesto por U. S. Geological Survey (1977).

### **IV.2.3. Bacterias conteo directo**

Para el conteo directo de bacterias totales se tomaron 5 mL del cultivo de microalgas y se transfirieron a un vial con tapa de rosca. La muestra se fijó con 0.25 mL de formaldehído al 40 % (con una concentración final del 2 %), se agitaron y almacenaron en un refrigerador a 4°C.

### **IV.3. Microscopía de epifluorescencia**

Las muestras conservadas para el conteo directo, se filtraron (utilizando submuestras de 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01 mL, tomando en cuenta la densidad celular microalgal y bacteriana) utilizando filtros de policarbonato negros de 0.22  $\mu\text{m}$  (tamaño de poro) y filtros de fibra de vidrio (GF/F) como soporte. Se tiñeron con colorante DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) a una concentración final de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante cinco minutos en oscuridad (Porter y Feig, 1980).

Se colocó sobre un portaobjeto, una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia y sobre ésta el filtro de policarbonato negro que contenía la muestra filtrada. Se colocó otra gota de aceite de inmersión sobre el filtro con la muestra y encima un cubre objetos. Para el conteo se tomaron imágenes (25-40 células de bacterias por campo), con la ayuda de una cámara Olympus Dp70, y de un microscopio Axiovert 200, marca Carl Zeiss. Utilizando una longitud de onda de excitación de UV con una lámpara de 50 W. Los resultados se reportaron como número de bacterias por mililitro.

#### IV.4. Nutrientes

Del cultivo de microalgas se tomó diariamente una alícuota de 7-9 mL, se filtró con filtros de fibra de vidrio GF/F de 25 mm, previamente quemados durante 4 horas a 450 °C. El agua filtrada se guardó en recipientes de polietileno y se mantuvieron congelados hasta su análisis. Los nitratos, nitritos y amonio se analizaron con un autoanalizador de nutrientes de flujo segmentado SKALAR. Se tomó 1 mL de la muestra original y a partir de este se realizaron diferentes diluciones (nitritos 1:10, nitratos 1:40 y amonio 1:75).

#### IV.5. Parámetros poblacionales

Con los conteos de microalgas se determinó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), divisiones por día (**D**) tiempo de duplicación (**TD**) y producción diaria (**PD**) mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1973).

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

Donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica en días

$N_1$  = Número de células al tiempo  $t_1$

$N_2$  = Número de células al tiempo  $t_2$

$t_1$  y  $t_2$  = tiempo inicial y final en días.

$$D = \frac{\mu}{\text{Ln}(2)} \quad (2)$$

Donde:

D = Número de divisiones por día

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica

$$TD = \frac{1}{D} \quad (3)$$

Donde:

TD = tiempo de duplicación en días

D = Divisiones por día

$$PD = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

Donde:

PD = Producción diaria

$C_2$  = producción diaria de células al tiempo  $t_2$ .

$C_1$  = producción diaria de células al tiempo  $t_1$ .

$t_1$  y  $t_2$  = tiempo inicial y final en días.

#### IV.6. Análisis de los datos

Se realizó una estadística exploratoria para conocer la naturaleza de los datos y elegir las pruebas a aplicar. Para estimar la relación entre microalgas y bacterias se realizó un análisis de correlación de Pearson con el paquete Statistica V.6. Para los diferentes cálculos y gráficas se utilizó el programa Excell.

## V. RESULTADOS

### V.1. Variables físico-químicas

Las condiciones de cultivo para los tres niveles donde se registraron estas variables fueron: temperatura promedio, 22.64 °C, salinidad de 32 ‰ y pH 8.0 manteniéndose estable en un intervalo de 7-9 mediante la inyección de CO<sub>2</sub> en forma gaseosa.

En el nivel Fernbach la temperatura tuvo un valor medio de  $23.9 \pm 0.60$  °C y el pH un promedio de  $8.1 \pm 0.85$  (Anexo A). La temperatura en el control a nivel Fernbach  $23.8 \pm 0.76$  °C, y el pH  $7.98 \pm 0.04$  (Anexo B).

En garrafón la temperatura fue  $23.1 \pm 0.23$  °C y el pH  $8.1 \pm 1$  (Anexo A). La temperatura promedio en el control a nivel garrafón fue de 22.8 °C y el pH de 7.95 (Anexo B). En columna, la temperatura tuvo un valor de  $19.6 \pm 1.15$  °C y el pH fue de  $8.1 \pm 0.36$  (Anexo A).

### V.2. Crecimiento Microalgal

El crecimiento microalgal promedio y los parámetros poblacionales en los cuatro niveles de cultivo para el medio f/2 se observan en la Figura 1 y Tabla II respectivamente. La fase exponencial en todos los niveles se presentó desde el primer día y en ninguno de los escalamientos se presentaron las fases de acondicionamiento y muerte.

En Erlenmeyer (400 mL) la densidad inicial celular promedio fue de  $2.24 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>.

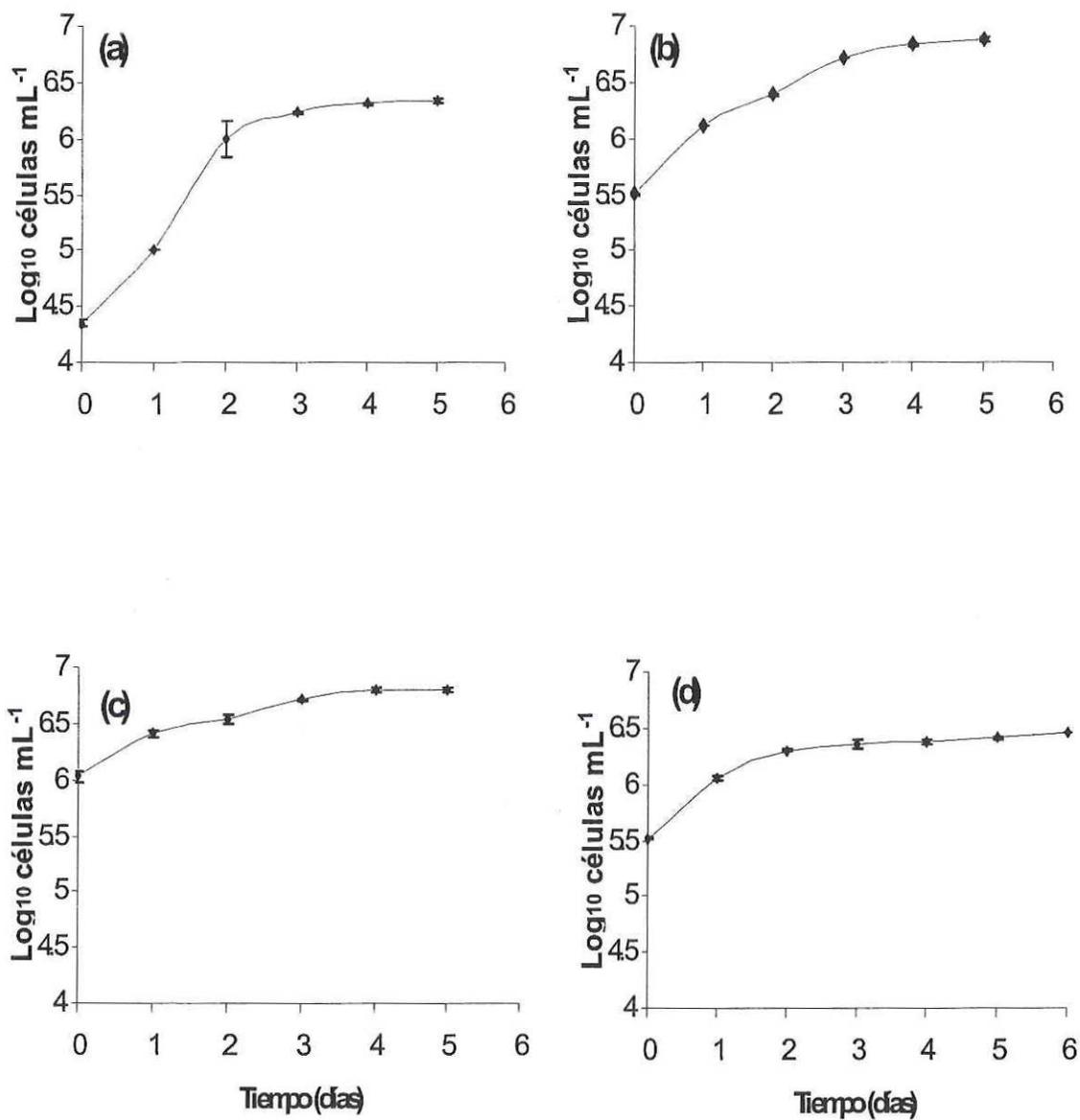


Figura 1. Curva de crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri* cultivada en (a) 400 mL, (b) 2 L, (c) 18 L y (d) 400 L, con el medio f/2. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).

Tabla II. Valores poblaciones promedio de *Chaetoceros muelleri* cultivada en (A) 400 mL, (B) 2 L, (C) 18 L y (D) 400 L, con el medio f/2,  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, TD = tiempo de duplicación, D = divisiones por día y PD = producción diaria.

(A)					
Tiempo (días)	Densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	$\mu$	D (división día <sup>-1</sup> )	TD (días)	PD (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )
0	0.2				
1	1.0	1.52	2.19	0.46	0.80
2	10.1	2.29	3.30	0.30	9.07
3	16.8	0.51	0.74	1.36	6.72
4	20.4	0.19	0.28	3.60	3.57
5	21.2	0.04	0.06	17.35	0.83

(B)					
Tiempo (días)	Densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	$\mu$	D (división día <sup>-1</sup> )	TD (días)	PD (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
0	0.3				
1	1.3	1.41	2.04	0.49	0.99
2	2.4	0.62	0.90	1.11	1.13
3	5.2	0.75	1.08	0.93	2.72
4	6.8	0.28	0.40	2.47	1.67
5	7.6	0.11	0.16	6.32	0.79

(C)					
Tiempo (días)	Densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	$\mu$	D (división día <sup>-1</sup> )	TD (días)	PD (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
0	1.1				
1	2.6	0.88	1.27	0.79	1.51
2	3.4	0.29	0.42	2.40	0.86
3	5.2	0.41	0.60	1.68	1.76
4	6.2	0.18	0.26	3.82	1.03
5	6.3	0.02	0.02	41.45	0.10

(D)					
Tiempo (días)	Densidad celular (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	$\mu$	D (división día <sup>-1</sup> )	TD (días)	PD (células mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
0	0.3				
1	1.1	1.25	1.80	0.56	0.81
2	2.0	0.56	0.81	1.23	0.87
3	2.3	0.13	0.19	5.23	0.28
4	2.3	0.02	0.02	42.14	0.04
5	2.6	0.10	0.15	6.80	0.25
6	2.9	0.11	0.17	6.05	0.31

La fase exponencial en este nivel tuvo una duración de 48 horas, con una mayor tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de 2.29 y un número de divisiones por día (D) de 3.3 en el segundo día. En los días 3 a 5 se presentó una fase de crecimiento lento la cual se caracterizó por una reducción en la tasa de crecimiento específica (0.51-0.04) y en consecuencia un aumento en el tiempo de duplicación (TD) de 1.36-17.35 (Tabla II A).

En los siguientes niveles Fernbach (2 L), garrafón (18 L) y columna (400 L), la mayor tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) fue de 1.41, 0.88 y 1.25 respectivamente y se encontró a las 24 horas después del inóculo (Tabla II B-II D). Las mayores biomásas se encontraron en Fernbach y garrafón, en el quinto día de cultivo  $7.6 \times 10^6$  y  $6.3 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente (Tabla II B y II C). En estos niveles se registró el mayor número de células tanto al final del cultivo como durante todo el desarrollo de este, en comparación con los niveles, Erlenmeyer y columna (Tabla II A y II D).

La biomasa obtenida en columna (Tabla II D), fue mayor a la encontrada en Erlenmeyer (Tabla II A). En columna se llegó a  $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  desde el segundo día, presentándose una fase de crecimiento lento a partir del tercer día, teniendo ligeros incrementos en los siguientes días de cultivo, alcanzando una biomasa final al sexto día de  $2.9 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Tabla II D).

### **V.3. Crecimiento Bacteriano**

#### **V.3.1. Abundancia de bacterias heterótrofas**

El crecimiento promedio de bacterias heterótrofas obtenidas del cultivo en el nivel Erlenmeyer se observa en la Tabla III A. Se observa un incremento de  $2.2 \times 10^3$  UFC  $\text{mL}^{-1}$

en el día del inóculo hasta  $1.7 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> para el quinto día de cultivo, mostrando el mismo comportamiento que el crecimiento microalgal (Tabla II A), el cual incrementó su número desde el día del inóculo ( $2.2 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>) hasta el quinto día de cultivo ( $2.1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>). En general se encontró que la relación entre el crecimiento de bacterias heterótrofas y de microalgas es 1: 9.9 para el día (0) del inóculo y de 1:12.2 para el quinto día.

El crecimiento promedio de bacterias heterótrofas totales para Fernbach se proporcionan en la Tabla III B. Se encontró la misma tendencia que en el nivel Erlenmeyer de aumentar su número durante el cultivo, de  $1.5 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> en el día del inóculo a  $1.7 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> para el quinto día, con una relación bacteria-microalga de 1: 21.6 y 1: 4.6 para los días anteriormente mencionados. El inóculo de microalgas para este nivel (Tabla II B) fue de  $3.2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> un orden de magnitud mayor que en el Erlenmeyer, por lo tanto la tendencia general fue encontrar mayores concentraciones, tanto de bacterias como de microalgas.

La concentración de bacterias heterótrofas para el control en Fernbach (Tabla III C), fue de  $2.6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> en el día del inóculo y de  $7.4 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> en el quinto día.

Las concentraciones promedio de bacterias heterótrofas en el día del inóculo a nivel garrafón fueron  $3.4 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> alcanzando un máximo para el quinto día de  $>3.0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, con una relación bacteria-microalga de 1:3.1 y de 1:2.3, para el día del inóculo y el cuarto día respectivamente (Tabla IV A), estas concentraciones son una orden de magnitud mayor que las encontradas en el nivel anterior y dos ordenes de magnitud mayor que el Erlenmeyer.

Tabla III. Concentración promedio de bacterias heterótrofas (UFC mL<sup>-1</sup>), conteo directo (cél mL<sup>-1</sup>), porcentaje de bacterias cultivables con respecto a conteo directo, *Vibrio* spp. (UFC mL<sup>-1</sup>) y nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (NMP 100 mL<sup>-1</sup>), en el nivel Erlenmeyer (A), en el nivel Fernbach (B) y control sin microalgas en Fernbach (C).

**(A)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	0.02	7.01	0.32	0	<18	<18
1	0.20	19.29	1.02	0	<18	<18
2	0.23	24.62	0.95	0	20	<18
3	0.20	44.37	0.44	0	78	<18
4	1.24	191.88	0.64	0	230	<18
5	1.74	125.40	1.38	0	230	<18

\*<18 limite de detección inferior

**(B)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	0.15	45.24	0.33	0	<18	<18
1	0.17	74.49	0.23	0	32	<18
2	3.07	96.74	3.17	0	19	<18
3	1.45	231.63	0.62	0	20	<18
4	1.75	328.99	0.53	0	32	<18
5	16.55	1036.37	1.60	0	48	125

**(C)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	0.03	8.09	0.32	0	230	<18
1	0.06	7.65	0.83	0	230	<18
2	>0.30	7.76	3.87	0	230	<18
3	>0.30	13.07*	2.30	>300	230	<18
4	2.21	14.94*	14.79	>300	230	<18
5	7.40	25.57*	28.94	>300	230	<18

\* En estos días se observó el desarrollo de microalgas.

Tabla IV. Concentración promedio de bacterias heterótrofas (UFC mL<sup>-1</sup>), conteo directo (cél mL<sup>-1</sup>), porcentaje de bacterias cultivables con respecto a conteo directo, *Vibrio* spp. (UFC mL<sup>-1</sup>) y nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (NMP 100 mL<sup>-1</sup>), en el nivel garrafón (A), control sin microalgas en garrafón (B) y columna (C).

**(A)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	3.43	104.49	3.28	0	62	<18
1	>3.00	423.53	0.71	0	78	<18
2	>3.00	576.03	0.52	0	104	<18
3	19.53	1028.69	1.90	0	230	<18
4	26.38	1053.07	2.50	0	<18	<18
5	>30.00	2118.95	1.42	0	<18	62

**(B)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	<0.003	4.73	0.06	0	<18	<18
1	0.004	4.43	0.09	0	<18	<18
2	0.29	5.47	5.29	0	<18	<18
3	2.14	4.82	44.38	0	<18	<18
4	1.62	3.66	44.24	0	<18	<18
5	2.29	3.21	71.29	0	<18	<18

**(C)**

Tiempo (días)	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	% Conteo cultivable vs directo	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
					<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
0	1.19	139.03	0.85	0	<18	<18
1	2.69	271.91	0.99	0	<18	<18
2	>3.00	574.08	0.52	10	32	<18
3	>3.00	956.10	0.31	30	45	<18
4	9.60	480.25	2.00	25	230	<18
5	1.55	307.04	0.50	0	230	<18
6	1.09	119.18	0.91	3	230	<18

En el control para este nivel (garrafón), la concentración de bacterias heterótrofas fluctuaron entre  $<300$  a  $2.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, siendo menores que las encontradas en el control a nivel Fernbach (Tabla IV B).

Las concentraciones promedio de bacterias heterótrofas al día del inóculo en columna fue de  $1.2 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> alcanzando para el cuarto día un valor de  $9.6 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y para el sexto día un valor menor  $1.1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, estas concentraciones fueron menores que las encontradas a nivel garrafón, la relación bacteria-microalga fueron de 1:2.7 y 1:26.5 para el día inicial y el sexto día respectivamente (Tabla IV C).

### **V.3.2. Abundancia de bacterias mediante conteo directo**

La abundancia de bacterias promedio obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia en todos los niveles y los controles sin microalgas, se observan en la figura 2 y 3. En los tres primeros niveles el número de bacterias se incrementó con el tiempo del cultivo. Únicamente en el último nivel (Figura 3 b) se presentó un máximo casi a la mitad del cultivo para después empezar a disminuir en los días siguientes. En los controles la abundancia promedio de bacterias siempre fue menor que en los tratamientos experimentales (Figura 2 b y 3 a).

La máxima concentración promedio de bacterias determinadas por conteo directo en el nivel Erlenmeyer, se encontró al cuarto día, con un valor de  $19 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, mientras que el valor mínimo ( $7 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) se presentó al inicio. En general el porcentaje de bacterias heterótrofas obtenidas mediante conteo en placa con respecto a las bacterias por conteo directo fue bajo con un promedio de  $0.79 \% \pm 0.40$  (Tabla III A).

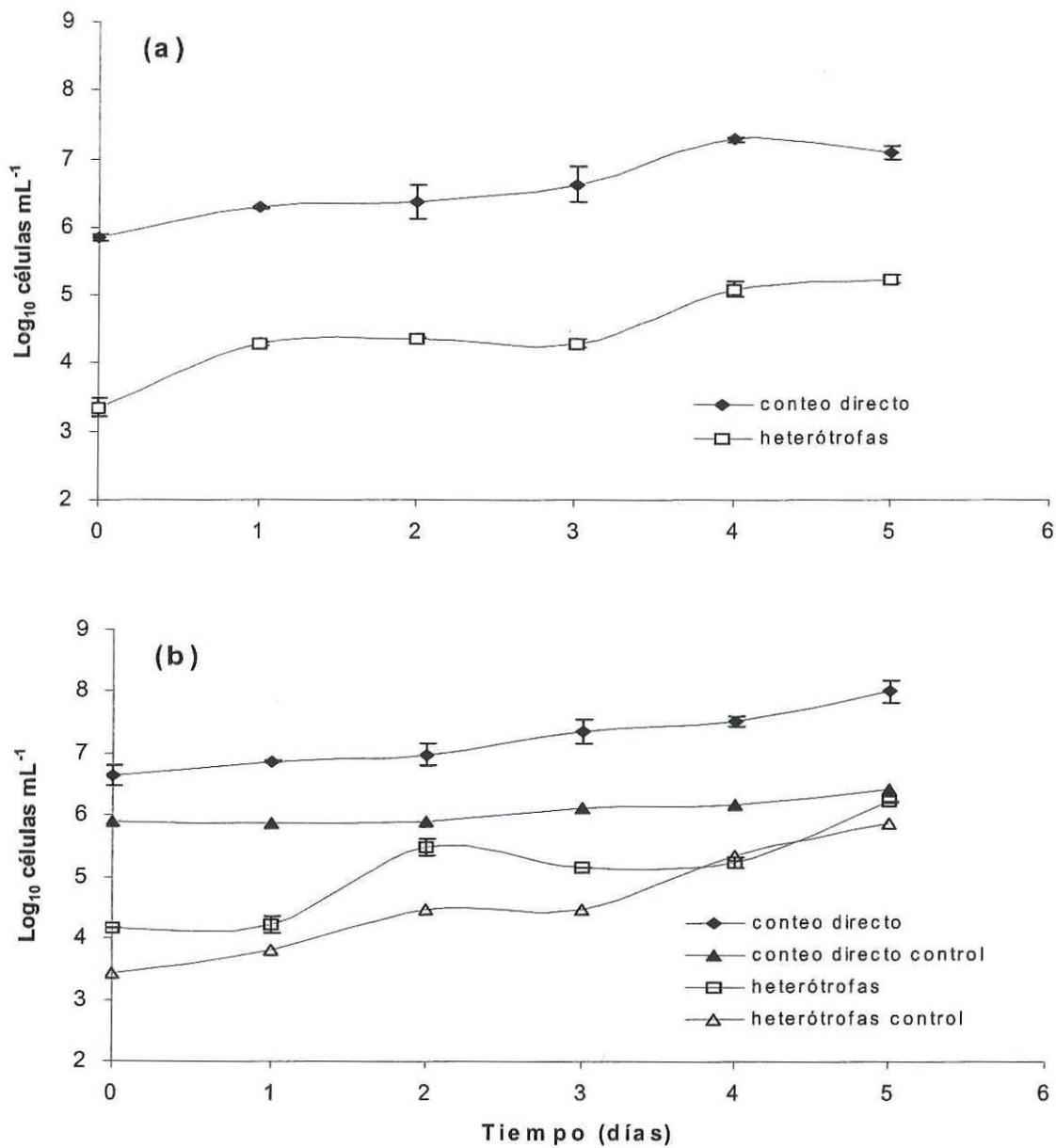


Figura 2. Concentración promedio de bacterias conteo directo y heterótrofas de *Chaetoceros muelleri* cultivada en: (a) 400 mL, (b) 2 L y control sin microalgas. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).

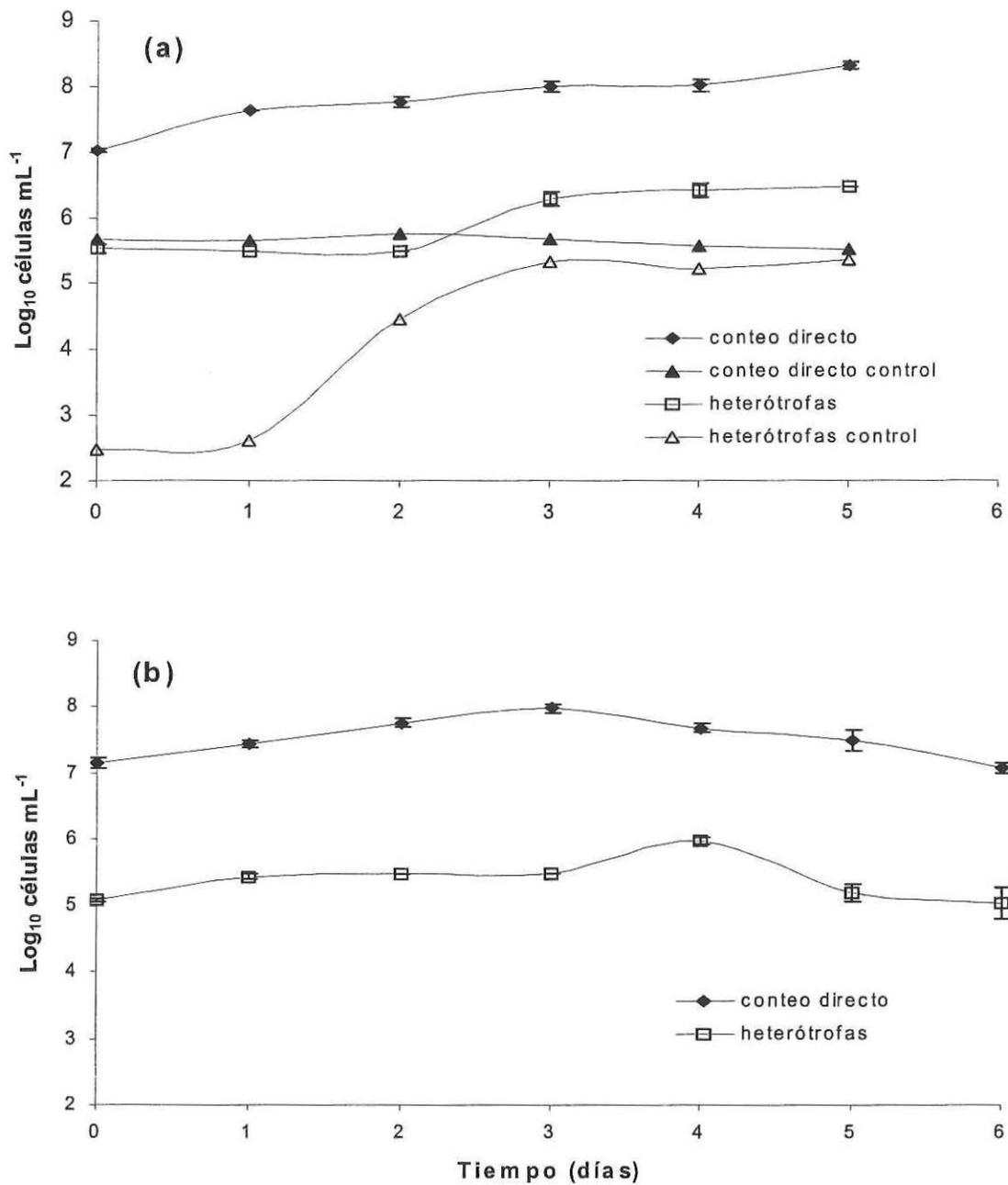


Figura 3. Concentración promedio de bacterias conteo directo y heterótrofas de *Chaetoceros muelleri* cultivada en: (a) 18 L y control sin microalgas, (b) 400 L. La barra vertical indica el Intervalo de Confianza al 95% (n=2).

El coeficiente de correlación entre las microalgas y las bacterias obtenidas mediante este análisis fue de 0.80 y  $p < 0.05$  (Figura 4a).

En la Tabla III B se presenta la abundancia promedio de bacterias mediante el conteo directo para el nivel Fernbach. En el inicio del cultivo fue de  $4.5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y para el quinto día se incrementó en un 22 % con respecto al día del inóculo ( $10.3 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). El porcentaje promedio de bacterias cultivables fue de  $1.08 \% \pm 1.13$ , con respecto a las bacterias del conteo directo. El coeficiente de correlación ( $r$ ) de microalgas y bacterias para este nivel es de 0.75 y  $p < 0.05$  (Figura 4b).

En el control en Fernbach (Tabla III C) la concentración promedio de bacterias varió de  $8 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  para el día del inóculo a  $2.5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para el último día (5), con un porcentaje  $8.5 \% \pm 0.40$  de bacterias conteo en placa contra conteo directo.

La abundancia promedio de bacterias en el conteo directo para garrafón se observa en la Tabla IV A. La mayor cantidad de bacterias se detectó en el quinto día ( $21.1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) siendo el doble que las encontradas en los días tres y cuatro así como las detectadas en el nivel Fernbach para el mismo día del cultivo (Tabla III B). El porcentaje de bacterias heterótrofas obtenidas mediante conteo en placa con respecto a las bacterias mediante conteo directo, fue en promedio de  $1.72 \% \pm 1.06$  (Tabla IV A). Las microalgas y las bacterias obtenidas mediante conteo directo mostraron estar relacionadas ya que el coeficiente de correlación fue alto (0.85 y  $p < 0.05$ ) (Figura 4c).

En el control a nivel garrafón (Tabla IV B) se encontraron valores similares en los diferentes días que duró el experimento (con un valor promedio de  $4.8 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). En este caso se encontraron los mayores porcentajes de bacterias heterótrofas con respecto a conteo directo con 71.29 para el día quinto.

La mayor concentración promedio de bacterias ( $9.5 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) para el nivel columna (Tabla IV C) se contó en el tercer día de cultivo, a diferencia de los niveles anteriores que siempre fue en los últimos días del mismo. Los valores mínimos se midieron al inicio ( $1.3 \times 10^7$ ) y al final ( $1.1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). El porcentaje promedio de bacterias cultivables fue de  $0.87 \% \pm 0.56$ , con respecto a las bacterias del conteo directo. El coeficiente de correlación fue bajo 0.27 y una  $p = 0.34$ .

En la Figura 5 se observa una fotografía tomada para el conteo directo en donde se observaron tanto las células de microalgas como de las bacterias, algunas de estas adheridas a las microalgas.

### **V.3.3. Abundancia de bacterias *Vibrio* spp.**

El crecimiento promedio de bacterias en TCBS clasificadas en este trabajo como tipo *Vibrio* se pudieron observar en el control sin microalgas y en columna. La mayor cantidad de estas ( $> 300$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) se encontró en el control sin microalgas para el nivel en Fernbach (Tabla III C) en los últimos tres días de cultivo. En Columna el valor más alto fue de 30 UFC  $\text{mL}^{-1}$  en el día tercero (Tabla IV C).

### **V.3.4. Abundancia de bacterias Nitrificantes**

La concentración de bacterias nitrificantes en el cultivo de microalgas se observa en la Tabla III y IV. A partir del segundo día se observó en el caso del género *Nitrosomonas* en Erlenmeyer (Tabla III A), una tendencia a aumentar alcanzando un máximo de 230

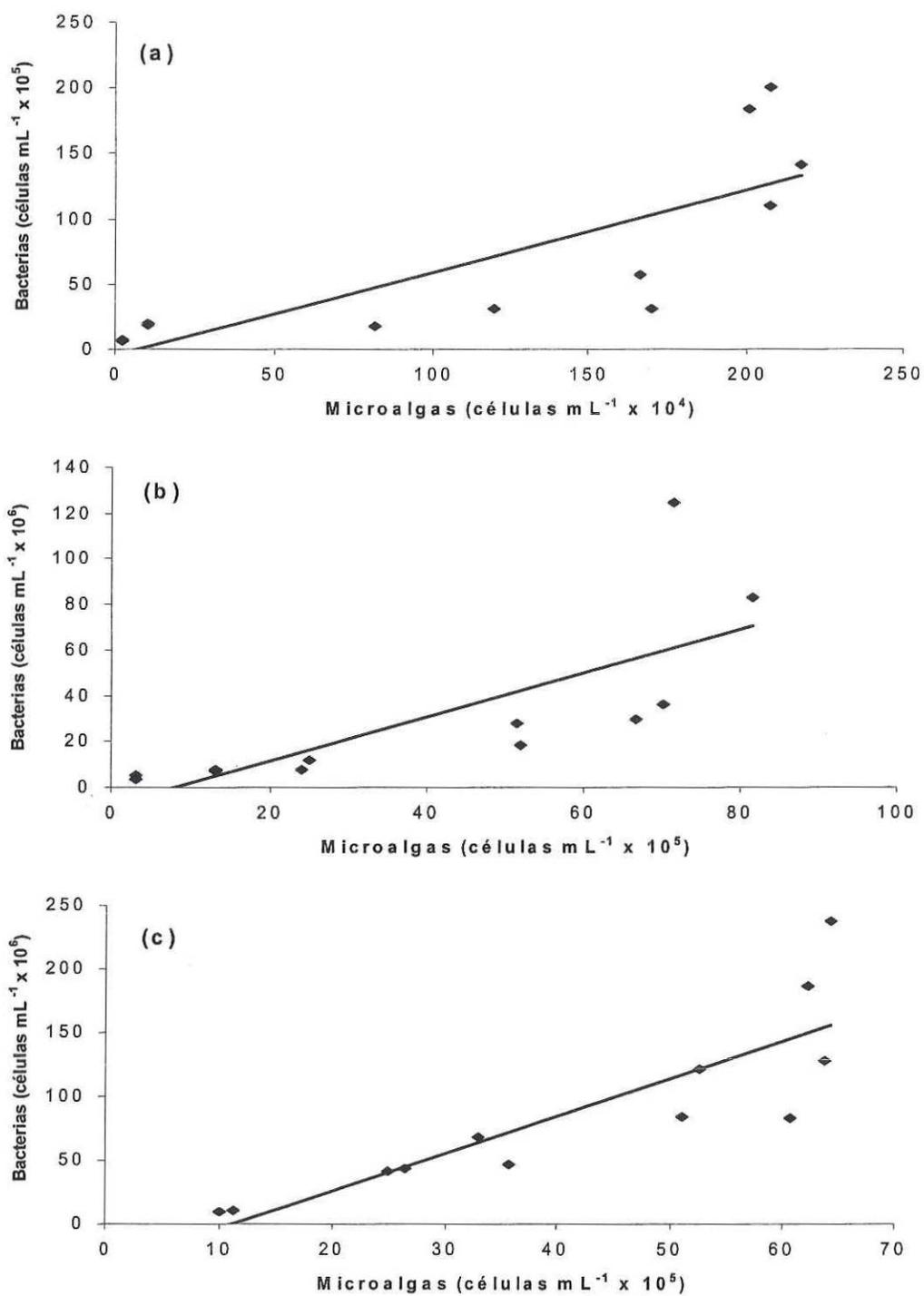


Figura 4. Coeficiente de correlación microalgas y bacterias conteo directo del cultivo de *Chaetoceros muelleri* en: (a) 400 mL, (b) 2 L y (c) 18 L.

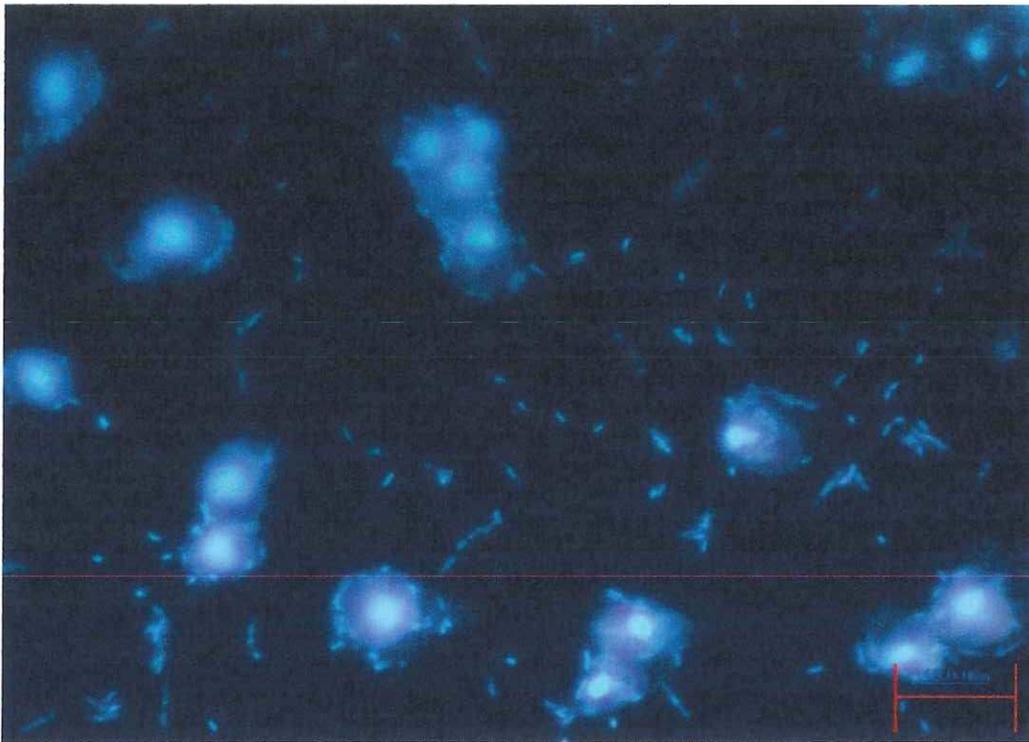


Figura 5. Tinción con DAPI. Bacterias adheridas a la superficie de las microalgas (epifitas) y algunas de vida libre. Cultivo de microalgas en garrafón, día quinto.

NMP  $100 \text{ mL}^{-1}$ , en los días cuarto y quinto, mientras que las concentraciones de bacterias del género *Nitrobacter* fueron  $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  en todos los días del cultivo. Para el caso del cultivo en Fernbach (Tabla III B) las concentraciones de *Nitrosomonas* fueron muy homogéneas, fluctuando entre  $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  en el día del inóculo y  $48 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  para el quinto día de cultivo, mientras que para *Nitrobacter* el valor máximo ( $125 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) ocurrió en el quinto día.

En el control sin microalgas para el nivel Fernbach (Tabla III C), se encontraron concentraciones de  $230 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  de bacterias nitrificantes del género *Nitrosomonas*

manteniéndose uniformes durante todos los días, mientras que las concentraciones de *Nitrobacter* fueron bajas y uniformes ( $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) para todos los días de cultivo.

En el siguiente nivel (garrafón, Tabla IV A), la concentración de bacterias *Nitrosomonas* fue mayor al límite de detección inferior desde el primer día ( $62 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), encontrando el valor mas alto en el día tres del cultivo de microalgas con  $230 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ , notándose que para los días cuatro y cinco disminuyeron ( $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), mientras que la de *Nitrobacter* sólo se incrementó a  $62 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  en el quinto día.

Los valores registrados en el control de este nivel estuvieron en el límite de detección inferior, tanto para *Nitrosomonas* como *Nitrobacter* (Tabla IV B).

La concentración de bacterias nitrificantes en el nivel de columna (Tabla IV C) del género *Nitrosomonas* alcanzó un máximo para el cuarto día ( $230 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), manteniéndose estable para los días restantes del cultivo, la presencia de *Nitrobacter* se mantuvo dentro del límite de detección inferior ( $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

#### V.4. Consumo de Nitratos

La concentración residual promedio de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el día inicial a nivel Erlenmeyer fue de  $961.7 \mu\text{M}$ , durante los siguientes cinco días de cultivo se observó una disminución llegando a consumirse el 60.8 % de los mismos al final del cultivo. El mayor consumo fue en el día 3 con  $213.7 \mu\text{M}$  (Tabla V A). Los valores máximos de consumo coinciden con la fase exponencial de las microalgas, asimismo el consumo disminuye a medida que entran en la fase de lento crecimiento (Figura I A). En total se consumió  $585.1 \mu\text{M}$ .

En el nivel Fernbach se consumió el 97.8 % del nitrato disponible. La concentración inicial y final fue de 764.1  $\mu\text{M}$  y 16.8  $\mu\text{M}$  respectivamente (Tabla V B). La concentración residual promedio mostró una relación inversa con el crecimiento de las microalgas y las bacterias. La concentración residual promedio en el control de este nivel (Fernbach) fue muy similar en los diferentes días del cultivo. En este tratamiento se observaron incrementos en los nitratos. Los valores de la concentración residual promedio, consumo acumulado y porcentaje no muestran consumo por la ausencia de microalgas (Tabla V C).

La concentración residual promedio de  $\text{NO}_3^-$  en garrafón en el día inicial fue de 937.2  $\mu\text{M}$ , misma que disminuyó en un 20 % para el día uno del cultivo y al final del cultivo mas del 98 % fue consumido. Mientras que en el día dos se encontró el mayor consumo con 329  $\mu\text{M}$  (Tabla VI A)

En la Tabla VI B se observan los valores de concentración residual promedio para el control en el nivel garrafón. No se aprecia consumo de nitratos en porcentaje y en consumo acumulado, lo cual es de esperarse ya que no hay microalgas.

La concentración residual promedio de nitratos en el nivel columna (Tabla VI C), inició con 834.7 y finalizó con 335.4  $\mu\text{M}$ , habiéndose consumido más de la mitad (59.8 %) para el sexto día de cultivo. El consumo de  $\text{NO}_3^-$  fue disminuyendo lentamente a partir del día 3 hasta alcanzar 45.2  $\mu\text{M}$  de consumo diario al final del experimento. El mayor consumo ocurrió en el día 2 (125.7  $\mu\text{M}$ ).

Tabla V. Concentración residual promedio y consumo diario promedio de nitratos en *Chaetoceros muelleri* cultivada en: (A) 400 mL, (B) 2 L y (C) control sin microalgas en Fernbach, con medio f/2.

(A)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	961.7			
1	936.8	24.9	24.9	2.6
2	752.9	183.9	208.8	21.7
3	539.2	213.7	422.5	43.9
4	434.5	104.7	527.2	54.8
5	376.6	57.9	585.1	60.8

(B)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	764.1			
1	699.1	65.0	65.0	8.5
2	514.3	184.9	249.9	32.7
3	225.6	288.7	538.6	70.5
4	17.9	207.7	746.3	97.7
5	16.8	1.0	747.3	97.8

(C)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	831.44			
1	843.30	-11.9	-11.9	-1.4
2	863.75	-20.5	-32.3	-3.9
3	838.51	25.2	-7.1	-0.9
4	902.85	-64.3	-71.4	-8.6
5	889.82	13.0	-5.5	-0.7

Tabla VI. Concentración residual promedio y consumo diario promedio de nitratos en *Chaetoceros muelleri* cultivada en: (A) 18 L, (B) control sin microalgas en garrafón y (C) 400 L, con medio f/2.

(A)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	937.2			
1	749.3	188.0	188.0	20.1
2	420.3	329.0	517.0	55.2
3	151.6	268.7	785.7	83.8
4	10.4	141.2	926.9	98.9
5	26.6	-16.1	910.7	97.2

(B)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	937.07			
1	949.10	-12.0	-12.0	-1.3
2	937.78	11.3	-0.7	-0.1
3	958.70	-20.9	-21.6	-2.3
4	941.65	17.1	-4.6	-0.5
5	934.45	7.2	-0.6	-0.1

(C)				
Día	Concentración residual ( $\mu\text{M}$ )	Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado ( $\mu\text{M día}^{-1}$ )	Consumo acumulado %
0	834.7			
1	760.0	74.7	74.7	8.9
2	634.3	125.7	200.4	24.0
3	522.5	111.8	312.3	37.4
4	437.8	84.7	397.0	47.6
5	380.6	57.2	454.1	54.4
6	335.4	45.2	499.4	59.8

### V.5. Nitritos y amonio

En general los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) se incrementaron conforme transcurría el tiempo mientras que lo contrario ocurrió con los nitratos.

En Erlenmeyer para el día del inóculo se registró una concentración promedio de nitritos de  $0.68 \mu\text{M}$ , con incrementos en los días siguientes, con un valor de  $14.24 \mu\text{M}$  para el día quinto (Tabla VII A).

En Fernbach para el día inicial la concentración promedio de  $\text{NO}_2^-$  fue de  $1.88 \mu\text{M}$  con un valor máximo de  $13.59 \mu\text{M}$  para el tercer día, disminuyendo a un valor de  $0.66 \mu\text{M}$  para el quinto día (Tabla VII A).

En el control la concentración inicial promedio de nitritos fue  $2.09 \mu\text{M}$ , disminuyendo a  $0.93 \mu\text{M}$  en el siguiente día. En los días sucesivos los valores fueron similares con ligeros incrementos en el segundo día ( $1.28 \mu\text{M}$ ) y en el quinto día ( $1.65 \mu\text{M}$ ) (Tabla VII A).

La concentración promedio de nitritos en garrafón en el día del inóculo fue de  $2.57 \mu\text{M}$  con un valor máximo en el tercer día ( $12.63 \mu\text{M}$ ) con tendencia a disminuir en los días siguientes,  $0.67$  y  $0.42 \mu\text{M}$  para el cuarto y quinto día respectivamente (Tabla VII B).

Las concentraciones promedio de nitritos en el control a nivel Garrafón fueron homogéneas con un valor de  $0.60 \mu\text{M} \pm 0.40$  (Tabla VII B).

En la tabla VII B se observan los valores de concentración promedio de nitritos para el escalamiento en columna, notándose la tendencia a incrementar con un valor de  $0.95 \mu\text{M}$  para el día inicial y un valor de  $17.15 \mu\text{M}$  en el sexto día.

Tabla VII. Concentración promedio de nitritos ( $\mu\text{M}$ ) en el agua de cultivo de *Chaetoceros muelleri* en el nivel (A) Erlenmeyer, Fernbach y Control sin microalgas, (B) Garrafón, Control sin microalgas y Columna.

**(A)**

Día de cultivo	Nitritos		
	Erlenmeyer	Fernbach	Control
0	0.68	1.88	2.09
1	1.18	4.42	0.93
2	2.72	10.56	1.28
3	12.88	13.59	1.41
4	14.45	1.17	1.54
5	14.24	0.66	1.65

**(B)**

Día de cultivo	Nitritos		
	Garrafón	Control	Columna
0	2.57	0.59	0.95
1	6.04	0.59	4.06
2	10.60	0.62	10.00
3	12.63	0.64	14.23
4	0.67	0.62	15.97
5	0.42	0.54	17.07
6	-----	-----	17.15

Con respecto a la concentración promedio de amonio se observan valores altos para todos los niveles en el agua de cultivo de *Chaetoceros muelleri*. Esta forma química del nitrógeno no fue suministrada por el medio f/2, además no se observa consumo de este compuesto (Tabla VIII).

Tabla VIII. Concentración promedio de Amonio ( $\mu\text{M}$ ) en el agua de cultivo de *Chaetoceros muelleri* en el nivel (A) Erlenmeyer, Fernbach y Control sin microalgas, (B) Garrafón, Control sin microalgas y Columna.

**(A)**

Día de cultivo	Amonio		
	Erlenmeyer	Fernbach	Control
0	1171.26	1067.64	1114.41
1	1216.37	1082.94	1172.48
2	1075.51	1186.67	1164.50
3	1127.71	1118.95	1117.96
4	1097.34	1060.00	1182.68
5	1036.50	1200.41	1199.30

**(B)**

Día de cultivo	Amonio		
	Garrafón	Control	Columna
0	245.87	109.88	104.30
1	205.58	99.91	117.50
2	239.08	83.22	90.97
3	200.60	134.50	113.84
4	226.17	84.18	112.22
5	234.82	93.19	106.40
6	-----	-----	126.33

#### V.6. Análisis bacteriológico y nutrientes en el agua de mar

La concentración de bacterias presentes en el agua de mar de la pila de abastecimiento y del agua de mar filtrada pasada por UV utilizada en los diferentes niveles de cultivo, se muestra en la Tabla IX. La mayor concentración de bacterias heterótrofas ( $1.5 \times 10^4$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) se presentó en el agua de mar filtrada pasada por UV, para el día del escalamiento en el nivel Fernbach, mientras que el mayor número de bacterias ( $1.7 \times 10^6$

células mL<sup>-1</sup>) mediante el conteo directo se presentó en el agua filtrada y pasada por UV usada para el cultivo a nivel de Erlenmeyer.

Tabla IX. Concentración de bacterias heterótrofas (UFC mL<sup>-1</sup>), conteo directo (cél mL<sup>-1</sup>), *Vibrio* spp. (UFC mL<sup>-1</sup>), nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (NMP 100 mL<sup>-1</sup>), en el agua de mar de la pila de abastecimiento (P) y agua de mar filtrada pasada por UV para ser usada al inicio del cultivo en Erlenmeyer (UVE), en el nivel Fernbach (UVF) y en el nivel columna (UVC), respaldo para el control en Fernbach (RF) y respaldo para el control en garrafón (RG).

Lugar	Heterótrofas (UFC mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>4</sup> )	Conteo directo (cél mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	<i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Nitrificantes	
				<i>Nitrosomonas</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	<i>Nitrobacter</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )
P	0.69	1.50	60	<18	<18
UVE	0.45	1.77	0	<18	<18
UVF	1.55	1.23	0	<18	<18
UVC	0.07	0.86	0	<18	<18
RF	11.50	19.44	0	230	<18
RG	193.00	88.51	0	<18	<18

Con respecto a las bacterias *Vibrio* sp. únicamente se encontraron en la muestra de agua de la pila de abastecimiento (60 UFC mL<sup>-1</sup>).

La concentración de bacterias nitrificantes de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en el agua de mar de la pila de abastecimiento y del agua de mar filtrada pasada por UV utilizada en los diferentes niveles de cultivo, fueron bajas (< 18 NMP 100 mL<sup>-1</sup>).

En el agua de mar de la pila de abastecimiento se encontró una concentración de 22.43 µM de nitratos, 0.51 µM de nitritos y 86.64 µM de amonio. En el agua de mar filtrada e irradiada con UV en diferentes días se encontraron concentraciones promedio de 14.07 µM de nitratos, 0.46 µ de nitritos y 65.44 µM de amonio (Tabla X).

Tabla X. Concentración de nutrientes ( $\mu\text{M}$ ) en el agua de mar P (pila de abastecimiento) UV e, f y c, (agua de mar filtrada y pasado por UV e = usada para el cultivo a nivel Erlenmeyer, UV f= usada para el cultivo en Fernbach y UV c = usada para el cultivo en columna).

<b>Lugar</b>	<b>Nitratos</b>	<b>Nitritos</b>	<b>Amonio</b>
P	22.43	0.51	86.64
UV e	15.00	0.56	134.14
UV f	18.50	0.55	44.91
UV c	8.72	0.29	17.29

## **VI. DISCUSIÓN**

### **VI.1 Variables fisicoquímicas**

Entre los principales factores que influyen en la calidad y cantidad celular de las microalgas figuran: la temperatura (Thompson y Guo, 1992), luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006), salinidad (Fujii *et al.*, 1995) pH y la limitación de los nutrientes (Valenzuela-Espinoza, 1997; Medina Reyna y Cordero-Esquivel, 1998).

La temperatura promedio de los cultivos de manera general se mantuvo dentro del intervalo de las temperaturas promedio (20-25 °C) reportadas como óptimas para el cultivo de especies de este género (<http://www.marine.csiro.au/algaedb/default.htm>), a excepción del último nivel de cultivo (columna 400L) donde por un problema técnico la temperatura disminuyó en promedio 1°C por día, registrando la temperatura más baja (18.5°C) en los tres últimos días de cultivo.

Investigaciones realizadas por López-Elías (2002) en laboratorios en el Noroeste de México muestran que esta especie de diatomea puede crecer en temperaturas superiores (35-50°C), incrementando su velocidad de crecimiento, pero en estos casos es necesario disminuir el tiempo de cosecha, no es recomendable llegar a temperaturas altas por el estrés que causan a las células microalgales (Liang *et al.*, 2006).

### **VI.2 Crecimiento de las microalgas**

Las microalgas crecieron dentro del intervalo esperado para su especie en número de células y similar al reportado por otros autores (Medina-Reyna y Cordero-Esquivel, 1998; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999a; Pacheco-Vega, 2003).

En cultivos estáticos, el incremento en el número de células sigue un patrón característico, en el cual se observan diferentes fases en relación al tiempo y condiciones de cultivo (Fogg, 1975). La velocidad con que las células del cultivo pasan de una fase a otra depende del tamaño del inóculo y el estado metabólico en el que se encuentren.

Durante este experimento en ninguno de los niveles de cultivo se presentó la fase de acondicionamiento. Esto puede deberse a que las células microalgales venían de una fase exponencial y no habían entrado en la fase de lento crecimiento y en cuanto se reestablecieron las condiciones idóneas de cultivo suministradas en el medio f/2 las células continuaron reproduciéndose, o quizás esta fase de acondicionamiento fue tan corta que no fue posible observarla.

En Erlenmeyer la baja densidad celular utilizada como inóculo ( $2.2 \times 10^4$ ) permitió probablemente que la fase exponencial fuera mayor que en los otros niveles.

La mayor biomasa encontrada en nivel Fernbach puede deberse a la inyección de  $\text{CO}_2$  en forma gaseosa, para contrarrestar el efecto negativo de un pH elevado. Esto mismo fue el caso del garrafón, además en éste la aplicación de aireación, permitió que las células estuvieran en constante movimiento y tuvieran la misma disponibilidad de luz y nutrientes. Esto también ha sido observado por otros autores con resultados similares (Medina-Reyna y Cordero-Esquivel, 1998)

En los últimos días de cultivo es común encontrar mayor biomasa (número de células) ya que aunque los cultivos no crecen de forma exponencial, continúan creciendo hasta que las condiciones lo permiten antes de llegar a la fase de muerte. Es precisamente en la fase exponencial donde se observa que las células se duplican sucesivamente y se registran las mayores tasas de crecimiento específico ( $\mu$ ), así como el mayor número de

divisiones por día. Podríamos señalar que este es un ciclo normal del crecimiento en las microalgas en cultivo reportadas por algunos autores en diferentes géneros y especies.

En la mayoría de los experimentos con microalgas, bajo condiciones controladas, se llega al nivel de garrafón y en laboratorios comerciales la finalidad es llegar a cultivos masivos en grandes volúmenes (300 L en adelante), de acuerdo a los requerimientos de la empresa (López-Elías *et al.*, 2005b). En este trabajo se llegó a nivel columna (400 L) donde la producción de células de microalgas en términos generales se puede considerar alta ya que algunos laboratorios comerciales alcanzan producciones promedio entre  $0.80-1.84 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  a las 48 horas (López-Elías, 2002) y en este trabajo se alcanzó una producción de  $2 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en el mismo tiempo (Tabla II D).

### VI.3. Crecimiento de bacterias

Se observó que el crecimiento de bacterias fue abundante, con esto se demuestra que el cultivo de *Chaetoceros muelleri* no se mantuvo axénico ya que es prácticamente imposible mantener los cultivos de microalgas libres de bacterias por la asociación que existe entre ellas (Rico-Mora, 1995; Munro *et al.*, 1995), algunos autores muestran relaciones de epifismo por algunas bacterias, ya que pueden crecer adheridas a la superficie de las microalgas (Jensen *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2005). En este estudio y mediante fotografías tomadas para el conteo directo realizado por microscopía de epifluorescencia se observó este hecho (Figura 5).

González del Valle (1997), en una investigación realizada con seis especies de microalgas, entre ellas una especie de *Chaetoceros*, aisló cepas bacterianas e intentó hacer crecer a estas en agua de mar con el medio f/2 de Guillard, no encontró resultados

favorables. En este estudio también se usaron 2 controles en diferentes niveles. En el nivel Fernbach usado como control se encontró que en los primeros días la concentración promedio de bacterias disminuyó y después se incrementaron a medida que empezaron a desarrollarse microalgas producto de contaminación en el control. A diferencia del control en garrafón donde la concentración promedio de bacterias se mantuvo estable, tendiendo a disminuir sin registrarse aumentos. Esto indica una posible relación microalga-bacterias donde las bacterias dependen de las microalgas para su crecimiento.

Esto concuerda con lo que argumentan varios autores, que indican que uno de los principales procesos reguladores del crecimiento bacteriano en el océano es la disponibilidad de carbono orgánico disuelto (Goldman *et al.*, 1987; Kirchman, 1990; Felip *et al.*, 1996) y que los mayores flujos de materia orgánica producidos por el fitoplancton (liberación de exudados y rompimiento de células) son aprovechados por las bacterias, las cuales remineralizan la materia orgánica y proveen nutrientes al fitoplancton (Azam *et al.*, 1983).

Una fuente que aportó bacterias al sistema de cultivo de *Chaetoceros muelleri* fue el agua de mar utilizada, aunque esta es filtrada e irradiada con UV se detectaron concentraciones importantes. El valor más alto encontrado en el agua que se usó para el nivel en Fernbach se debe probablemente a que el agua que se utilizó tenía dos días de almacenamiento. La disminución que se observa en la concentración de bacterias para el día del inóculo en Erlenmeyer, con respecto a la fuente del agua, es quizás porque fue esterilizada en autoclave, lo cual no se pudo observar en el siguiente nivel debido a que los cultivos con microalgas aportan bacterias a medida que se van escalando.

González-Galindo (2003) encontró resultados similares al usar agua de mar envejecida y filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$ , agua filtrada 0.2  $\mu\text{m}$  y esterilizada en autoclave.

### VI.3.1 Bacterias heterótrofas

La concentración de bacterias heterótrofas en los niveles Erlenmeyer ( $1.7 \times 10^5$ ), Fernbach ( $1.6 \times 10^6$ ), garrafón ( $3 \times 10^6$ ) y columna ( $1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), se encuentran dentro de los valores aceptables para el cultivo de microalgas siendo similares a los reportados por Lizárraga-Partida *et al.* (1997) ( $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), en un sistema de microalgas de un laboratorio comercial de postlarvas de camarón. Sin embargo, los resultados de bacterias totales obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia fueron superiores a los de conteo en placa y esto concuerda con lo encontrado por otros investigadores, quienes mencionan que solamente el 1% de las bacterias son detectadas. La razón de ello es que en el cultivo de microalgas pueden encontrarse bacterias viables que no pueden recuperarse mediante técnicas tradicionales de laboratorio como conteo en placa, el cual utiliza medios específicos.

Las concentraciones de bacterias heterótrofas se relacionan con la densidad celular de las microalgas, ya que las mayores concentraciones en ambas se presentaron en los niveles Fernbach y garrafón y las mínimas en Erlenmeyer y columna. De la misma manera los resultados en la abundancia de las bacterias heterótrofas hasta el final del cultivo en todos los niveles con excepción de columna, sugiere una relación simbiótica con las microalgas ya que ambas aumentaban conforme transcurría el tiempo, esto posiblemente es por los productos de exudación liberados por el fitoplancton los cuales son asimilados por las bacterias y estas a su vez aportan sustancias que benefician a las microalgas.

Suminto y Hirayama (1996) y Fukami *et al.*, (1997) sugieren que el crecimiento óptimo de las microalgas se da usualmente en compañía de bacterias específicas. Esta asociación alga-bacteria es muy importante ya que el fitoplancton excreta una gran variedad de compuestos orgánicos incluyendo, péptidos, aminoácidos, carbohidratos y lipopolisacáridos. Estos pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias adheridas a la superficie del alga. Las bacterias a su vez pueden proveer alternadamente factores de crecimiento, vitaminas o remineralizar nutrientes (Graham y Wilcox, 2000).

A su vez Gómez-Gil (2002), realizó un bioensayo cultivando *Vibrio alginolyticus* junto a *Chaetoceros muelleri* y encontró que la bacteria no afecta el crecimiento de la microalga y que la cepa de *Vibrio* creció mejor al ser cultivada junto a la microalga que cuando fue cultivada sola. Éste autor atribuyó el incremento de la cepa bacteriana a la producción de nutrientes por *C. muelleri* o por la alta materia orgánica disponible cuando las células de las microalgas mueren. Además observó la presencia de bacterias heterótrofas en el cultivo de microalgas que no fueron identificadas las cuales no afectaron los resultados.

En este trabajo la reducción del crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en columna podría relacionarse con la declinación de la biomasa bacteriana, ya que la disminución de la actividad metabólica bacteriana indica menos exportación de algún factor de crecimiento requerido por la microalga. Resultados similares fueron encontrados por Soto *et al.* (2005), con la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*, aunque como es conocido en los cultivos de las microalgas intervienen otros factores, entre ellos la cantidad y calidad de luz.

Los altos valores de correlación encontrados en los tres primeros niveles de cultivo entre microalgas y bacterias totales, mediante conteo directo, indican algún tipo de dependencia entre estos microorganismos. El coeficiente de correlación negativo encontrado en el último nivel pudiera deberse a variables ambientales como la temperatura la cual influyó principalmente en el crecimiento de las bacterias.

### VI.3.2. Bacterias tipo *Vibrio*

No obstante que las bacterias del género *Vibrio* son abundantes en el agua de mar (Simidu y Tsukamoto, 1985) y que se detectaron en el agua de la pila de abastecimiento (Tabla IX) en la cual se almacena el agua que se utiliza para el cultivo de microalgas. Los análisis bacteriológicos en los niveles Erlenmeyer, Fernbach y garrafón indican la ausencia de este tipo de bacterias en el cultivo de *Chaetoceros muelleri*, esto se debe al control de calidad establecido en el Laboratorio de Microalgas Marinas así como el tratamiento del agua de mar (como la filtración y radiación ultravioleta), los cuales reducen significativamente las poblaciones de esta bacteria (Santiago-Serrano, 1996). Aunque no se descarta la posibilidad de que la microalga exude un compuesto antibacteriano como el reportado por Wang (1999), el cual obtuvo a partir de *Chaetoceros* un extracto activo en contra de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio cholerae*

En el control en Fernbach, se encontraron  $>300$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Vibrio* spp. a partir del tercer día de cultivo cuando se desarrollaron también microalgas. Probablemente las concentraciones de microalgas no fueron suficientes para generar antibiosis, ya que las microalgas exudan diferentes compuestos los cuales pueden variar dependiendo de la fase de crecimiento y la condición fisiológica y en ocasiones en lugar de inhibir el crecimiento

de bacterias lo estimulan (Gómez-Gil, 2002). Kogure *et al.* (1979) encontraron que los productos extracelulares de *Skeletonema costatum*, en fase de crecimiento exponencial, tienen un efecto estimulante sobre las bacterias del género *Flavobacterium* y una acción de tipo antibiótico para *Pseudomonas* y *Vibrio*.

La ausencia de *Vibrio* spp. en el control a nivel garrafón se explica por el tratamiento del agua y por la disminución de las concentraciones de bacterias en comparación con las detectadas a nivel Fernbach, por tanto la probabilidad de detectarla también disminuyó.

La presencia de *Vibrio* en la columna se debe a que en esta etapa del cultivo se utiliza agua que no lleva el mismo tratamiento que en los otros niveles. Además, es de destacar que en este nivel se presentaron condiciones fisicoquímicas diferentes a los otros niveles como la disminución de temperatura (21.5-18.5°C), lo cual pudo influir en el metabolismo y en la generación de productos de exudación de la microalga, entre ellos los compuestos antibacterianos anteriormente mencionados.

Por los resultados se nota la necesidad de establecer en los laboratorios de acuicultura un sistema de prevención y control de bacterias, ya que mundialmente se han reportado enfermedades ocasionadas por bacterias del género *Vibrio* en cultivos de peces (Austin y Austin, 1993) y camarones marinos (Lightner, 1993), la cual afectan los cultivos masivos con las subsecuentes pérdidas económicas. Aunque hay que reconocer que no todas las especies de bacterias presentes en los cultivos son patógenas, pero pueden actuar como invasores secundarios.

### VI.3.3 Bacterias nitrificantes y su relación con los nutrientes

En los cuatro niveles del cultivo de *Chaetoceros muelleri* se encontró una relación de las bacterias nitrificantes con los nutrientes y una clara sucesión bacteriana ya que primeramente se detectó a *Nitrosomonas* y luego a *Nitrobacter*, lo que muestra que este cultivo está en equilibrio ecológico, ya que la oxidación del amonio a nitratos requiere de reacciones metabólicas sucesivas de estas bacterias nitrificantes. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Sánchez-Saavedra (1989), Gieseke *et al.* (2001) y Simental-Oceguera (2001), en sistemas de microalgas y biopelículas, los cuales encontraron que las bacterias nitrificantes regeneran los nutrientes en etapas, presentándose primeramente *Nitrosomonas* sp. y posteriormente *Nitrobacter* sp.

La tendencia general de encontrar mayores concentraciones de *Nitrosomonas* en los últimos días del cultivo, indica que es un medio no limitado por nutrientes ya que en ninguno de los niveles se consumió el 100 % de nitratos, permitiendo así el crecimiento tanto de bacterias como de microalgas. Las mayores concentraciones de *Nitrosomonas* se deben probablemente a uno o varios factores relacionados que aportan amonio al sistema de cultivo como son: materia orgánica proveniente de excreción y la descomposición de células microalgales, desnitrificación llevada a cabo por bacterias y microalgas, además de la presencia de nutrientes en el agua de mar (Carpenter y Capone 1983; Conn, *et al.*, 2000).

Las mayores concentraciones de *Nitrosomonas* en el control en Fernbach no se deben a una alta oxidación de amonio a nitritos mas bien están relacionados con las bacterias detectadas en el respaldo 230 NMP 100 mL<sup>-1</sup> (Tabla IX). Estas no mostraron incrementos con respecto al tiempo posiblemente por la menor presencia de las microalgas,

las cuales sólo se desarrollaron en los últimos días de cultivo y en menores concentraciones. Esto se comprueba con los resultados obtenidos en el control en garrafón donde no hubo desarrollo de microalgas y se encontraron bajas concentraciones de *Nitrosomonas*  $<18 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$  (Tabla IX) provenientes del respaldo las cuales se mantuvieron constantes.

Las menores concentraciones de *Nitrosomonas* detectadas en los primeros días del cultivo en los niveles Fernbach, garrafón y columna son efecto de la dilución al ser escaladas al siguiente nivel.

Las concentraciones mayores de nitritos en los niveles Erlenmeyer, garrafón y columna se relacionaron con los valores máximos de *Nitrosomonas*, ya que estas poseen la capacidad de oxidar el amonio a nitritos, mientras que su disminución en el quinto día del cultivo a nivel Fernbach y garrafón se relaciona con las concentraciones mayores de *Nitrobacter*, ya que esta los utiliza para formar nitratos, mismos que no pudieron ser detectados probablemente porque fueron utilizados rápidamente por la microalga. Aunque las microalgas no utilizan directamente los estados de oxidación más altos del nitrógeno como los nitratos mediante un proceso de reducción asimilativa estos son reducidos a amonio utilizando las enzimas nitrato y nitrito reductasa (Guerrero *et al.*, 1981).

Es de destacar que en estos dos niveles se detectaron la menor concentración residual y los porcentajes mayores de consumo asimilado de nitratos, lo cual indica una mayor demanda de este nutriente por la microalga. Los valores negativos que se encontraron en los controles y en el último día del cultivo en garrafón indican producción de nitratos por bacterias. Simental-Oceguera (2001) encontró pequeños incrementos en los

valores de nitratos en los últimos días de un cultivo con *Isochrysis* aff. galbana y *Rhodomonas* sp.

#### **VI.4. Fuentes de Nitrógeno**

Las concentraciones de nitratos y nitritos en el cultivo de *Chaetoceros muelleri* no fueron limitantes para su crecimiento, siendo aportados por el medio f/2 de Guillard el cual contiene la cantidad adecuada de nutrientes para asegurar el buen desarrollo de la microalga. Además se debe tomar en consideración que el agua de mar utilizada también aportó nutrientes al cultivo (Tabla X).

El agua de mar contribuye al crecimiento de fitoplancton y dependiendo de si la fuente proviene de una zona oligotrófica o eutrófica será el aporte de nutrientes. Por eso cuando se realizan cultivos intensivos es necesario enriquecer el agua por ejemplo con el medio f/2 Guillard (1975) para el buen desarrollo del cultivo de microalgas.

Las concentraciones elevadas de amonio en los diferentes niveles del cultivo no son resultado de la actividad biológica de los microorganismos y no corresponden a un cultivo de microalgas en donde la fuente de nitrógeno es el nitrato ya que solamente a un pH superior a 9 se pueden encontrar concentraciones importantes de amonio (Pacheco *et al.*, 2002) valor superior a los registrados en este trabajo (Tabla VIII). Por tanto se sospecha que las muestras se contaminaron en alguna etapa del proceso.

##### **VI.4.1. Consumo de Nitratos**

La concentración de nutrientes en el medio, en este caso el nitrato (Tabla V-VI) se relaciona inversamente con la densidad celular de las microalgas, lo que ocasiona que la

disponibilidad de estos sea menor conforme transcurre el tiempo del cultivo. Varios autores han encontrado resultados similares para otras especies de microalgas (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999b; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005; González-Muñoz, 2006).

Los estudios antes mencionados se realizaron comparando diferentes fuentes de nitrógeno utilizando fertilizantes agrícolas como medios alternativos al f/2. En este trabajo el único aporte de nitrógeno se hizo en forma de nitratos el cual es un constituyente mayoritario del medio f/2 (Tabla I).

En el caso de Erlenmeyer y columna se observó que aún cuando había el 40% de nitratos disponibles para ser consumidos, ni las microalgas, ni las bacterias continuaron con su fase de crecimiento exponencial. En los otros niveles (Fernbach y garrafón) donde hubo un mayor crecimiento los nitratos fueron consumidos casi en su totalidad no afectando la población bacteriana ni la microalgal, por lo cual podemos determinar que los nitratos no constituyeron una limitante en el desarrollo del cultivo y que las bacterias no compitieron con el fitoplancton (se sabe que en el medio natural compiten por los nutrientes, Elser *et al.*, 1995; Joint *et al.*, 2002) debido a que se puede considerar que el medio f/2 de Guillard proporciona suficiente cantidad de nutrientes para que esto no suceda.

Si se relaciona esto con la producción de microalgas se puede estimar que todavía hay suficiente nitrato para que los cultivos continúen. Sin embargo al observar la Tabla II A se encuentra para el último día la menor tasa de crecimiento específica ( $\mu=0.04$ ). Algunos autores mencionan que no hay una relación directa entre la concentración de nutrientes con la producción celular final (Fábregas *et al.*, 1984; Barrera-Hernández 1993).

Los mismos autores (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999b; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005; González-Muñoz, 2006), también han reportado que de estar presente el

nitrógeno en forma de amonio y de nitratos las microalgas consumen preferentemente el amonio, esto es debido al menor costo energético que implica el consumo de amonio (Thompson *et al.*, 1989; Dortch *et al.*, 1991).

Se registraron valores altos de amonio en todos los niveles de cultivo, y no se vio incrementado su consumo, contrario a lo que se esperaría.

Como se menciono anteriormente en este trabajo los nutrientes en forma de nitratos no fueron limitantes para el cultivo de *Chaetoceros muelleri*, no obstante, no se alcanzó a determinar si con la regeneración por parte de las bacterias nitrificantes se puede sostener el cultivo de microalgas, ya que éstas se cosecharon al quinto día en cada nivel. Además no se descarta la posibilidad de que las bacterias heterótrofas por su función conocida en la transformación de la materia orgánica hayan puesto a disposición de las microalgas compuestos químicos nitrogenados.

La población bacteriana no afectó el cultivo de microalgas en ninguno de los niveles escalados, sin embargo se recomienda establecer un control sanitario en estos ya que las bacterias pueden crecer asociadas a los mismos.

En vista del paralelismo encontrado entre el crecimiento de las microalgas y las bacterias se puede asumir que están relacionadas. Estos hallazgos pueden servir de base para futuras investigaciones enfocadas principalmente a establecer la relación microalga bacteria y sus productos de exudación.

## VII. CONCLUSIONES

1. En los tres primeros niveles de cultivo se encontró una relación directa microalgas-bacterias totales, lo que sugiere que existe una interacción y dependencia en ambas poblaciones.
2. El conteo directo de bacterias fue dos órdenes de magnitud mayor que el conteo de bacterias heterótrofas, teniendo un comportamiento similar en tres de los niveles escalados en cuanto a su tendencia a crecer a medida que transcurría el tiempo de cultivo únicamente en el caso de columna disminuyeron en los últimos días.
3. Las bacterias tipo *Vibrio* no se encontraron en los primeros tres niveles escalados sólo se encontraron en bajas concentraciones en columna.
4. Se encontró una sucesión de especies de bacterias nitrificantes *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en el agua de cultivo de *Chaetoceros muelleri*.
5. El agua de mar aporta bacterias al sistema, las cuales pueden disminuir por el tratamiento del agua utilizada en los diferentes niveles de cultivo de la microalga.
6. En ninguno de los niveles de cultivo de la microalga hubo limitación de nitratos por el aporte del medio f/2.
7. La concentración de nitratos disminuye con el tiempo de cultivo por el consumo que de este hacen los microorganismos principalmente las microalgas.
8. El cultivo de microalgas no se colapso con la presencia de bacterias, sin embargo es necesario establecer un control sanitario en estos ya que las bacterias pueden crecer asociadas a los mismos.

## LITERATURA CITADA

- Albert, M. y I. Valiela. 1995. Organic aggregates in detrital food webs: incorporation by bay scallop *Argopecten irradians*. Marine Ecology Progress Series 121: 117-124.
- Albert, M. y I. Valiela. 1996. Utilization of microbial organic aggregates by bay scallops *Argopecten irradians* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 195: 71- 89.
- Austin, B. y D.A. Austin. 1993. Bacterial fish pathogens-disease in faro and wild fish. 2<sup>nd</sup> Ed. Ellis Horwood, Ltd. New York. 384 pp.
- Azam, F., T. Fenchel., J.G. Field., J.S. Gray., L.A. Meyer-Rei, y F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series. 10: 257-263.
- Barrera-Hernández, S. 1993. Producción masiva de *Chaetoceros muelleri* (Lemmerman), bajo distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo derivados de fertilizantes agrícolas con adición de bióxido de carbono. Universidad Autónoma de Baja California. I.I.O. Tesis de licenciatura, Ensenada BC; México. 34 pp.
- Baumann, P. y R.H.W. Schubert. 1991. Group 5 Facultatively anaerobic gram-negative rods. En: N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 121-274 p.
- Berland B.R., D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1970. Study of bacteria associated with marine algae in culture. III. Organic substrates supporting growth. Marine Biology. 5: 68-76.
- Brown, M. R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional Aspects of microalgae used in Mariculture: A literature review. CSIRO Marine Laboratories Rep. 205:1- 43 pp.
- Brown, M.R., S. M. Barret., J.K Volkman., S.P. Nearhos, J.A Nell y G.L Allan. 1996. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. Aquaculture 143: 341-360
- Brown, M. R., S.W. Jeffrey., J. K. Volkman., y G. A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331
- Brown, M. R. 2002. Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 281-292 pp.
- Button, D.K., F. Schut., P. Quang., R. Martin y B.R. Robertson. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. Applied and Environmental Microbiology. 59:881-891.
- Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González., F. Ascencio., E. Cortes-Jacinto., y C.J. Cáceres-Martínez. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. Aquaculture. 260 (1-4): 145-150.
- Carpenter, J.E. y D.G, Capone. 1983. Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, Inc. New York. 900 pp.

- Conn, E.E., P.K. Stumpf., G. Bruening y R.H. Doi. 2000. Bioquímica Fundamental. 5ta edición. Ed. Limusa, México, D.F., 736 pp.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in hatchery and nursery of bivalve mollusk: an international survey. *Journal of Shellfish Research* 11:467-476.
- De-Bashan, L. E., y Y. Bashan. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5 (2): 85-90.
- Dortch, Q., P.A. Thompson y P.J. Harrison. 1991. Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*: effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. *Marine Biology*. 110: 183-193
- Elser, J.J., L.B. Stabler y R.P. Hassett. 1995. Nutrient limitation of bacterial growth and rates of bacterivory in lakes and oceans; a comparative study. *Aquat. Microb. Ecol.* 9: 105-110.
- Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas y M. Viega. 1984. Growth of marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch culture with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*. 42:207-215.
- Fogg, G.E. 1975. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Second edition. The University of Wisconsin Press. Madison. 175 pp
- Fogg, G. E. y B. Thake. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Third edition. The University of Wisconsin Press. Madison. 269 pp.
- Felip, M., M.L. Pace y J.J. Cole. 1996. Regulation of planktonic bacterial growth rates: The effects of temperature and resources. *Microbial Ecology*. 31:15-28.
- Fujii, S., N. Nishimoto., A. Notota y J.A. Hellebust. 1995. Growth and Osmoregulation of *Chaetoceros muelleri* in Relation to Salinity. *Plant and Cell Physiology*. 36(5):759-754.
- Fukami, K., T. Nishijima y Y. Ishida. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microscopic algae. *Hydrobiol.* 358: 185-191.
- Gieseke, A., U Purkhold., M. Wagner., R. Amann y A. Schramm. 2001. Community Structure and Activity Dynamics of Nitrifying Bacteria in Phosphate-Removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1351-1362.
- Goldman, J. C., D.A. Caron y M.R. Dennette. 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography*. 32: 1239-1252.
- Gómez-Gil B., A. Roque y A.L. Guerra Flores. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto de uso de antimicrobianos. En Paez Osuna F. (ed.). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. UNAM. Mazatlán, Sinaloa México. 315-346 p.
- Gómez-Gil B., A. Roque y G. Velasco-Blanco. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. 211:43-48
- Gómez, F., K. Furuya y S. Takeda. 2005. Distribution of the cyanobacterium *Richelia intracellularis* as an epiphyte of the diatom *Chaetoceros compressus* in the western Pacific Ocean. *Journal of Plankton Research*. 27(4):323-330.

- González-Del Valle M.A. 1997. Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. Universidad de Sevilla, Facultad de Biología, Tesis Doctoral; Sevilla España. 159 pp.
- González-Galindo, A. 2003. Sobre la interpretación de bioensayos con bacterias marinas heterotróficas: el posible efecto de los fagos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología. Departamento de Ecología. Ensenada Baja California, México. 78 pp.
- González-Muñoz, J.A. 2006. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología. Departamento de Acuicultura, Ensenada Baja California, México. 63 pp.
- Graham, L.E y L.W. Wilcox. 2000. Algae. Prentice Hall, Upper Saddle River. NJ, 640 p.
- Guerrero, M.G. y J.M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann Rev Plant Physiology*. 32:169-204.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Stein, J.R. (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, 289-313.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: M.L. Smith y M.H. Chanley (Ed.). *Culture of marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York. 338 pp.
- Haines, K.C y R.L. Guillard. 1974. Growth of vitamin B<sub>12</sub> requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B<sub>12</sub> producing marine bacteria. *Journal of Phycology*. 10: 245-252.
- Hoppe, H.G. 1976. Determination and properties of actively metabolizing heterotrophic bacteria in the sea, investigated by means of micro-autoradiography. *Mar. Biol.* 36: 291-302.
- Intriago, P., y D.A. Jones. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113: 115-127.
- Kirchman, D.L. 1990. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the subarctic Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 62: 47-54.
- Kogure, K., U. Simidu y N. Taga. 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve on the growth of marine bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 36: 201-215.
- Kogure, K., U. Simidu y N. Taga. 1982. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 56: 197-204.
- Jensen, P.R., C.A. Kauffman y W. Fenical. 1996. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Marine Biology*. 126: 1-7
- Joint, I., P. Henriksen, G.A. Fonnes., D. Bourne., T.F. Thingstad y B. Riemann. 2002. Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquat. Microb. Ecol.* 29: 145-159.
- Lavilla Pitogo, C.R., F.M. Leño y M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*. 164:337-349.

- Liang, Y., F. Li-xia., Y. Cui-Ling y C. Chun-Hui. 2006. Effects of High Temperature Stress on the Chlorophyll Fluorescence Kinetics of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros gracilis*. Periodical of Ocean University of China. 36(3): 427-433.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimps. En: J.P. McVey (ed.) CRC Handbook of Mariculture, 2da. Edition, Boca Ratón. 393-486 pp.
- Lightner, D.V. y R.M. Redman. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquaculture. 164:201-220.
- Lizárraga-Partida, M.L., L. Montoya-Rodríguez., V. Gendrop-Funes. 1997. The use of bacterial counts in two mexican shrimp hatcheries. Ciencias Marinas. 23(1):129-140
- López-Elías, J.A. 2002. Evaluación cuantitativa y cualitativa de los sistemas de producción de microalgas de seis laboratorios comerciales del Noroeste de México. Tesis Doctoral. Posgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima, Tecomán, México. 117 pp.
- López-Elías, J.A., D. Voltolina., F. Enríquez-Ocaña y G. Gallegos-Simental. 2005b. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican comercial hatchery. Aquacultural Engineering. 33: 181-191.
- López-Elías, J.A. D. Voltolina., I. S. Ávila-Mercado., M. Nieves, y B. Cordero-Esquivel. 2005a. Growth, composition and biomass yields of *Chaetoceros muelleri* mass cultures with different routines and tank depths. Rev. Invest. Mar. 26(1): 67-72.
- Margalef R. y F. Vives. 1967. La vida suspendida en las aguas. Ecología marina. Fundacion La Salle de Ciencias Naturales, Caracas, Venezuela. 562 p.
- Martínez-Córdova L.R. 1999. Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y Prácticas. AGT Editores, S.A. México. 283 pp.
- Medina-Reyna, C. E. y B. Cordero-Esquivel. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial. Universidad del Mar. Ciencia y Mar. 5(2): 19-25.
- Meyer-Reil, L.A. 1978. Autoradiography and epifluorescence microscopy combined for the determination of number and spectrum of actively metabolizing bacterial in natural waters. Applied and Environmental Microbiology. 36): 506-512.
- Milke, L.M; V.M, Bricelj; C.C, Parrish. 2004. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids fatty acids. Aquaculture. 234(1-4):293-317.
- Moller, J.L. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weigth composition, and bacterial assimilation. Marine Ecology Progress Series. 11:39-48.
- Munro, P.D., A. Barbour., T.H. Birkbeck. 1995. Comparison of the growth and survival and larval turbot in the absence of cultivable bacteria with dose in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. Applied and Environmental Microbiology. 61: 4425-4428.
- Olsen, A.I., Y. Olsen., Y. Attramadal, K. Christie., T.H. Birbeck., J. Skjermo y O. Vadstein. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. Aquaculture 190: 11-25.
- Okauchi, M. 1991. The status of phytoplankton production as food organisms in Japan. In W. Fulks y K.L. Main (eds), Proceedings of a U.S. Asia Workshop. Rotifer and Microalgae Culture Systems. The Oceanic Institute. Honolulu: 247-256.

- Pacheco-Ávila, J., R. Pat-Canul y A. Cabrera-Sansores. 2002. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería* 6(3): 73-81.
- Pacheco-Vega, J. M. 2003. Evaluación del valor nutrimental de la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un medio no convencional para alimentar a larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México. 85 pp.
- Pillay, T.V.R. 1990. *Aquaculture principles and practices*. Fishing News Books. Great Britain. 575 pp.
- Piña, P., M. Nieves., L. Ramos-Brito., C.O. Chavira-Ortega y D. Voltolina. 2005. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. 249:431-437.
- Piña, P., D. Voltolina, M. Nieves y M. Robles. 2006. Survival, development and growth of the Pacific whit shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquaculture*. 253:523-530.
- Porter, K.G. y Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology Oceanography*. 25(5), 943-948.
- Prieur, D., G. Mevel., J.L. Nicolas., A. Plusquellec., M. Vigneulle. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biological Annual Review* 28: 277-352.
- Regunathan, C. y S.G. Wesley. 2004. Control de *Vibrio* spp. in Shrimp Hatcheries Using the Green Algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Science*. 17: 147-158.
- Rico-Mora R. 1995. Control biológico de la contaminación por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum*. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada B. C. México. 101 pp.
- Riquelme, C.E., K. Fukami y Y. Ishida. 1989. Growth response of bacteria to extracellular products of bloom algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 349-355.
- Riquelme, C. E. y E. Avendaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76: 725-736 p.
- Ritar, A.J., G.A. Dunstan., M.M. Nelson., M.R. Brown., P.D. Nichols., C.W. Thomas., E.G. Smith., B.J. Crear y S. Kolkovski. 2004. Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture* 239 (1-4): 351-373.
- Sánchez-Saavedra, M.P. 1989. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada B. C. México. 120 pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacultural Engineering*. 35:161-165.
- Santiago-Serrano, M.E. 1996. Calidad bacteriológica en un sistema de cultivo durante los estadios larvario y postlarvario del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

- Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada BC; México. 70 pp.
- Servais, P. y G. Billen. 1993. Dynamic of heterotrophic bacteria in aquatic system: the HSB model. En: Guerrero G y C Pedrós-Alió (eds) Trends in microbial ecology: Spanish Society for Microbiology Publisher, Barcelona, Spain. 397-400 p.
- Simental-Oceguera, A.L. 2001. Ecología microbiana en cultivos estáticos de las microalgas: *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada BC; México. 53 pp.
- Simidu y Tsukamoto. 1985. Habitat Segregation and Biochemical Activities of Marine Members of the Family *Vibrionaceae*. Applied and Environmental Microbiology, 50(4):781-790 p.
- Sindermann, J.C. 1990. Principal disease of marine fish and shellfish. Academic press Inc. E.U.A. 516 p.
- Soto, K., G. Collantes., M. Zahr y J. Kuznar. 2005. Simultaneous enumeration of *Phaeodactylum tricornutum* (MLB292) and bacteria growing in mixed communities. Invest. Mar., Valparaíso, 33(2): 143-149 p.
- Suminto y K. Hirayama. 1996. Effects of Bacterial Coexistence on the growth of a Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*. Fisheries Science. 62(1): 40-43.
- Suminto y K. Hirayama. 1997. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. Hydrobiologia. 358: 223-230 p.
- Temperatura óptima de cultivo de *Chaetoceros muelleri*. <http://www.marine.csiro.au/algaed/default.htm> Mayo de 2007.
- Thompson, P.A y M. Guo. 1992. Effects of variation in temperatura. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. Journal of Phycology. 28:481-488.
- Thompson, P.A., E.L. Levasseur y P.J. Harrison. 1989. Light-limited growth on ammonium vs nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? Limnology and oceanography. 34(6): 1014-1024
- Trecece, G. y J. Fox. 1993. Design Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery (With Emphasis on *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*). Texas A & M University Sea Grant College. Program. Bryan. Texas, E.U.A. 93-505.
- U. S. Geological Survey. 1977. Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples. En: P. E. Greenson, Chairman, T. A. Ehlke, G. A. Irwin, B.W. Lium y K. V. Slack (eds.). Techniques of water-resources Investigations of the United States Geological Survey. U. S. Government printing office, Washintong D.C. 332 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 par el cultivo de *Isochrysis* aff *galbana* (clone T-Iso). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C. México. 51 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E., V. Gendrop-Funes, R. Pérez Castañeda, J. G. Wilburn-González. 1999a. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. Ciencias marinas. 25(3): 423-437.

- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cebrero. 1999b. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture Engineering*. 20:135-147.
- Valenzuela-Espinoza, E., F. Lafarga-De la Cruz, R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cebrero. 2005. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. Cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias marinas*. 31(1): 79-89.
- Vanderzant C., R. Nickelson y P.W. Judkins. 1971. Microbial flora of pond-reared Brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Applied Microbiology*. 21(5): 916-921.
- Wang, J.K. 1999. Antibacterially active extracts from the marine algae *Chaetoceros* and methods of use. *Aquaculture Technology Incorporated*. U S Patent.
- Wheaton, F.W. 1977. *Acuicultura: diseño y construcción de sistemas*. AGT editor. México. 704 pp.
- Wolter, K. 1982. Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton populations. *Marine Ecology Progress Series* 7: 287-295.
- Yasuda, K. y T. Kitao. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns *Penaeus japonicus*. *Bate. Aquaculture*. 19: 229-234.
- Zimmermann, R., R. Iturriaga y J. Becker-Birck. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology*. 36(6): 926-935.
- Zweifel, U.L., y Å. Hagström. 1995. Total Counts of Marine Bacteria Include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts). *Applied and Environmental Microbiology*. 61(6): 2180-2185.

## ANEXOS

## Anexo A Variables físico-químicas

Tabla XI. Variables físico-químicas en los cultivos de *Chaetoceros muelleri* cultivada por duplicado en: **A** (Fernbach, 2 L), **B** (Garrafón, 18 L) y **C** (Columna, 400 L) con medio f/2.

<b>A</b>				
Fernbach	1 / 2		1	2
Día	T °C	S‰	pH	pH
0	23 / 23.5	32	8	8
1	23 / 23.5	32	8.8/8	8.6/7.9
2	24 / 24	32	9.5/7.8	9.4/7.8
3	24 / 24	32	9.1/7.3	9.3/7.5
4	24.5 / 25	32	8.4/7.3	8.5/7.3
5	24 / 24.5	32	8.2/6.9	8.2/6.9

<b>B</b>				
Garrafón	1 / 2		1	2
Día	T °C	S‰	pH	pH
0	23.5 / 23.5	32	8	8
1	23 / 23.5	32	8.9/7.4	8.9/7.6
2	23 / 23	32	9.3/7.3	9.3/7.1
3	23 / 23	32	9.0/6.9	8.9/7
4	23 / 23	32	8.9/7.3	8.9/7.3
5	23 / 23	32	8.6/7.8	8.7/8

<b>C</b>				
Columna	1 / 2		1	2
Día	T °C	S‰	pH	pH
0	21.5 / 21.5	32	7.8	7.8
1	21 / 21	32	8.2/7.5	8.2/7.6
2	19.5 / 19.5	32	8.4/7.8	8.6/7.9
3	19.5 / 19.5	32	8.5/8	8.6/8.2
4	18.5 / 18.5	32	8.5/7.7	8.6/7.8
5	18.5 / 18.5	32	8.3	8.4
6	18.5 / 18.5	32	8.4	8.5

### Anexo B Variables físico-químicas de los controles sin microalgas

Tabla XII. Variables físico-químicas en los controles sin microalgas A (Fernbach, 2 L), B (Garrafón, 18 L) con medio f/2.

A				B			
Fernbach				Garrafón			
Día	T °C	S‰	pH	Día	T °C	S‰	pH
0	23	32	8	0	23	32	8
1	23	32	8	1	23	32	8
2	24	32	8	2	22.8	32	7.9
3	23.5	32	8	3	22.5	32	7.8
4	25	32	8	4	23	32	8
5	24	32	7.9	5	22.8	32	8