

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Caracterización de la biopelícula de *Navicula incerta* sobre
placas de poli- β -hidroxibutirato (PHB) para su uso potencial
en el cultivo de abulón**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Anaid Saavedra Flores

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Anaid Saavedra Flores

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Codirector del Comité

Dra. Ma. Teresa Gutiérrez Wing
Codirector del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez
Miembro del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Julio, 2015

Resumen de la tesis de Anaid Saavedra Flores, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Caracterización de la biopelícula de *Navicula incerta* sobre placas de poli- β -hidroxibutirato (PHB) para su uso potencial en el cultivo de abulón

Resumen elaborado por:

Anaid Saavedra Flores

En México, las biopelículas formadas por diatomeas bentónicas como *Navicula incerta* son la principal fuente de alimento para postlarvas y juveniles tempranos de abulón en condiciones de cultivo. Un componente adicional en la alimentación del abulón lo constituyen las bacterias debido a su interacción con las diatomeas en la formación de biopelículas. No obstante, es común observar biopelículas con bajas concentraciones de diatomeas que no satisfacen las cantidades que requieren los abulones en etapas tempranas. Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de métodos alternativos que permitan mantener cantidades adecuadas de diatomeas en las biopelículas para su uso efectivo como una fuente de alimento para los organismos en cultivo. En el presente estudio, se caracterizó la biopelícula de *N. incerta* sobre placas de poli- β -hidroxibutirato (PHB) de colores verde y blanco y teraftalato de polietileno (PET). Se evaluó la dinámica de crecimiento de *N. incerta*, la composición proximal de la biopelícula y la concentración de bacterias heterótrofas y tipo *Vibrio*. El análisis de la densidad celular de *N. incerta* no mostró diferencias significativas por efecto del tipo de plástico, lo que sugirió que la dinámica de crecimiento de la diatomea no fue afectada por la presencia del PHB. En contraste, la concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos fue significativamente mayor en la biopelícula formada sobre poli- β -hidroxibutirato de ambos colores. En relación a las bacterias heterótrofas, el nivel de crecimiento en las placas de PHB fue ~10,000 veces mayor respecto a las bacterias presentes en el PET. El desarrollo de bacterias tipo *Vibrio*, presentó la misma tendencia. Se utilizó citometría de flujo para diferenciar bacterias de diatomeas mediante el uso de la complejidad relativa (dispersión lateral) y la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos empleando excitación con el láser azul y fluorescencia en el rojo. Además, se identificaron bacterias cultivables mediante la secuenciación de la región hipervariable V₇-V₉ del gen 16S rDNA. La caracterización molecular de bacterias cultivables permitió identificar el 83% de las bacterias aisladas hasta nivel de especie. Miembros del género *Pseudomonas* y *Alteromonas* estuvieron presentes en todos los tipos de plástico, mientras que *Sulfitobacter marinus* creció solamente en el PHB blanco y *Hahella chejuensis* en el PET. Se concluyó que la biopelícula de *N. incerta* formada sobre ambos PHB presentó un mayor contenido orgánico y crecimiento bacteriano, por lo que podría ser utilizado en el cultivo de abulón.

Palabras clave: **abulón, bacterias, biopelículas, *Navicula incerta*, poli- β -hidroxibutirato (PHB).**

Abstract of the thesis presented by Anaid Saavedra Flores as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Biofilm characterization of *Navicula incerta* on poly- β -hydroxybutyrate (PHB) plates for potential use in the abalone culture

Abstract by:

Anaid Saavedra Flores

In Mexico, the biofilms formed by benthic diatoms such as *Navicula incerta* are the main food source for abalone postlarvae and early juveniles in commercial conditions. Bacteria are an additional component in the abalone feed due to its interaction with diatoms in biofilm formation. However, it is common to find biofilm with low concentrations of diatoms that do not satisfy quantities requiring abalone in early stages. Therefore, it is necessary to search for alternative methods that allow maintain adequate amounts diatoms for its effective use as a food source under culture conditions. In this study, *N. incerta* was grown on green and white plates of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and on polyethylene terephthalate (PET) and the biofilms were characterized. The growth dynamics of *N. incerta*, the proximate composition of the biofilm and concentration of heterotrophic bacteria and *Vibrio* were evaluated. The cell density analysis of *N. incerta* showed no significant differences due to the type of plastic, which suggested that the growth dynamics of the diatom were not affected by the presence of PHB. In contrast, the concentration of proteins, carbohydrates, lipids and pigments was significantly higher in the biofilm formed on poly- β -hydroxybutyrate in both colors. Growth of heterotrophic bacteria, on PHB plates was $\sim 10,000$ higher than the bacteria present in PET. The *Vibrio* growth showed the same trend. Flow cytometry was used to differentiate bacteria and diatoms using the relative complexity (side scatter) and the autofluorescence of the photosynthetic pigments using excitation with blue laser and red fluorescence. Also, cultivable bacteria were identified using the hypervariable region V₇-V₉ from 16S rDNA gene. The molecular characterization of culturable bacteria allowed to identify 83% of the bacteria isolated up to species level. Members of the genus *Pseudomonas* and *Alteromonas* were present in all types of plastic, while *Sulfitobacter marinus* grew only in the white PHB and *Hahella chejuensis* in the PET. It was concluded that the biofilm of *N. incerta* formed on both PHB presented a higher organic content and bacterial growth, so it could be used in the abalone culture.

Keywords: **abalone, bacteria, biofilms, *Navicula incerta*, poly- β -hydroxybutyrate (PHB)**

Dedicatoria

A mi madre excepcional, llena de fuerza

A mi padre, por su apoyo

Agradecimientos

A mis directores de tesis, Dr. Miguel A. del Río Portilla y Dra. Ma. Teresa Gutiérrez Wing.

Al Dr. Miguel por su tiempo, paciencia, entusiasmo y por compartir su conocimiento conmigo. Gracias por todo.

A mis sinodales, Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, Dra. Carmen G. Paniagua Chávez y Dr. Carlos A. Brizuela Rodríguez. Gracias por el tiempo dedicado, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo.

A la Dra. Pilar y a su grupo de laboratorio por la ayuda para realizar los análisis de la composición proximal. Gracias Dra., por toda su ayuda en este trabajo, por su apoyo y disposición.

A la Dra. Carmen por proporcionarme el equipo para el análisis de citometría de flujo, por su disposición y entusiasmo.

A la compañía Metabolix GmbH por proporcionar las placas de PHB y a la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Buzos y Pescadores por donar las placas de PET.

A mis compañeros de maestría.

A Edgar por todo su apoyo en el transcurso de esta experiencia.

A mis hermas y familia por apoyarme a la distancia y sobre todo por creer en mí.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis.

Al CONACYT por otorgarme los recursos económicos para realizar mis estudios de maestría.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
1. Introducción	
1.1 Justificación.....	11
1.2 Hipótesis.....	12
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 General.....	12
1.3.2 Particulares.....	12
2. Materiales y métodos	
2.1 Mantenimiento de la cepa y producción de biomasa.....	13
2.2 Dinámica de crecimiento de <i>N. incerta</i> cultivada en matraz Ferbach	13
2.3 Cultivo de <i>N. incerta</i> sobre placas de PET y PHB.....	14
2.3.1 Descripción de los polímeros PET y PHB.....	14
2.3.2 Diseño experimental.....	14
2.4 Biopelícula de <i>N. incerta</i> sobre placas de PET y PHB.....	15
2.4.1 Evaluación de la biomasa de <i>N. incerta</i> sobre los polímeros.....	15
2.5 Parámetros poblacionales.....	15
2.6 Determinación de la composición proximal de la biopelícula.....	16
2.6.1 Determinación de Proteínas.....	17
2.6.2 Determinación de Carbohidratos.....	18
2.6.3 Determinación de Lípidos.....	18

Tabla de contenido (continuación)

2.6.4	Determinación de Pigmento.....	18
2.7	Pérdida de peso de los polímeros.....	19
2.8	Cultivo bacteriano.....	19
2.8.1	Cultivo de bacterias en medio acuoso.....	19
2.8.2	Cultivo de bacterias heterotróficas.....	20
2.8.3	Cultivo en medio TCBS.....	20
2.8.4	Conteo de bacterias.....	21
2.9	Análisis de la biopelícula mediante citometría de flujo.....	21
2.10	Caracterización molecular de la biopelícula.....	22
2.10.1	Extracción de DNA bacteriano.....	22
2.10.2	Secuenciación y análisis de DNA bacteriano.....	23
2.10.3	Amplificación del gen 16S rDNA.....	23
2.11	Análisis estadístico.....	24
3.	Resultados	
3.1	Dinámica de crecimiento de <i>N. incerta</i> en matraz Fernbach.....	26
3.1.1	Composición proximal.....	27
3.1.1.1	Proteínas, Carbohidratos y Lípidos.....	28
3.1.1.2	Pigmentos.....	28
3.1.2	Crecimiento de bacterias heterotróficas.....	29
3.1.3	Análisis de citometría de flujo de <i>N. incerta</i>	29
3.2	Dinámica de crecimiento de <i>N. incerta</i> sobre los polímeros.....	32
3.2.1	Composición proximal de la biopelícula.....	34
3.2.1.1	Proteínas, Carbohidratos y Lípidos.....	35
3.2.1.2	Pigmentos.....	37
3.2.2	Pérdida de peso de los polímeros.....	39
3.2.3	Crecimiento de bacterias heterotróficas.....	40
3.2.3.1	Crecimiento de bacterias tipo <i>Vibrio</i>	41
3.2.4	Análisis de la biopelícula mediante citometría de flujo.....	42
3.2.5	Caracterización molecular bacteriana de la biopelícula de <i>N. incerta</i>	48

Tabla de contenido (continuación)

4. Discusión

4.1 Dinámica de crecimiento de <i>N. incerta</i> cultivada en matraz Ferbach y sobre los polímeros.....	54
4.1.1 Composición proximal.....	57
4.1.2 Proteínas, Carbohidratos y Lípidos.....	58
4.1.3 Pigmentos.....	64
4.2 Pérdida de peso de los polímeros.....	65
4.3 Crecimiento de bacterias heterotróficas.....	67
4.3.2 Crecimiento de bacterias tipo <i>Vibrio</i>	69
4.4 Análisis de la biopelícula de <i>N. incerta</i> mediante citometría de flujo.	70
5. Conclusiones.....	74
6. Recomendaciones.....	76
Referencias bibliográficas.....	77
Anexos.....	92

Lista de figuras

Figura	Página	
1	A. Ruta de biosíntesis del poli- β -hidroxibutirato (PHB). El PHB es un polímero lineal de 3-hidroxibutirato sintetizado a partir de la condensación de dos moléculas acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA con la acción de un β -cetoacil-CoA tiolasa (PhbA). En procariontes este intermediario se reduce posteriormente con NADPH a (<i>R</i>)-3-hidroxibutiril-CoA por una acetoacetil-CoA deshidrogenasa (PhbB). El (<i>R</i>)-3-hidroxibutiril-CoA puede entonces ser polimerizado para formar PHB por la enzima PHB sintasa (PhbC). B. Estructura química del poli- β -hidroxibutirato (PHB). (Modificado de Lee, 1996; p. 3 y Reusch, 2013).....	7
2	Densidad celular (x1000 células cm ⁻²) y curva de crecimiento (regresión logarítmica) de <i>N. incerta</i> cultivada a nivel matraz. Las barras indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	27
3	Bacterias heterotróficas (log UFC cm ⁻²) del cultivo de <i>N. incerta</i> a nivel matraz. Las barras indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	29
4	Análisis de citometría de flujo de <i>N. incerta</i> cultivada en matraz. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda >640nm. Región morada agrupa a <i>N. incerta</i> y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes (n= 3).....	31
5	Densidad celular (x1000 células cm ⁻²) y curva de crecimiento (regresión logarítmica) de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET (⊕), PHBv (▲) y PHBb (●). Las barras indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	34
6	Peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada sobre placas de PET (□), PHBv (■) y PHBb (■) al sexto día de cultivo. Datos promedio (n=3) expresados en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las barras indican \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas para cada grupo (ANOVA de una vía, $P < 0.01$).....	35

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
7	Composición proximal (Proteínas, Carbohidratos y Lípidos) de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET (□), PHBv (■) y PHBb (■) al sexto día de cultivo, expresado en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las barras denotan promedio (n=3) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas por grupo (ANOVA de una vía, $P < 0.001$).....	36
8	Clorofila α , c y Carotenoides de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET (□), PHBv (■) y PHBb (■) al sexto día de cultivo. Las barras denotan promedio (n=3) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas para cada grupo de pigmento (ANOVA de una vía, $P < 0.001$).....	38
9	Porcentaje de peso perdido observado en placas de PET (⊕), PHBv (▲) y PHBb (●) expuestas a la biopelícula de <i>N. incerta</i> . Las barras indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	39
10	Bacterias heterotróficas (log UFC cm^{-2}) de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET (⊕), PHBv (▲) y PHBb (●). Las barras denotan promedio (n=3) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas (ANCOVA, $P < 0.05$).....	40
11	Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda $>640\text{nm}$. Región morada agrupa a <i>N. incerta</i> y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes (n= 3).....	44

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
12 Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PHBv. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda >640nm. Región morada agrupa a <i>N. incerta</i> y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes (n= 3).....	45
13 Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PHBb. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda >640nm. Región morada agrupa a <i>N. incerta</i> y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes (n= 3).....	46
14 Clasificación de las bacterias cultivables aisladas de la biopelícula de <i>N. incerta</i> en el inóculo (Nav 0), en matraz (Nav) y en las placas PET, PHBv y PHBb. La caracterización se basó en la secuenciación de la región variable V ₇ -V ₉ del gen 16S rDNA. * Bacteria presente en las dos UFC aisladas.....	53

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Diluciones realizadas a las muestras analizadas por citometría de flujo.....	21
2 Densidad celular (DC) (células cm ⁻²), tasa específica de crecimiento (μ divisiones día ⁻¹), tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$ divisiones día ⁻¹) y tiempo de generación (Tg días) de <i>N. incerta</i> cultivada a nivel matraz. Valores entre paréntesis indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	27
3 Valores promedio (n=3) de la composición proximal de <i>N. incerta</i> cultivada a nivel matraz, expresados en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las abreviaturas PST, PSO y PSI corresponden a peso seco total, orgánico e inorgánico, respectivamente. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.....	28
4 Valores promedio (n=3) de Clorofila a, c y Carotenos ($\mu\text{g Cl cm}^{-2}$) de <i>N. incerta</i> cultivada a nivel matraz. También razón Carotenos:Clorofila a y Clorofila c:Clorofila a. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.....	28
5 Número de células (cm ⁻²) y porcentaje promedio (n=3) de <i>N. incerta</i> y bacterias registradas por citometría flujo. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.....	30
6 Densidad celular (DC) (células cm ⁻²), tasa específica de crecimiento (μ divisiones día ⁻¹), tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$ divisiones día ⁻¹) y tiempo de generación (Tg días) de <i>N. incerta</i> cultivada sobre los polímeros PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican promedio (n=3) \pm error estándar.....	33
7 Regresión logarítmica entre la densidad celular (DC= bx^a) y los días de cultivo de <i>N. incerta</i> cultivada en placas de PET, PHBv y PHBb	34
8 Razón entre los pigmentos Carotenos:Clorofila a y Clorofila c:Clorofila a. Valores promedio (n=3) \pm error estándar.....	38

Lista de tablas (continuación)

Tabla	Página
9 Valores promedio (n=3) del crecimiento de bacterias tipo <i>Vibrio</i> (UFC cm ⁻²) en la biopelícula de <i>N. incerta</i> formada en placas de PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.....	41
10 Número de células (cm ⁻²) y porcentaje promedio (n=3) de <i>N. incerta</i> y bacterias registradas por citometría flujo en placas de PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.....	47
11 Bacterias cultivables aisladas de la biopelícula de <i>N. incerta</i> en el inóculo (Nav0), en matraz (Nav) y en las placas PET, PHBv y PHBb. Las bacterias fueron identificadas mediante la amplificación de la región variable V ₇ -V ₉ del gen 16S rDNA.....	51

1 Introducción

El abulón (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia) es una especie importante y valiosa en la acuicultura de todo el mundo debido a su gran demanda como producto (Watson *et al.*, 2004). En México, su cultivo es una actividad que se ha intensificado como resultado de la disminución de las capturas de las diferentes especies que habitan la zona noroccidental del país (Gordon y Cook, 2001; Searcy-Bernal *et al.*, 1992). Por lo tanto, el cultivo de abulón surge de la necesidad de garantizar la permanencia de la especie y sustentar la actividad, así como recuperar las poblaciones naturales. Es así, que las técnicas de cultivo se han desarrollado adecuando la tecnología proveniente de otros países tales como Japón y Estados Unidos de América a las condiciones particulares del país.

En condiciones de cultivo se han obtenido abulones desde la etapa larvaria hasta organismos adultos con éxito (Hahn, 1989). Se reconocen tres etapas principales dentro del cultivo: (1) cría, (2) preengorda y (3) engorda. Cada una de estas etapas presenta una duración y alimentación específica. En la cría, se obtienen postlarvas y juveniles tempranos de abulón y, por ejemplo, dura entre tres y seis meses en el abulón rojo (Gorrostieta-Hurtado, 2005). Después de la fecundación de los gametos eclosiona una larva. El desarrollo larval se caracteriza por dos etapas: larva trocófora y posteriormente una larva veliger. En ambos estadios, las larvas se alimentan de la reserva vitelina por lo que se denominan lecitotróficas (Daume, 2006). Cuando la larva veliger se ha desarrollado por completo está lista para asentarse y realizar la metamorfosis. En las granjas de cultivo se utilizan películas de diatomeas bentónicas y bacterias o bien ácido- γ -aminobutírico (GABA) para inducir al asentamiento (Searcy-Bernal *et al.*, 1992). Una vez que el organismo se ha asentado y ha realizado la metamorfosis, comienza la etapa de postlarva, etapa de primera alimentación exógena, es decir, se alimenta de la biopelícula formada por diatomeas bentónicas y bacterias (Daume, 2006). La etapa de postlarva finaliza al formarse el primer poro respiratorio, que ocurre entre uno y tres meses, dependiendo de las condiciones ambientales y alimentación (Miranda-Saucedo,

2011). En esta etapa suele conocerse como juvenil temprano, el cual sigue alimentándose de la biopelícula formada por diatomeas y bacterias hasta alcanzar aproximadamente 10 mm de longitud de concha, donde hay un cambio de dieta principalmente de macroalgas, para continuar con la preengorda y engorda. Finalmente el ciclo de producción dura entre 3 y 5 años, en donde se obtiene organismos de talla comercial de entre 80 y 100 mm de longitud de concha.

En algunas granjas de cultivo, las biopelículas de diatomeas bentónicas, son utilizadas para el asentamiento de las larvas y posteriormente como la principal fuente de alimento para postlarvas y juveniles de hasta 10 mm de longitud de concha (Ebert y Houk, 1984; Hahn, 1989; Kawamura *et al.*, 1995 y Daume *et al.*, 2000). Estas biopelículas se desarrollan al inocular estanques circulares (técnica americana) o laminas acanaladas de fibra de vidrio o plástico (técnica japonesa) con cultivos monoalgales de diatomeas bentónicas seleccionadas o con una mezcla de diatomeas silvestres (Muñoz *et al.*, 2012). Otra fuente, para la formación de biopelículas, son las diatomeas provenientes del agua de mar, sin embargo, no aseguran un suministro constante de diatomeas adecuadas para el abulón en cultivo (Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Carbajal-Miranda *et al.*, 2005). Durante el cultivo larval y postlarval se han utilizado diferentes materiales para el desarrollo de la biopelícula tales como fibra de vidrio, acrílico y policloruro de vinilo (PVC, por sus siglas en inglés). En la actualidad, se utilizan placas de policarbonato (Muñoz *et al.*, 2012) y en algunos casos se están remplazando por placas de teraftalato de polietileno (PET, por sus siglas en inglés). El PET posee alta resistencia mecánica, es ligero e inerte, por lo que es un material no asociado a superficies ricas en nutrientes (Webb *et al.*, 2009). Esta característica no favorece el crecimiento de diatomeas una vez que éstas han sido consumidas en su totalidad por los abulones. La cantidad de diatomeas requeridas como alimento para los abulones incrementa a medida que las postlarvas crecen, lo que ocurre rápidamente después de la segunda o tercer semana posterior al asentamiento (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998; Roberst *et al.*, 1999). Con base en lo anterior, se genera un problema clave en esta etapa de producción, ya que es difícil mantener un equilibrio adecuado entre la alimentación de las postlarvas y el suministro de diatomeas (Kawamura *et al.*, 1998a). Si el pastoreo es excesivo, condiciones de hambre pueden

impactar severamente en la supervivencia y el crecimiento de las postlarvas (Searcy-Bernal *et al.*, 2001).

El término de la fase postlarval ocurre alrededor de los 2.5 mm de longitud de concha, dando inicio la etapa de juvenil temprano que continua hasta que los abulones alcanzan entre 8 y 10 mm de longitud de concha (Gorrostieta-Hurtado, 2005). En esta etapa, en particular entre los 5 y 10 mm de longitud de concha, aunque los abulones siguen consumiendo diatomeas, se puede dar un cambio paulatino con alimento balanceado que puede incluir macroalgas (Viana, 2000; Day *et al.*, 2004; Simental-Trinidad *et al.*, 2004). Uno de los principales problemas durante esta etapa, es que el crecimiento y la supervivencia se reducen debido a dos factores; el primero se debe a que la tasa de pastoreo presenta un incremento mayor respecto al pastoreo de las postlarvas (Searcy-Bernal *et al.*, 2001) y el segundo a que no todos los abulones están preparados para raspar el alimento balanceado, por estas razones es necesario asegurar una buena producción de diatomeas (Viana, 2000). Dadas las características de los sistemas de cultivo de flujo abierto, es posible que no permitan el desarrollo constante de las diatomeas debido a que las eliminan junto con las sustancias extracelulares que pudieran alterar el crecimiento de los abulones de manera positiva (Gorrostieta-Hurtado, 2005).

A mediados de la década de los 90s y hasta la actualidad las investigaciones han hecho énfasis en el estudio de los hábitos alimenticios y requerimientos nutricionales del abulón. Estas investigaciones incluyen desde la selección y evaluación de diferentes diatomeas usadas como alimento, y que podrían constituir la mejor dieta, hasta cambios en la composición proximal modificando la técnica de cultivo para mejorar su valor nutricional (Simental-Trinidad, 1999; Gordon *et al.*, 2006; Chávez-Medrano, 2008; Correa-Reyes *et al.*, 2009; Courtois de Viçose *et al.*, 2012a). Asimismo, se han utilizado dietas monoalgales, dietas mixtas, sustitutos de diatomeas ya sea por propágulos de macroalgas o soluciones de agar y macroalgas enriquecidas con diatomeas (Carbajal-Miranda, 2002; Simental-Trinidad *et al.*, 2004; Stott *et al.*, 2004; Araya *et al.*, 2010; Courtois de Viçose *et al.*, 2012b; Muñoz *et al.*, 2012). El objetivo de estos estudios fue

mejorar aspectos tales como la supervivencia y el crecimiento, la tasa de pastoreo, la digestibilidad, el tamaño adecuado de la célula, la preferencia por alguna especie de diatomea, entre otras; todo ello para mejorar la producción de postlarvas y estadios juveniles tempranos (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998; Siqueiros-Beltrones y Voltolina, 2000; Searcy-Bernal *et al.*, 2001; Rojo-Salazar, 2002; Gorrostieta-Hurtado, 2005).

En el cultivo de abulón en México la alimentación de postlarvas y juveniles tempranos se ha basado tradicionalmente en el suministro de diatomeas bentónicas del género *Navicula* spp. (Siqueiros-Beltrones y Voltolina, 2000). En particular, la especie *N. incerta* reúne las características nutricionales para alimentar a postlarvas de *Haliotis rufescens* y *Haliotis fulgens*, y además se encuentra entre las especies silvestres que son capaces de colonizar las placas de cultivo (Searcy-Bernal, 1996; Martínez-Ponce, 1998; Siqueiros-Beltrones, 1999). Por ejemplo, Carbajal-Miranda *et al.* (2005) y Gorrostieta-Hurtado (2005) mencionan que se han obtenido buenos resultados respecto a la tasa de crecimiento ($89.71 \mu\text{m día}^{-1}$) y supervivencia al ser incorporada como dieta en el cultivo de postlarvas de abulón. Lo anterior refleja la importancia que tiene el valor dietético de las diatomeas bentónicas que forman las biopelículas utilizadas como alimento, sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos en cultivo (Courtois de Viçose *et al.*, 2012b). El valor nutrimental de las diatomeas desarrolladas en las biopelículas puede ser afectado por la composición bioquímica del contenido celular, cambios en la densidad celular y salud del cultivo de diatomeas, además de la cantidad y naturaleza de sus productos extracelulares y las bacterias asociadas (Kawamura *et al.*, 1995; Kawamura y Takami, 1995; Kawamura *et al.*, 1998b; Daume *et al.*, 2000; Searcy-Bernal *et al.*, 2001; Daume, 2006). No obstante, son pocos los estudios que analicen en conjunto o engloben cambios en la composición proximal de las diatomeas utilizando diferentes materiales como sustratos para la formación de la biopelícula de diatomeas, y su posterior uso en el cultivo de abulón. En este sentido, los estudios que se han realizado solo han investigado aspectos como procesos de inducción al asentamiento larval y la metamorfosis y algunas características fisicoquímicas del sustrato (Slattery, 1992; Daume *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2007), la capa límite de difusión (Searcy-Bernal, 1996), la colonización de sustratos a

distintas irradiancias (Siqueiros-Beltrones, 1999), la densidad celular y el contenido en la composición de diferentes aminoácidos (Tung y Alfaro, 2011).

En las granjas de abulón, el cultivo de diatomeas y el desarrollo de biopelículas en los estanques y láminas de cultivo no son axénicas, lo que conduce a plantear la relación de las bacterias en la alimentación y crecimiento de estos organismos (Daume, 2006). Al respecto, se ha reportado que las bacterias son residentes en el intestino de los abulones poco desarrollados y realizan actividades metabólicas importantes para el desarrollo del hospedero (Garland *et al.*, 1985). Por ejemplo, Kawamura *et al.* (2001) sugieren que seis días después del asentamiento de *H. discus hannai* (~400 μm de longitud de concha) cuando las postlarvas comienzan a alimentarse, lo hacen de bacterias y sustancias poliméricas extracelulares, provenientes de las diatomeas, debido a que carecen del mecanismo adecuado para la molienda del alimento, como consecuencia, las frústulas de las diatomeas no se rompen durante el proceso de alimentación y pasan vivas a través del intestino. Asimismo, Garland *et al.* (1985) indicaron que las bacterias ingeridas, en su mayoría del género *Vibrio* y *Moraxella*, por las postlarvas de *H. rubra* mejoraron la eficiencia de alimentación, posiblemente, debido al suministro de enzimas polisacaridasas. La presencia de polisacaridasas se ha reportado también en postlarvas de *H. discus hannai* de 17 días de edad y en juveniles de *H. midae* de 35 mm longitud de concha (Erasmus *et al.*, 1997). En *H. discus hannai*, el desarrollo de la rádula y la habilidad para ingerir eficientemente diatomeas bentónicas y macroalgas juveniles, sucede cuando los organismos llegan a una talla de entre 2 y 4 mm de longitud de concha (Kawamura *et al.*, 2001). A partir de esta etapa, aunque los juveniles tempranos pueden aprovechar el contenido celular de las diatomeas, las bacterias constituyen un componente importante en su alimentación (Kawamura, 2001). Por ejemplo, se ha encontrado que en juveniles tardíos de abulón, entre el 70 y 90% de la actividad bacteriana polisacarolítica en el intestino corresponde a enzimas extracelulares de tipo polisacaridasas, que ayudan a hidrolizar polisacáridos complejos provenientes de la ingesta de macroalgas (Faturrahman *et al.*, 2015).

De las bacterias aisladas del intestino de abulón, varias especies pertenecen al género *Vibrio* e incluyen a *V. halioticoli*, *V. gallicus* y *V. supertexta*. Estas bacterias desempeñan un papel importante en la digestión de alginato, laminarian, agarosa y celulosa (Faturrahman *et al.*, 2015). Por ejemplo, *V. halioticoli* fue aislado del intestino de *H. diversicolor aquatilis* y se ha reportado que desempeña un papel importante en la conversión de alginato a ácido acético, lo que pudo haber afectado el crecimiento de los abulones de manera positiva (Sawabe *et al.*, 2003). En otro estudio, donde se roció una solución de agar sobre placas de cultivo de abulón, se encontró de 5 a 10 veces más bacterias (incluyendo a *Vibrio* sp.) respecto al control. Estas bacterias podrían haber proporcionado una fuente de alimento importante para la postlarva temprana, lo que posiblemente contribuyó a lograr mejores tasas de crecimiento una semana después del asentamiento (Stott *et al.*, 2004). Aunque el papel de las bacterias en la alimentación de postlarvas y juveniles de abulón requiere más investigación para determinar su contribución a la nutrición, es un hecho que son consumidas y representan un alimento complementario en el cultivo de abulón (Kawamura *et al.*, 1998; Daume, 2006).

En las granjas de abulón, así como las bacterias han sido asociadas como parte de la dieta, también han sido consideradas como agentes patógenos que causan altas mortalidades de postlarvas y juveniles (Anguiano-Beltrán, 2007). Estos patógenos, principalmente del género *Vibrio*, son introducidos a través del agua y la dieta, causando enfermedades en el hospedero (Huang *et al.*, 2010). Específicamente en el abulón, se han aislado cepas patógenas asociadas a mortalidades masivas y que corresponden a *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (Romalde, 2012). A pesar de lo anterior, en los últimos años la acuicultura ha utilizado suplementos alimenticios como prebióticos (sustancias de crecimiento) o probióticos (bacterias productoras de ácidos benéficos que mejoran el equilibrio microbiano intestinal) para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos en cultivo. Estos suplementos pueden ser provistos mediante la adición de ácidos grasos de cadena corta como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) a la dieta o por medio de la degradación bacteriana del mismo (Defoirdt *et al.*, 2006 y 2007; Sui *et al.*, 2014). En este sentido, autores como Huang *et al.* (2010) mencionan que el uso de suplementos alimenticios puede ser un factor potencialmente importante para el cultivo de abulón mejorando la eficiencia de alimentación.

El poli- β -hidroxibutirato o poli-(*R*)-3-hidroxibutirato (PHB) es un polímero lineal de (*R*)-3-hidroxibutirato (Reusch, 2013) que pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos (PHA's). Son polímeros microbianos completamente biodegradables, biocompatibles y poseen propiedades similares a diversos termoplásticos sintéticos (Reddy *et al.*, 2003). Estos biopolímeros se sintetizan como una fuente de carbono y energía por diversas bacterias bajo condiciones de limitación de nutrientes (nitrógeno, fósforo u oxígeno) y en algunas ocasiones en presencia de una fuente de carbono en exceso (por ejemplo fructosa o glucosa) (Reddy *et al.*, 2003; Khanna y Srivastava, 2005). El PHB está compuesto por cuatro átomos de carbono y es sintetizado a partir del metabolito acetil-CoA en tres pasos simples catalizado por enzimas (Somleva *et al.*, 2013). La biosíntesis microbiana se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, que se reduce posteriormente a hidroxibutiril-CoA. Este último compuesto se utiliza como monómero para polimerizar PHB (Figura 1) (Lee, 1996).

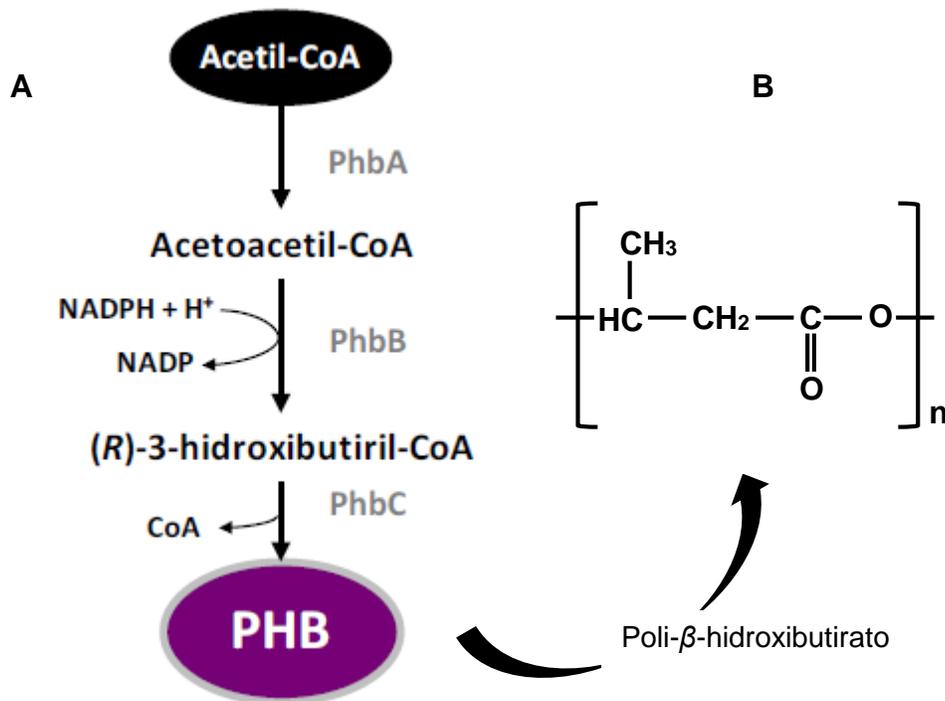


Figura 1. A. Ruta de biosíntesis del poli- β -hidroxibutirato (PHB). El PHB es un polímero lineal de 3-hidroxibutirato sintetizado a partir de la condensación de dos moléculas acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA con la acción de un β -cetoacil-CoA tiasa (PhbA). En procariontes este intermediario se reduce posteriormente con NADPH a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA por una acetoacetil-CoA deshidrogenasa (PhbB). El (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA puede entonces ser polimerizado para formar PHB por la enzima PHB sintasa (PhbC). B. Estructura química del poli- β -hidroxibutirato (PHB). (Modificado de Lee, 1996; pp. 3 y Reusch, 2013).

Actualmente, tanto el PHB como otros PHA's son aplicados para remplazar a los polímeros sintéticos. Se ha demostrado que el PHB es degradado por diferentes microorganismos que producen enzimas extracelulares despolimerasas. Las despolimerasas descomponen el polímero en sus bloques de construcción molecular, llamados hidroxiacidos, que se utilizan como fuente de carbono para el crecimiento de la microbiota (Reddy *et al.*, 2003; Williams y Peoples, 1996). El ciclo del carbono puede cerrarse completamente debido a que su mineralización permite ser reincorporado. La mineralización es la degradación o conversión completa de un compuesto a sus constituyentes minerales (estado inorgánico). Por lo tanto, los productos de la degradación microbiana del PHB (mineralización aeróbica del carbono) como CO₂ puede ser asimilado por otros microorganismos para la síntesis celular y la producción de energía (Ha y Cho, 2002; Woolnough, *et al.*, 2010). Esta característica permite que se degraden en todos los ambientes biológicamente activos, incluyendo suelos, ríos, océanos, compostas y aguas residuales (Ojumu *et al.*, 2004).

El PHB se ha utilizado principalmente como un plástico biodegradable, sin embargo, presenta algunas limitaciones debido a que es un material que posee regular cristalinidad y moderada resistencia mecánica, factores que lo hacen menos flexible y dúctil (Povolo *et al.*, 2000). A pesar de ello, su aplicación se puede ampliar mediante la adición de otros materiales y aditivos que mejoren sus propiedades (Somleva *et al.*, 2013). Una vez procesado, es utilizado en la fabricación de envases y empaques plásticos para uso común, textiles, productos químicos, entre otros. El PHB también se usa como material para aplicaciones biomédicas tales como filamentos de suturas, para encapsular drogas y en la generación de "constructos" (estructuras) para el crecimiento celular debido a que resulta biocompatible (Gogolewski *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1995). Además puede ser utilizado como un suplemento alimenticio y se ha demostrado que tiene valor nutricional o efectos prebióticos en estudios con pollos de engorde, ovejas, cerdos, peces y crustáceos (Somleva *et al.*, 2013).

En la actualidad el PHB se ha utilizado en la acuicultura para prevenir enfermedades bacterianas y para aumentar el rendimiento productivo mejorando el crecimiento y la

supervivencia de los organismos en cultivo (Defoirdt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2010; De Schryver *et al.*, 2010; Dinh *et al.*, 2010). Diferentes estudios muestran que los PHA's pueden ser degradados durante el paso a través del tracto gastrointestinal de algunos peces y crustáceos, lo que mejora su salud gastrointestinal. Por lo tanto, la adición del biopolímero a la alimentación puede dar lugar a efectos de biocontrol o control microbiano. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de PHB protege a organismos acuáticos como *Artemia franciscana* y *Macrobrachium rosenbergii* contra infecciones de *Vibrio* debido al efecto antimicrobiano del β -hidroxibutirato (Defoirdt *et al.*, 2007; Nhan *et al.*, 2010). El PHB es degradado por la microbiota en monómeros y oligómeros de ácido β -hidroxibutírico, los cuales afectan positivamente la interacción huésped-bacteria en el intestino de una manera similar a los ácidos grasos de cadena corta (SCFA's por sus siglas en inglés) (Defoird *et al.*, 2009). Lui *et al.* (2010) evaluaron al PHB como un agente protector contra *Vibrio* spp. luminescentes utilizando diferentes cepas microbianas degradadoras de PHB. Las cepas bacterianas fueron aisladas desde el tracto gastrointestinal del esturión siberiano *Acipenser baerii*, la lubina europea *Dicentrarchus labrax* y del camarón gigante de Malasia *M. rosenbergii*. A su vez, utilizaron a *A. franciscana* como un organismo gnotóbico (libre de microbios) y modelo de estudio para ser desafiada contra *V. campbelli*. Los resultados del experimento mostraron que la suplementación combinada de bacterias degradadoras de PHB y PHB como un alimento simbiótico mejora la supervivencia de *A. franciscana*. Finalmente, se han asociado dos vías con la degradación del PHB como agente de protección: (1) el hidroxibutirato suministra energía a la mucosa intestinal incrementando la salud del intestino y la resistencia a infecciones, y (2) la disminución de patógenos o virulencia como consecuencia de la disrupción de la señalización bacteriana a partir de las bacterias degradadoras de PHB (Defoird *et al.*, 2009).

De Schryver *et al.* (2010) y Najdegerami *et al.* (2012) evaluaron el efecto del PHB como suplemento alimenticio en el esturión siberiano (*A. baerii*) y en la lubina europea (*D. labrax*). En ambos estudios se concluye que el biopolímero aumenta el potencial metabólico de la comunidad aeróbica. Además, actúa como agente de control microbiano, y su degradación en el tracto digestivo altera el pH a causa de la producción de ácido β -hidroxibutírico, que induce cambios en la composición de la comunidad

bacteriana. De Schryver *et al.* (2010) señala que se necesitan estudios adicionales para determinar la factibilidad del uso del PHB en condiciones de acuicultura comercial y más aún identificar bacterias degradadoras de PHB que puedan ser utilizadas como probióticos.

Sui *et al.* (2014) evaluaron el efecto del PHB sobre la eficiencia de larvas zoea del cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*). Estos autores suministraron el PHB en diferentes formas: particulado, bioencapsulado (en rotíferos y artemias) o en combinación. Encontraron que las larvas alimentadas con alimento bioencapsulado mejora la supervivencia, la velocidad de desarrollo, la tolerancia osmótica de la larva y concluyen que el PHB puede ser utilizado como una fuente de energía. Estos resultados coinciden con datos obtenidos en larvas de *M. rosenbergii* (Nhan *et al.*, 2010). Asimismo, estos autores proponen que el polímero de PHB es parcialmente degradado en el tracto intestinal en monómeros y polímeros de β -hidroxibutirato y éstos promueven el desarrollo de la larva de tres maneras diferentes: (1) como fuente de energía, (2) mejorando la biodisponibilidad de minerales y elementos traza en el tracto digestivo y (3) manteniendo un sistema microbiano intestinal estable. También, recomiendan usar el PHB como aditivo y no como una fuente de nutrientes. Dentro de su investigación enfatizan que el PHB es un mejor aditivo de ácidos orgánicos que los propios ácidos grasos de cadena corta ya que estos son volátiles; mientras que el PHB al ser insoluble en agua aumenta su eficiencia de absorción.

1.1. Justificación

En las primeras etapas de cultivo, los abulones se alimentan de biopelículas dominadas por diatomeas bentónicas y bacterias (Hahn, 1989; Kawamura, 1996). En México, una de las diatomeas bentónicas más utilizadas para la formación de biopelículas, utilizadas para la alimentación de postlarvas y juveniles tempranos; es *N. incerta* (Gorrostieta-Hurtado *et al.*, 2009). Las biopelículas se desarrollan sobre los estanques de cultivo o en sustratos inertes tales como placas de polietileno o policarbonato (Stott *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2012). El método de cultivo en placa, además de ser utilizado para garantizar altas tasas de asentamiento larval (Slattery, 1992), proporciona una buena fuente de alimento para las postlarvas y juveniles tempranos de abulón (Kawamura *et al.*, 1998a). No obstante, el crecimiento de los abulones puede verse limitado cuando la biopelícula en las placas es sobrepastoreada (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998) o cuando no existe un desarrollo adecuado de la biopelícula sobre la placa (Miranda-Saucedo, 2011). Por otro lado, aunque las placas de teraftalato de polietileno (PET, por sus siglas en inglés) son utilizadas en el cultivo de abulón en México, las placas de poli- β -hidroxibutirato (PHB), podrían utilizarse como una alternativa para asegurar un desarrollo continuo de la biopelícula en el cultivo de abulón. El PHB es un polímero biodegradable que ha sido utilizado en la acuicultura no sólo como un mejorador del crecimiento y la supervivencia, sino también como una herramienta para prevenir enfermedades bacterianas (Lui *et al.*, 2010 y De Schryver *et al.*, 2010). Por lo tanto, para entender cuál es el efecto de la utilización del PHB sobre el desarrollo de la biopelícula formada por *N. incerta*, en el presente trabajo se evaluó la composición proximal de dicha biopelícula, la dinámica de crecimiento de *N. incerta* y el desarrollo y caracterización de comunidades bacterianas por métodos tradicionales, moleculares y por citometría de flujo; de manera tal, que nos permite comprender si las placas de PHB representan una herramienta viable para ser utilizadas en las fases tempranas del cultivo de abulón en reemplazo del PET.

1.2. Hipótesis

La composición de la biopelícula de *Navicula incerta* formada en placas de bioplástico poli- β -hidroxibutirato (PHB), será diferente de la película desarrollada sobre placas de teraftalato de polietileno (PET por sus siglas en inglés), dada la naturaleza del bioplástico.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Caracterizar y comparar la biopelícula formada por *Navicula incerta* en placas de poli- β -hidroxibutirato (PHB) y en placas de teraftalato de polietileno (PET).

1.3.2. Particulares

- Determinar la dinámica de crecimiento de *Navicula incerta* en placas de PHB verde y blanco y en PET.
- Evaluar la composición proximal de la biopelícula de las placas de PBH y PET.
- Analizar la biopelícula de los diferentes plásticos mediante citometría de flujo.
- Identificar bacterias cultivables de la biopelícula usando el gen 16S rDNA.

2. Materiales y Métodos

2.1. Mantenimiento de la cepa y producción de biomasa

La cepa de *Navicula incerta* fue proporcionada por el Cepario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) con número de clave NVI1. Para el mantenimiento de la cepa y producción de biomasa se utilizó agua de mar del sistema semicerrado del laboratorio del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua se circuló a través de filtros de algodón tipo Cuno 3M de 10 y 5 μm para eliminar microorganismos y partículas suspendidas y en disolución. Después, se esterilizó en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg cm^{-1} por un lapso de 20 min.

La cepa se mantuvo en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 150 mL de medio de cultivo “f/2” (Guillard, 1975) grado técnico (ProLine® Aquatic Eco Systems) y silicatos (30 mg L^{-1}). Los matraces inoculados con *N. incerta* se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio: temperatura de 21 \pm 1 °C y una intensidad de luz continua de 22.04 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suministrada por lámparas de LED para acuario con luz blanca (Marineland No. 32997). La intensidad de luz, para todos los tratamientos, se midió con un luxómetro digital (Mastech Professional Luxmeter, LX1010B). El valor obtenido en unidades de iluminancia (lux) se transformaron a $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante la fórmula descrita por Thimijan y Heins (1983) (Anexo 1). En todos los experimentos realizados se utilizó el mismo medio de cultivo y concentración de silicatos.

2.2. Dinámica de crecimiento de *N. incerta* cultivada en matraz Ferbach

Para conocer la dinámica de crecimiento, *N. incerta* se inoculó en un matraz Ferbach a una concentración de 82,159 \pm 1,889.66 cél cm^{-2} en 2 L de medio de cultivo “f/2”. Los

cultivos se mantuvieron bajo las condiciones descritas anteriormente, con una modificación en la intensidad de luz a una irradiancia final de $14.32 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El cultivo se mantuvo por 10 días y se registró el crecimiento celular. Para ello, se desprendieron las células adheridas a la superficie del matraz con 30 g de esferas de cristal de 2 mm de diámetro estériles en cada recipiente. Cada matraz fue agitado de forma manual con movimientos circulares hasta disgregar, suspender y homogeneizar las células (Chávez-Medrano, 2008). Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

El agua de mar utilizada para estos cultivos se desinfectó con un generador de ozono (Mar-Zone 30, Aquatic Eco Systems No. OZ30) durante 40 min. Después se suministró aireación vigorosa para eliminar residuos del gas, durante el mismo tiempo.

2.3. Cultivo de *N. incerta* sobre placas de PET y PHB

2.3.1. Descripción de los polímeros PET y PHB

El cultivo de *N. incerta* y la formación de su biopelícula se llevó a cabo sobre placas de teraftalato de polietileno, conocido como polyethylene terephthalate (PET por sus siglas en inglés), y de poli- β -hidroxibutirato (PHB). Las placas de PET, con una superficie ondulada y transparente, fueron proporcionadas por la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Buzos y Pescadores. Estas se cortaron de forma cuadrangular de tal manera que tuvieran una superficie de 25 cm^2 . Las placas de PHB fueron proporcionadas por Metabolix GmbH en colores verde (PHBv) y blanco (PHBb) con una superficie lisa y fueron cortadas a una dimensión de 5 x 5 cm.

2.3.2. Diseño experimental

El ensayo consistió en tres tratamientos representados por placas de los distintos polímeros PET, PHBv y PHBb, con tres réplicas cada uno. Cada tratamiento fue asignado al azar entre las unidades experimentales (Diseño completamente aleatorizado).

2.4. Biopelícula de *N. incerta* sobre placas de PET y PHB

Para estudiar la formación de la biopelícula de *N. incerta* sobre los polímeros PET, PHBv y PHBb; se inocularon 18 placas (5 x 5 cm) de cada polímero para cada uno de las réplicas en un contenedor plástico transparente (29.6 x 17.4 x 4.7 cm) con un inóculo de $99,468 \pm 1990$ cél cm^{-2} en 3 L de medio de cultivo "f/2". Las placas se colocaron de tal forma que cubrieran la base del recipiente. Este cultivo se mantuvo bajo las mismas condiciones descritas para el cultivo en matraz Fernbach con una irradiancia promedio de 14.32 ± 0.11 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y aireación continua. El agua de mar utilizada (60 L) se desinfectó con un generador de ozono (Mar-Zone 30) durante 40 min. Para eliminar residuos del gas se suministró aireación profusa durante el mismo tiempo. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los muestreos se realizaron sin remplazo debido a la naturaleza bentónica de la diatomea y a la formación de la biopelícula en la superficie del polímero.

2.4.1. Evaluación de la biomasa de *N. incerta* sobre los polímeros

La formación de biopelículas se mantuvo por 10 días. Se tomaron dos placas de cada cultivo y con un pincel de cerdas finas se desprendió y colectó la biopelícula. Las células microalgales fueron disgregadas y homogenizadas mediante un tratamiento de ultrasonido (Brasonic 3) por un periodo de 1-2 min o bien hasta que la biopelícula se mezclara por completo. Una vez disgregadas las diatomeas, éstas fueron contadas utilizando un microscopio compuesto (Primo St iLED, Zeiss) en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Los conteos se registraron cada dos días como número de células por centímetro cuadrado (cm^{-2}). Con los valores de densidad celular, se estimó la curva de mejor ajuste utilizando una regresión no lineal de tipo logarítmico, la cual fue expresada como una función exponencial ($y = b * x^a$).

2.5. Parámetros poblacionales

Se calculó la tasa específica de crecimiento (μ divisiones día^{-1}), la tasa de crecimiento acumulada ($\sum \mu$ divisiones día^{-1}) y el tiempo de generación (Tg días) por día utilizando las

ecuaciones propuestas por Fogg y Thake (1978). Estos datos se obtuvieron a partir de los valores del conteo celular de *N. incerta* para cada uno de los plásticos.

$$\mu = \frac{\log_2 N - \log_2 N_0}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$\Sigma\mu = \mu_2 + \mu_1 \quad (2)$$

$$Tg = \frac{1}{\mu} \quad (3)$$

Donde:

N: número de células al tiempo final

N₀: número de células al tiempo inicial

t₁: tiempo inicial

t₂: tiempo final

μ₁: tasa de crecimiento inicial

μ₂: tasa de crecimiento final

2.6. Determinación de la composición proximal de la biopelícula

Para evaluar la composición proximal de la biopelícula de *N. incerta* se tomaron ocho placas de cada tratamiento en el sexto día de cultivo. La biopelícula se colectó de acuerdo a lo descrito anteriormente. La cuantificación del Peso seco total (PST), Peso seco orgánico (PSO) y Peso seco inorgánico (PSI), se llevó a cabo según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Para ello, la biopelícula fue concentrada en filtros de fibra de vidrio Watman GF/C de 47 mm de diámetro previamente incinerados en una mufla (Barnstead Thermolyne 1400) durante 4 h a 490 °C y con un peso constante. La biopelícula filtrada se lavó con una solución de formiato de amonio al 3%. Estos filtros se colocaron en una estufa (VWR 1321) a 60 °C por 24 h, posteriormente con un intervalo de 1 h se pesaron en una balanza analítica (Mettler AE-20) hasta alcanzar peso constante.

Para obtener el peso seco inorgánico, los filtros se incineraron por 4 h a 490 °C y se pesaron hasta obtener valores constantes.

El cálculo del PST, PSI y PSO se normalizó por cm^{-2} y se obtuvo con las siguientes ecuaciones:

$$PST = \frac{(PSFM) - (PSF)}{VF} \quad (4)$$

$$PSI = \frac{(PSC) - (PSF)}{VF} \quad (5)$$

$$PSO = PST - PSI \quad (6)$$

Donde:

PSF: Peso seco del filtro sin muestra

PSFM: Peso seco del filtro con muestra

PSC: Peso seco del filtro con la muestra incinerada

VF: Volumen filtrado

Para la determinación de Proteínas, Carbohidratos, Lípidos y Pigmentos, la biopelícula de cada muestra se concentró a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 25 mm de diámetro, los cuales fueron congelados a -80 °C hasta el momento de su análisis proximal. El contenido de los distintos constituyentes celulares se normalizó por unidad de superficie del cultivo (cm^{-2}) y como porcentaje con base al peso seco orgánico para cada caso.

2.6.1. Determinación de Proteínas

La extracción de proteínas se realizó con hidróxido de sodio (NaOH) siguiendo la metodología descrita por Malara y Charra (1972). La concentración óptima de NaOH utilizado para *N. incerta* fue de 0.1N en un baño de agua a 100 °C (Simental-Trinidad, 2004). La determinación de proteínas se realizó mediante el reactivo Folin-Ciocalteu y su

cuantificación de acuerdo a la metodología descrita por Lowry *et al.* (1951) (Anexo 3). La curva de calibración estándar se elaboró con suero de albúmina de bovino al 99% con un intervalo de dilución de 15 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6.2. Determinación de Carbohidratos

La extracción de carbohidratos se hizo con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M de acuerdo a la técnica descrita por Whyte (1987). Para su cuantificación se utilizó fenol al 5% y H_2SO_4 concentrado según el método descrito por Dubois *et al.* (1956) (Anexo 4). Se elaboró una curva de calibración donde se utilizó como estándar una solución de glucosa al 99%. Las diluciones de glucosa utilizadas para la curva de calibración fueron de 15 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6.3. Determinación de Lípidos

La extracción de lípidos se llevó a cabo mediante una mezcla de solventes (cloroformo-metanol-agua en una proporción de 3.3:6.6:1.0) siguiendo la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972) al realizar la extracción a baja temperatura (4 °C), esto con la finalidad de favorecer la extracción completa de los lípidos y evitar que los solventes se evaporen antes de la formación de la bifase. La cuantificación de los lípidos extraídos se obtuvo según el método de Pande *et al.* (1963) con una solución de dicromato ácido de potasio al 2% (Anexo 5). Los valores obtenidos fueron extrapolados en una curva de calibración elaborada mediante una solución estándar de tripalmitina al 99%. La solución de tripalmitina se diluyó en valores entre 15 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6.4. Determinación de Pigmentos

El contenido de pigmentos, Clorofila (Chl) *a*, *c* y carotenoides; se evaluaron con el método tricromático descrito por Parsons *et al.* (1984). La extracción de los pigmentos se llevó a cabo con acetona al 90%. Para su determinación se utilizaron las ecuaciones propuestas de la SCOR/UNESCO detalladas por Strickland y Parsons (1965) (Anexo 6). Asimismo,

se determinó la razón entre los pigmentos carotenos:clorofila a y clorofila c:clorofila a como un indicador de la limitación de nutrientes en cultivos microalgales.

2.7. Pérdida de peso de los polímeros

Se realizó un análisis gravimétrico para conocer la pérdida de peso de los plásticos usando una balanza analítica Adventurer™ (AR2140) con una precisión de 0.0001 g. Una vez que se colectó la biopelícula de las placas, éstas se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en una estufa a 60 °C y se pesaron hasta alcanzar peso constante.

2.8. Cultivo Bacteriano

Para la caracterización bacteriana de la biopelícula de *N. incerta*, se realizaron tres cultivos bacterianos en tres medios diferentes: cultivo en medio acuoso (Luria Bertani, LB), en placas de LB-Agar y en medio específico para *Vibrio* TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa). Cada medio de cultivo se esterilizó en una autoclave por un periodo de 15 min a 121 °C y a una presión de 102 kg cm⁻². Se estimó el número de unidades formadoras de colonia presentes en 1 mL (UFC mL⁻¹) mediante conteo directo en placa. El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución (Mandigan *et al.*, 2014).

2.8.1. Cultivo de bacterias en medio acuoso

El cultivo bacteriano en medio acuoso se llevó a cabo en el medio nutritivo estéril Luria Bertani (LB Sigma) adicionando como disolvente agua de mar esterilizada con 35 unidades prácticas de salinidad (ups). Las ups se midieron con un refractómetro portátil EXTECH (RF-20). El medio de cultivo se inoculó con 100 µL de la biopelícula y se dejó crecer de 12 a 18 h a una temperatura de 25 °C con agitación continua. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, se preservó una alícuota de la muestra en formaldehído al 4% y fue refrigerada a 4 °C, hasta su uso en citometría de flujo. El volumen restante

fue preservado en glicerol estéril (100%) en una proporción muestra-glicerol (3:1) y congelada a -80 °C hasta la extracción de DNA (Howard, 1956).

2.8.2. Cultivo de bacterias heterotróficas

El cultivo de bacterias heterótrofas se realizó siguiendo la metodología del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Clesceri *et al.*, 1998). Para ello, se vertieron 20 mL de LB-Agar estéril en cajas Petri. El medio de cultivo se preparó con agua de mar estéril con una salinidad de 35 ups. Se realizaron diluciones seriadas de la biopelícula suspendida en agua de mar. En el caso de la biopelícula procedente de los bioplásticos (PHBv y PHBb) la dilución utilizada fue hasta 10^{-14} , mientras que para el PET las diluciones fueron como máximo 10^{-10} , permitiendo su cuantificación.

La placa con el medio nutritivo se inoculó con 100 μ L de la dilución correspondiente y fue sembrado por dispersión. El cultivo se dejó crecer por 24 h a una temperatura de entre 27 y 28 °C. Con la finalidad de llevar a cabo una prospección general de las bacterias cultivables presentes en la biopelícula de cada plástico, se aislaron por tratamiento dos colonias diferentes de acuerdo a su morfología, color o tamaño, y se resembraron en medio líquido LB de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente. Estos cultivos sirvieron para la caracterización de bacterias cultivables por técnicas de análisis molecular.

2.8.3. Cultivo en medio TCBS

Para conocer si en la biopelícula se desarrollaron bacterias tipo *Vibrio*, se realizó un cultivo en un medio específico, Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (TCBS, por sus siglas en inglés) (TCBS, BD Difco), preparado bajo las recomendaciones del fabricante. El cultivo se llevó a cabo bajo las condiciones descritas anteriormente para bacterias heterotróficas.

2.8.4. Conteo de bacterias

La cantidad de bacterias heterotróficas y tipo *Vibrio* presentes en la biopelícula se estimó por conteos directos en placa. Para ello, se contó el número de colonias que crecieron durante el periodo de incubación, las cuales se expresaron en unidades formadoras de colonia presente en 1 mL (UFC mL⁻¹). El conteo de las colonias se llevó a cabo con una imagen procesada en un sistema digital de fotodocumentación (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System de BioRad) usando un adaptador de luz visible (White Transilluminator BioRad).

2.9. Análisis de la biopelícula mediante citometría de flujo

Con el objetivo de diferenciar y cuantificar entre células de *N. incerta* y bacterias pertenecientes a la biopelícula formada en cada tratamiento se llevó a cabo el análisis mediante citometría de flujo. Este análisis se realizó con el equipo Attune® Acoustic Focusing Cytometer. Se utilizaron las muestras de la biopelícula fijadas en formaldehído al 4% y refrigeradas a 4 °C hasta su análisis.

La biopelícula fue disgregada y homogenizada mediante un tratamiento de ultrasonido por un periodo de 2 min o hasta que la muestra se disgregara por completo para evitar obstruir el canal de inyección. Debido a la concentración de las muestras se realizaron diferentes diluciones (Tabla 1).

Tabla 1. Diluciones realizadas a las muestras analizadas por citometría de flujo.

Muestra	Día de cultivo	Dilución
Biopelícula	2	1:40
Biopelícula	4 al 10	1:100
Cultivo bacteriano	2 al 10	1:10

Previo al análisis final de la biopelícula fue necesario identificar la señal producida por las células bacterianas y las de la diatomea *N. incerta* de manera individual. Para este fin se

utilizó el cultivo bacteriano en medio LB y una muestra de *N. incerta* proveniente de un cultivo monoalgal en matraz Erlenmeyer. Las variables de configuración y lectura de muestras en el Attune® Acoustic Focusing Cytometer así como la estandarización se encuentran en el Anexo 6. Para el análisis final se utilizaron los láseres Violeta (405 nm) y Azul (488 nm). Una vez que se examinaron las características de la población bacteriana y de *N. incerta* se identificó la posición de cada grupo celular en un histograma biparamétrico con los parámetros SSC (dispersión lateral) contra BL3 (fluorescencia en rojo, >640nm) (Anexo 6). De este modo, se logró la identificación en la biopelícula de partículas que se asignaron a los grupos celulares denominados como bacterias y de *N. incerta*.

2.10. Caracterización molecular de la biopelícula

Las bacterias presentes en la biopelícula se identificaron por métodos de análisis molecular. Estas bacterias fueron aisladas de un cultivo en placa (LB-Agar) y fueron reinoculadas en LB acuoso para incrementar su biomasa (ver sección 2.8.1).

2.10.1. Extracción de DNA bacteriano

Para la extracción del DNA bacteriano se utilizaron las colonias aisladas del medio LB-Agar. La extracción se llevó a cabo con el Kit DNeasy® Blood and Tissue de Qiagen. Las muestras fueron pretratadas antes de la extracción con medio estéril LB y una solución salina (PBS). Lo anterior con la finalidad de limpiar las células bacterianas del medio preservante (glicerol) (Anexo 7).

Se cuantificó la concentración y pureza del DNA extraído en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis. La concentración de DNA fue calculado usando los valores de absorbancia para la longitud de onda 260nm, además se evaluaron las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm. Se verificó la integridad por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% por 60 min a 90 V, con amortiguador TBE 1X. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) y visualizado con un transiluminador de luz UV en un sistema digital de fotodocumentación Ultracam (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System BioRad).

2.10.2. Secuenciación y análisis del DNA bacteriano

Las bacterias cultivables presentes en la biopelícula fueron identificadas mediante la secuenciación del gen *16S* rDNA que es utilizado para la identificación taxonómica de comunidades bacterianas (Claesson *et al.*, 2010).

2.10.3. Amplificación del gen *16S* rDNA

Se realizó una amplificación selectiva de la región *V*₇-*V*₉ del gen *16S* rDNA, para las colonias aisladas del cultivo en LB-Agar. Para ello, se llevó a cabo una PCR utilizando los iniciadores DGTA (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') y RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') (Greisen *et al.*, 1994), los cuales flanquean la región *V*₇-*V*₉ y que amplifican un fragmento de ~370 pb. La amplificación por PCR se realizó en un volumen de reacción de 100 μL con concentraciones finales de amortiguador A 1X (1.5 mM Mg), 0.2 mM de dNTPs, 0.5 mM de cada iniciador, 0.04 U de polimerasa *Taq* y 4 ng de DNA molde.

Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Veriti® Applied Biosystem) y las condiciones para la reacción de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos a 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 45 s y 72 °C durante 1 min; con una extensión final a 72 °C por 5 min (Claesson *et al.*, 2010; Caporaso *et al.*, 2011). De cada reacción de PCR se tomó una alícuota para comprobar la amplificación del producto y el tamaño, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Los productos de PCR se limpiaron con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) y se sometieron a secuenciación tipo Sanger con el equipo ABI Prism® Capillary Electrophoresis Genetic Analyzers and BigDye® Terminator chemistry (SeqXcel Inc., San Diego, CA, USA). Las secuencias se analizaron con el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Estas se ensamblaron para generar una secuencia consenso. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis con BLAST en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.11. Análisis estadístico

Las diferencias en el crecimiento (densidad celular) de *N. incerta* en los diferentes plásticos. Las diferencias entre la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) desarrolladas en cada plástico; así como el número de eventos o células registradas como bacterias y *N. incerta* obtenidos a través del análisis por citometría de flujo fueron estimadas con el análisis estadístico de covarianza (ANCOVA). El ANCOVA se realizó para comparar las líneas de regresión de cada tratamiento y determinar la relación y el grado de variación entre las variables medidas y el tiempo de cultivo (Fry, 1993; Badii *et al.*, 2008). Para estos análisis los datos de densidad celular, UFC, número de células bacterianas y de *N. incerta* (cm⁻²) fueron transformados con el logaritmo natural (Ln) usando la siguiente ecuación:

$$x' = Ln(x) \quad (7)$$

Para evaluar las posibles diferencias entre la composición proximal (proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos y peso seco total, orgánico e inorgánico) y en la densidad de bacterias tipo *Vibrio* en la biopelícula formada en los diferentes plásticos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada variable. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a utilizar la prueba de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con un α de 0.05.

También, se utilizó el análisis estadístico ANCOVA para realizar la comparación entre el porcentaje de peso perdido total por día de las placas de PHBv y PHBb. Para cumplir con los supuestos del análisis de covarianza los valores en porcentaje fueron transformados mediante la función arco seno (Zar, 2010) utilizando la siguiente ecuación:

$$x' = \arcseno(x) \quad (8)$$

Donde, x representa la variable a transformar y x' la variable transformada.

Para realizar todas las pruebas estadísticas se cumplió con los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas, aleatoriedad e independencia correspondientes.

Los análisis estadísticos fueron procesados con el paquete estadístico STATISTICA versión 8.0 (StatSoft, Inc.).

3. Resultados

3.1. Dinámica del crecimiento de *N. incerta* cultivada en matraz Fernbach

A lo largo del tiempo de cultivo se observó el incremento en la densidad celular, la cual alcanzó el valor máximo promedio al sexto día con $1,006,117 \pm 14,772$ células cm^{-2} . No se encontró fase de adaptación en el cultivo y la fase exponencial se identificó desde el día 0 hasta el día 4. En la fase exponencial se obtuvo la mayor tasa específica de crecimiento ($\mu = 1.44 \pm 0.03$ divisiones día^{-1}) y la tasa de generación más rápida ($T_g = 0.69 \pm 0.01$ días) (Tabla 2). Posteriormente, se identificó una fase de declinamiento relativo al sexto día de cultivo marcada por la disminución de la tasa de división celular. Entre el sexto al décimo día de cultivo, el crecimiento de *N. incerta* inició la fase estacionaria, evidenciado por el descenso de la tasa de crecimiento ($\mu = 0.11 \pm 0.01$ divisiones día^{-1}) y el aumento en el tiempo necesario para que la población pudiese duplicarse ($T_g = 9.17 \pm 0.56$ días) (Figura 1 y Tabla 2).

Se estimó el modelo de regresión no lineal, para todo el periodo de cultivo, entre la densidad celular y los días de cultivo. La curva de mejor ajuste correspondió a una regresión logarítmica, expresada como una función exponencial ($DC = b x^a$) $y = 553,910.60 x^{216,992.60}$ y un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.97$. Para lograr lo anterior, fue necesario modificar el valor del día 0 como 0.1, debido a que no existe el logaritmo de cero.

Tabla 2. Densidad celular (DC) (células cm^{-2}), tasa específica de crecimiento (μ divisiones día^{-1}), tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$ divisiones día^{-1}) y tiempo de generación (Tg días) de *N. incerta* cultivada a nivel matraz. Valores entre paréntesis indican promedio ($n=3$) \pm error estándar.

Días de cultivo	DC	μ	$\sum\mu$	Tg
0	82,159	--	--	--
2	607,467 (21,217)	1.44 (0.03)	1.44	0.69 (0.01)
4	864,300 (20,921)	0.25 (0.01)	1.69	3.95 (0.21)
6	1,006,117 (14,772)	0.11 (0.01)	1.80	9.17 (0.56)
8	943,583 (12,435)	-0.05 (0.01)	1.75	-23.14 (4.16)
10	1,111,083 (10,652)	0.12 (0.01)	1.87	8.83 (1.34)

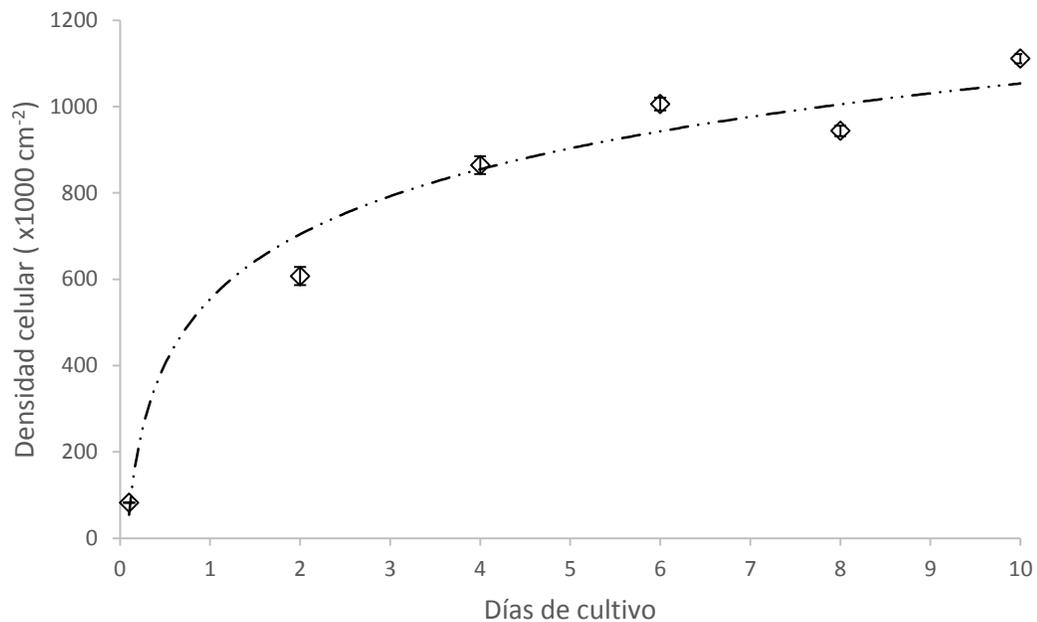


Figura 2. Densidad celular ($\times 1000$ células cm^{-2}) y curva de crecimiento (regresión logarítmica) de *N. incerta* cultivada a nivel matraz. Las barras indican promedio ($n=3$) \pm error estándar.

3.1.1. Composición proximal

El PST fue de $1,427.10 \pm 34.43 \mu\text{g cm}^{-2}$. La fracción orgánica fue $354.91 \pm 25.75 \mu\text{g cm}^{-2}$, equivalente a un porcentaje relativo del 25%; mientras que la fracción inorgánica alcanzó un valor de $1,072.19 \pm 11.08 \mu\text{g cm}^{-2}$ lo que representa el 75% (Tabla 3).

3.1.1.1. Proteínas, Carbohidratos y Lípidos

El contenido proteico de *N. incerta* cultivada a nivel matraz alcanzó un nivel promedio de $39.59 \pm 3.65 \mu\text{g cm}^{-2}$ equivalente al 11%. La cantidad de carbohidratos fue de $12.89 \pm 0.73 \mu\text{g cm}^{-2}$, equivalente al 4%. En la fracción lipídica solamente se obtuvo un valor estimado en $90.39 \mu\text{g cm}^{-2}$, lo que corresponde a un 25% (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio (n=3) de la composición proximal de *N. incerta* cultivada a nivel matraz, expresados en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las abreviaturas PST, PSO y PSI corresponden a peso seco total, orgánico e inorgánico, respectivamente. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.

PST	PSO	PSI	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
1,427.10 (34.43)	354.91 (25.75)	1,072.19 (11.08)	39.59 (3.65)	12.89 (0.73)	90.39* --

*Solamente se obtuvo un valor.

3.1.1.2. Pigmentos

El pigmento que alcanzó la mayor concentración fue la Clorofila (Chl) *a* con $360.53 \pm 12.63 \text{ ng Chl cm}^{-2}$. El nivel de Clorofila *c* fue de $76.17 \pm 3.48 \text{ ng Chl cm}^{-2}$; mientras que el contenido de carotenos presentó $116.82 \pm 2.78 \text{ ng cm}^{-2}$. La razón entre pigmentos mostró valores promedio de Carotenos:Clorofila *a* de 0.32 ± 0.004 y Clorofila *c*:Clorofila *a* de 0.21 ± 0.004 (Tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio (n=3) de Clorofila *a*, *c* (ng Chl cm^{-2}) y Carotenos (ng cm^{-2}) de *N. incerta* cultivada a nivel matraz. También razón Carotenos:Clorofila *a* y Clorofila *c*:Clorofila *a*. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.

Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>c</i>	Carotenos	Carotenos: Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>c</i> : Clorofila <i>a</i>
360.53 (12.63)	76.17 (3.48)	116.82 (2.78)	0.32 (0.004)	0.21 (0.004)

3.1.2. Crecimiento de bacterias heterotróficas

La densidad bacteriana se incrementó desde el inicio hasta el final del cultivo. La concentración inicial promedio fue de 3.6×10^3 UFC cm^{-2} , este valor aumentó considerablemente a partir del cuarto día de cultivo, y el valor máximo se registró al octavo día con un promedio de 2.3×10^8 UFC cm^{-2} (Figura 3).

Al evaluar la presencia de bacterias tipo *Vibrio* cultivadas en TCBS, no se observó crecimiento bacteriano a lo largo del cultivo.

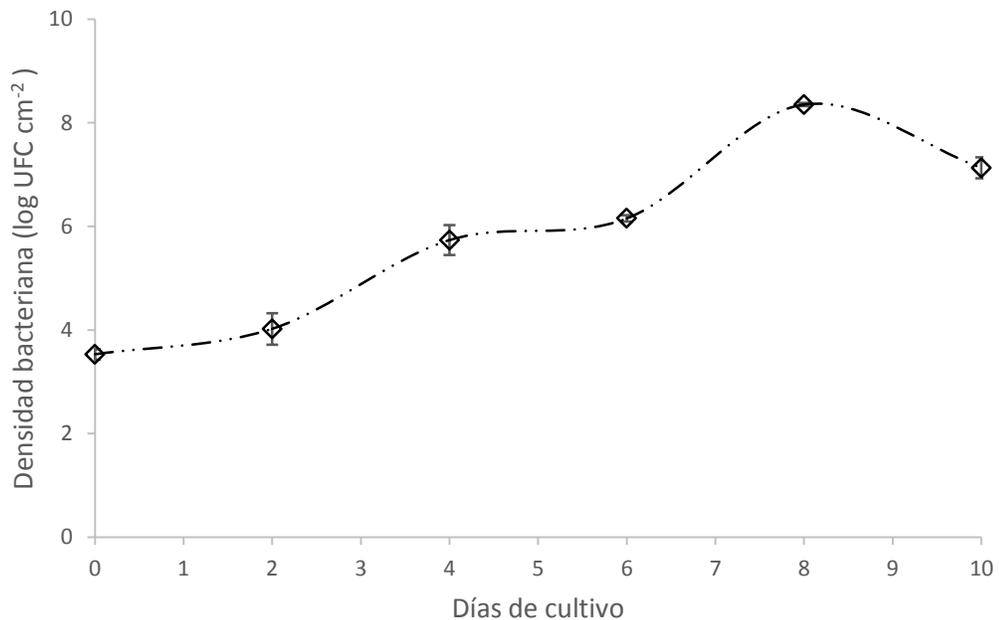


Figura 3. Bacterias heterotróficas (log UFC cm^{-2}) del cultivo de *N. incerta* a nivel matraz. Las barras indican promedio (n=3) \pm error estándar.

3.1.3. Análisis de citometría de flujo de *N. incerta*

En el análisis de citometría de flujo la población de *N. incerta* y bacterias presentaron una señal específica e independiente de fluorescencia con la luz dispersada lateralmente (SSC) y en el filtro BL3 (fluorescencia en el rojo, $>640\text{nm}$). Las células de *N. incerta* registraron la mejor intensidad excitando las células con el láser de 488nm (Azul) y su autofluorescencia en el filtro BL3. Las ventanas de análisis para el grupo de *N. incerta* y

bacterias en el histograma biparamétrico no presentaron modificaciones de acuerdo al día de cultivo, sin embargo la intensidad de la señal de *N. incerta* en el filtro BL3 se modificó de acuerdo al incremento de la densidad celular (Figura 4).

Se realizó un análisis cuantitativo del número de células identificadas como *N. incerta* y bacterias, registradas en el citómetro de flujo. El número de células de la población de *N. incerta* fue mayor que las células registradas para el grupo bacteriano a lo largo de los 10 días de cultivo. Las células identificadas de *N. incerta* se encontraron en el intervalo del 73.86 - 91.44%; mientras que las células referidas como bacterias estuvieron por debajo del 26.14% (Tabla 5). El mayor porcentaje alcanzado por las células de *N. incerta* fueron registrados el segundo día de cultivo con 91.44%; mientras que la proporción de bacterias obtuvo 8.56%. (Tabla 5).

Tabla 5. Número de células (cm⁻²) y porcentaje promedio (n=3) de *N. incerta* y bacterias registradas por citometría flujo. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.

Días de cultivo	<i>N. incerta</i>		Bacterias	
	# células cm ⁻²	%	# células cm ⁻²	%
2	438,388	(110,563) 91.44	35,868	(1,533) 8.56
4	484,102	(223,972) 83.52	53,333	(3,380) 16.48
6	290,127	(176,589) 73.86	44,471	(21,617) 26.14
8	403,223	(39,837) 86.98	61,831	(12,519) 13.02
10	645,567	(79,521) 86.93	101,685	(27,728) 13.07

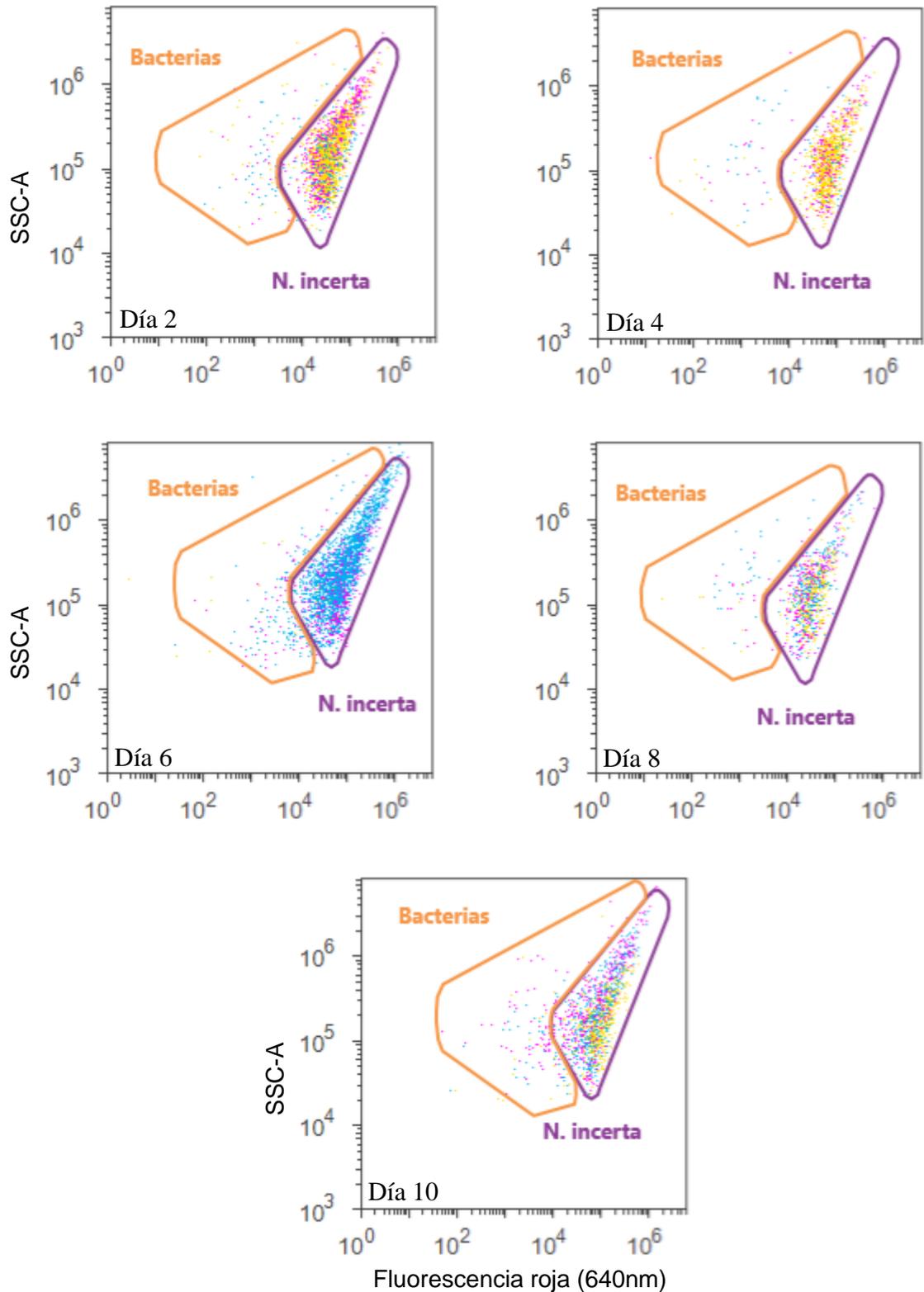


Figura 4. Análisis de citometría de flujo de *N. incerta* cultivada en matraz. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda $>640\text{nm}$. Región morada agrupa a *N. incerta* y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes (n= 3).

3.2. Dinámica de crecimiento de *N. incerta* sobre los polímeros

En todos los cultivos de *N. incerta* evaluada en placas de PET, PHBv y PHBb; la fase de crecimiento exponencial se identificó al segundo día de cultivo, donde además se obtuvo la mayor tasa específica de crecimiento (μ) y la menor tasa de generación (T_g). A partir del cuarto día, el crecimiento de *N. incerta* mostró una fase de declinamiento relativo identificada por la disminución de μ y el aumento de T_g (Tabla 6). La mayor disminución en el crecimiento se observó en *N. incerta* en placas de PHBb ($\mu = -0.15 \pm 0.08$). Posteriormente, los cultivos presentaron la fase estacionaria sin observar la fase de muerte. Entre los días 6 y 10, se observó una marcada limitación del crecimiento. De igual manera, la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) mostró una disminución en la velocidad de duplicación al sexto día de cultivo, valores que corroboran que el cultivo se encontraba en fase estacionaria (Tabla 6).

Aunque las fases de crecimiento se lograron identificar con los parámetros poblacionales (μ , $\sum\mu$ y T_g), al graficar la densidad celular contra los días de cultivo no fue posible identificar dichas fases; por lo que se realizó un modelo de regresión no lineal para *N. incerta* evaluada en cada uno de los plásticos (Figura 5). La curva de mejor ajuste correspondió a una regresión logarítmica (Tabla 7). De la misma forma que en la sección 3.1, fue necesario modificar el valor del día 0 como 0.1.

El ANCOVA para la densidad celular de *N. incerta* evaluada en placas de PET, PHBv y PHBb mostró diferencias altamente significativas ($F_{(1,48)} = 55.93$, $P = 0.0001$) entre los diferentes días de cultivo. No obstante, no se encontraron diferencias en el crecimiento de *N. incerta* cuando se hicieron las comparaciones entre los plásticos ($F_{(2,48)} = 0.104$, $P = 0.97$), debido posiblemente a la variabilidad observada durante toda la fase de cultivo. Por lo tanto, el tipo de plástico no tuvo efecto sobre la densidad celular de *N. incerta*.

Tabla 6. Densidad celular (DC) (células cm^{-2}), tasa de crecimiento (μ divisiones día^{-1}), tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$ divisiones día^{-1}) y tiempo de generación (Tg días) de la biopelícula de *N. incerta* formada en los polímeros PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican promedio (n=3) \pm error estándar.

Días de cultivo	DC		μ		$\sum\mu$	Tg	
PET							
0	99,468		--		--	--	
2	368,250	(67,343)	1.46	(0.15)	1.46	0.70	(0.08)
4	701,000	(144,666)	0.46	(0.03)	1.92	2.21	(0.015)
6	566,250	(59,798)	-0.13	(0.21)	1.79	-0.87	(2.21)
8	847,250	(110,676)	0.29	(0.17)	2.08	-46.87	(49.44)
10	669,500	(28,828)	-0.16	(0.08)	1.92	-45.62	(41.31)
PHBv							
0	99,468		--		--	--	
2	477,722	(21,699)	1.68	(0.03)	1.68	0.60	(0.01)
4	506,750	(69,445)	0.03	(0.14)	1.71	2.70	(3.38)
6	638,250	(43,360)	0.18	(0.06)	1.89	6.99	(2.04)
8	751,750	(14,127)	0.12	(0.05)	2.01	15.29	(9.08)
10	626,000	(46,626)	-0.14	(0.04)	1.87	-8.76	(2.59)
PHBb							
0	99,468		--		--	--	
2	662,250	(24,000)	1.91	(0.03)	1.91	0.56	(0.01)
4	542,000	(39,887)	-0.15	(0.08)	1.76	-57.08	(52.21)
6	646,750	(27,319)	0.13	(0.08)	1.89	-13.28	(18.62)
8	1,031,250	(37,500)	0.34	(0.05)	2.23	3.12	(0.50)
10	667,500	(54,688)	-0.32	(0.08)	1.91	-3.5	(0.74)

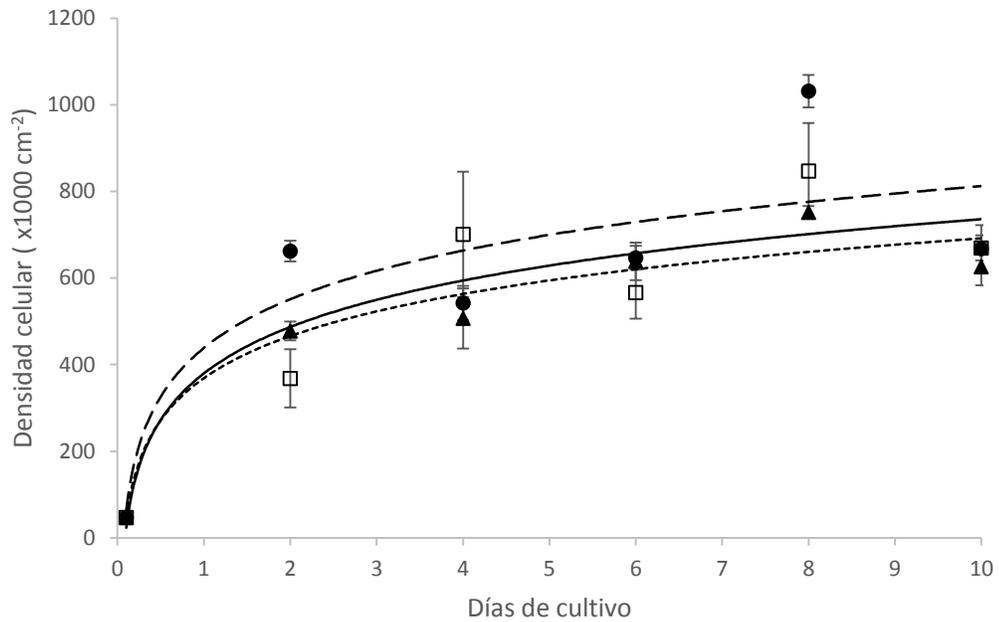


Figura 5. Densidad celular (x1000 células cm⁻²) y curva de crecimiento (regresión logarítmica) de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET (□), PHBv (▲) y PHBb (●). Las barras indican promedio (n=3) ± error estándar.

Tabla 7. Regresión logarítmica entre la densidad celular (DC= bx^a) y los días de cultivo de *N. incerta* cultivada en placas de PET, PHBv y PHBb.

Tratamiento	a	b	r ²
PET	154,724.24	379,700.06	0.709
PHBv	140,199.83	368,808.70	0.892
PHBb	162,332.97	438,403.91	0.741

3.2.1. Composición proximal de la biopelícula

El análisis de varianza para el peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) en la biopelícula mostró diferencias por efecto del tipo de plástico. El PSO presentó diferencias altamente significativas ($F_{(2,6)}= 191.49$; $P= 0.0001$); mientras que el PSI registró diferencias muy significativas ($F_{(2,6)}= 12.97$; $P= 0.006$).

El promedio de PST medido en placas de PET ($295.59 \pm 12.27 \mu\text{g cm}^{-2}$) fue menor que el obtenido en PHBv ($764.30 \pm 68.66 \mu\text{g cm}^{-2}$) y PHBb ($940.83 \pm 78.65 \mu\text{g cm}^{-2}$). El PSO

registró un valor mínimo promedio de $124.22 \pm 5.27 \mu\text{g cm}^{-2}$ (PET), equivalente a un porcentaje relativo del 42%; seguido por $288.30 \pm 4.64 \mu\text{g cm}^{-2}$ (38%) (PHBv) y un valor máximo de 381.65 ± 14.72 (41%) (PHBb). El PSI evaluado en la biopelícula del PET fue en promedio menor ($171.40 \pm 13.50 \mu\text{g cm}^{-2}$) (58%) al obtenido con PHBv ($476.00 \pm 73.03 \mu\text{g cm}^{-2}$) (62%) y PHBb ($559.18 \pm 64.19 \mu\text{g cm}^{-2}$) (59%) (Figura 6).

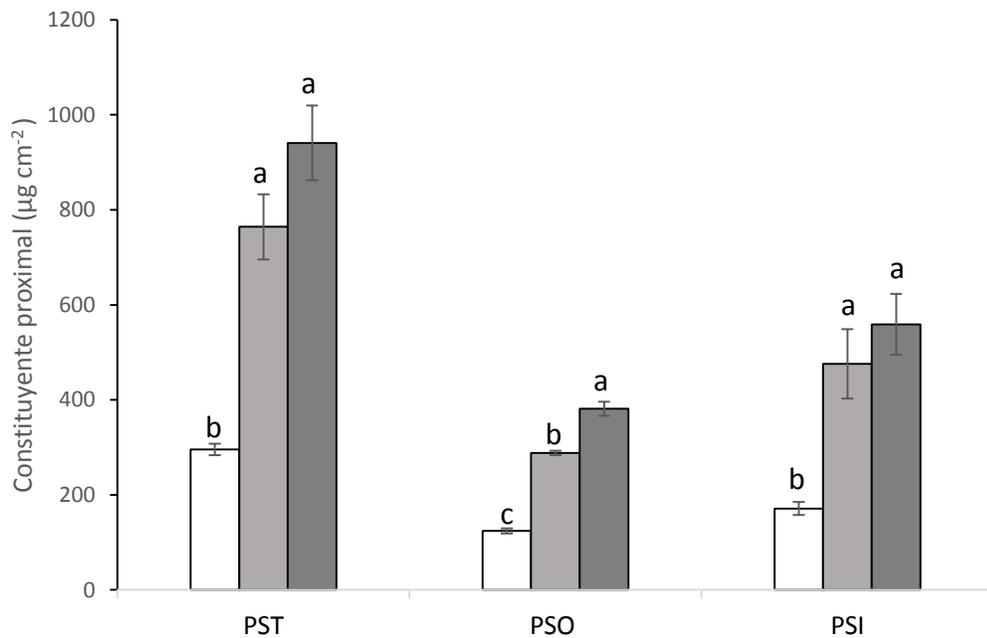


Figura 6. Peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) de la biopelícula de *N. incerta* formada sobre placas de PET (□), PHBv (▒) y PHBb (■) al sexto día de cultivo. Datos promedio (n=3) expresados en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las barras indican \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas para cada grupo (ANOVA de una vía, $P < 0.01$).

3.2.1.1. Proteínas, Carbohidratos y Lípidos

El tipo de plástico tuvo un efecto altamente significativo ($F_{(2,6)} = 524.9$; $P = 0.000$) en el contenido proteico de la biopelícula de *N. incerta*. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre el PET y el PHB. El PHBv y PHBb mostraron las mayores concentraciones de proteína con un valor promedio de 167.99 ± 10.73 (58%) y $185.87 \pm 4.30 \mu\text{g cm}^{-2}$ (49%) respectivamente, mientras que el PET obtuvo $25.63 \pm 1.37 \mu\text{g cm}^{-2}$ (21%) (Figura 7).

Al evaluar la fracción de carbohidratos presentes en la biopelícula de *N. incerta* se observó que el tipo de plástico tuvo un efecto altamente significativo ($F_{(2,6)} = 794.05$; $P = 0.000$). El mayor contenido de carbohidratos se encontró en el PHBv y PHBb, con valores promedio de 84.48 ± 5.31 (29%) y $94.22 \pm 3.88 \mu\text{g cm}^{-2}$ (25%), cantidades que no representan diferencias significativas entre ellas. El valor estimado para el PET fue de 8.39 ± 0.33 (7%) (Figura 7).

Finalmente, el contenido de lípidos en la biopelícula mostró diferencias altamente significativas ($F_{(2,6)} = 68.80$; $P = 0.0001$) entre los plásticos. La mayor fracción lipídica se registró en el PHBb con un valor promedio de $96.61 \pm 6.01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (25%), seguido por el PHBv con una concentración promedio de $67.34 \pm 3.72 \mu\text{g cm}^{-2}$ (23%); mientras que la biopelícula formada en el PET presentó una fracción promedio de $18.90 \pm 4.14 \mu\text{g cm}^{-2}$ (14%). Cada fracción representa diferencias significativas donde el PHBb > PHBv > PET (Figura 7).

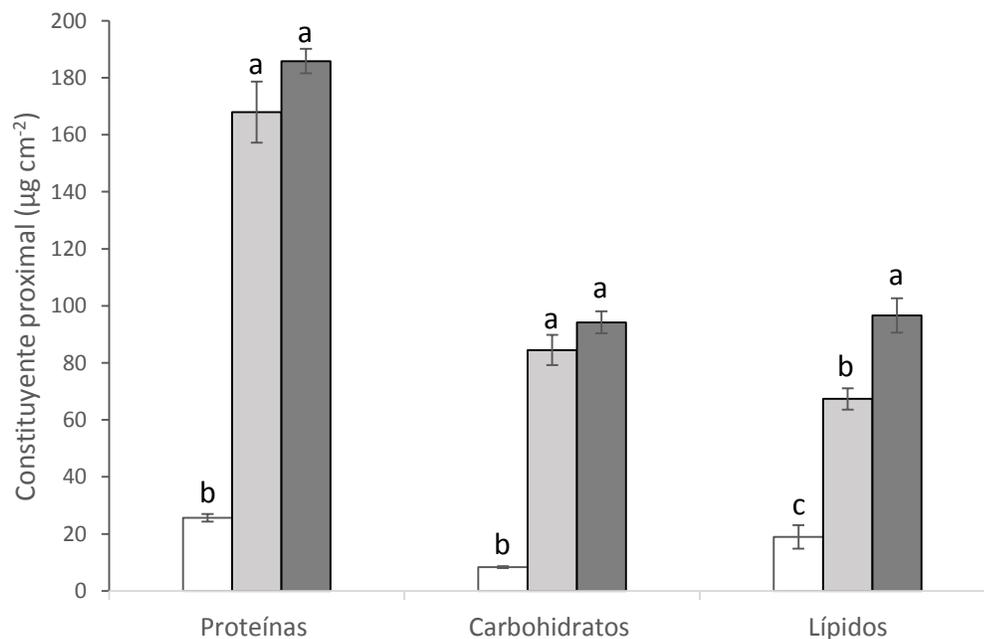


Figura 7. Composición proximal (Proteínas, Carbohidratos y Lípidos) de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET (□), PHBv (▤) y PHBb (▥) al sexto día de cultivo, expresados en $\mu\text{g cm}^{-2}$. Las barras denotan promedio ($n=3$) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas por grupo (ANOVA de una vía, $P < 0.001$).

3.2.1.2. Pigmentos

El contenido de pigmentos, Clorofila (Chl) *a* y *c* evaluados en la biopelícula de *N. incerta* presentaron diferencias significativas ($F_{(2,6)}= 209.02$; $P= 0.0001$ y $F_{(2,6)}= 16.10$; $P= 0.003$, respectivamente) por efecto del tipo de plástico. Las mayores concentraciones de pigmentos fueron representadas en los plásticos PHBv y PHBb. La Clorofila *a* se encontró en mayor proporción con valores promedio de 544.89 ± 22.85 ng Chl cm^{-2} con PHBb. La concentración de Clorofila *c* en el PHBv fue en promedio de 95.71 ± 2.62 ng Chl cm^{-2} y de 126.65 ± 14.37 ng Chl cm^{-2} con PHBb, mientras que el contenido en el PET fue en promedio de 64.46 ± 9.62 ng Chl cm^{-2} . Los pigmentos carotenoides presentaron diferencias altamente significativas ($F_{(2,6)}= 458.56$; $P= 0.0001$) por efecto del tipo de plástico. La concentración máxima de carotenos fue en promedio de 163.73 ± 4.89 ng cm^{-2} con PHBb. El PET mostró la menor concentración de carotenos con un valor promedio de 8.85 ± 4.56 ng cm^{-2} . En general, las diferencias se observaron entre el contenido de pigmentos con las placas de PHBv y PHBb, con una mayor concentración, y el PET con la menor concentración (Figura 8). La razón entre pigmentos Carotenos:Clorofila *a* mostró valores promedio para la biopelícula del PET de 0.07 ± 0.04 , mientras que para el PHBv de 0.34 ± 0.01 y 0.30 ± 0.004 para el PHBb. La razón Clorofila *c*:Clorofila *a* fue en promedio de 0.56 ± 0.03 para la biopelícula formada sobre PET, 0.20 ± 0.004 para el PHBv y 0.23 ± 0.02 para el PHBb (Tabla 8).

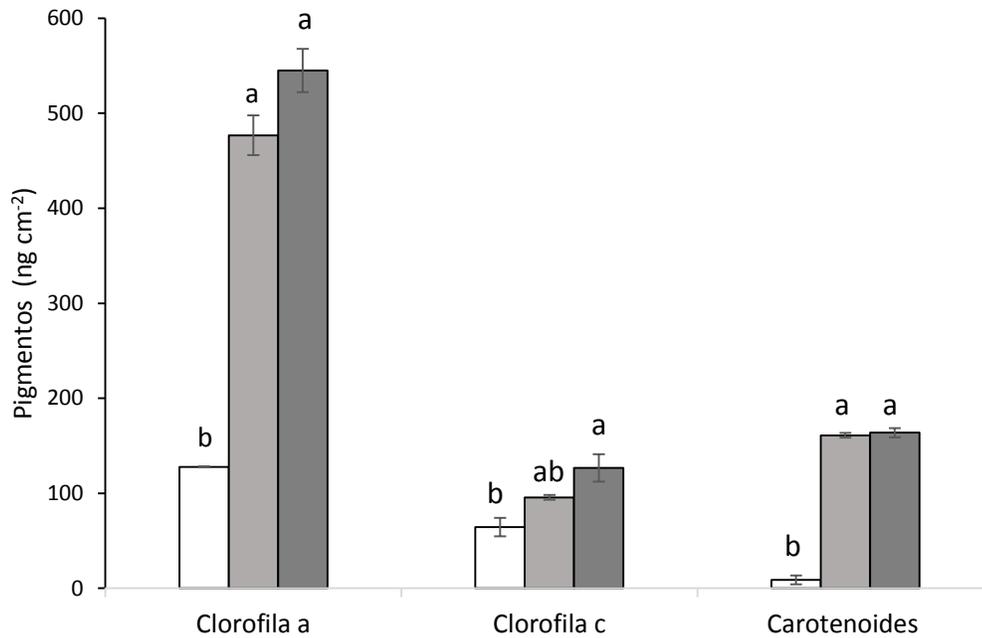


Figura 8. Clorofila α , c y Carotenoides de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET (□), PHBv (▒) y PHBb (■) al sexto día de cultivo. Las barras denotan promedio ($n=3$) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas para cada grupo de pigmento (ANOVA de una vía, $P < 0.001$).

Tabla 8. Razón entre los pigmentos Carotenos:Clorofila a y Clorofila c:Clorofila a. Valores promedio ($n=3$) \pm error estándar.

Razón	PET	PHBv	PHBb
Carotenos:Clorofila a	0.07 \pm 0.04	0.34 \pm 0.01	0.30 \pm 0.004
Clorofila c:Clorofila a	0.56 \pm 0.03	0.20 \pm 0.004	0.23 \pm 0.02

3.2.2. Pérdida de peso de los polímeros

Las placas de PET no registraron cambios importantes en el peso perdido durante el periodo de exposición a la biopelícula de *N. incerta*. El porcentaje de pérdida en las placas de PET mantuvo un valor promedio de 0.43% de su peso inicial durante todo el cultivo (Figura 9).

Se realizó una comparación estadística entre la pérdida de peso por día de las placas de PHBv y PHBb. El ANCOVA de los datos transformados ($\arcseno(x)$) no mostró diferencias significativas entre el color del plástico ($F_{(1,26)} = 0.84$; $P = 0.36$) al considerar todo el ciclo de cultivo. En contraste, indicó que la pendiente presenta diferencias altamente significativas ($F_{(1,26)} = 152.30$; $P = 0.000$) al considerar los días de cultivo, por lo que el tiempo de exposición a la biopelícula de *N. incerta* formada en el PHB influyo en la pérdida de peso. El porcentaje de peso perdido en las placas de PHB incrementó hacia el final del periodo de cultivo con un valor promedio para el PHBv de 3.29 ± 0.25 y 4.14 ± 0.37 para el PHBb (Figura 9).

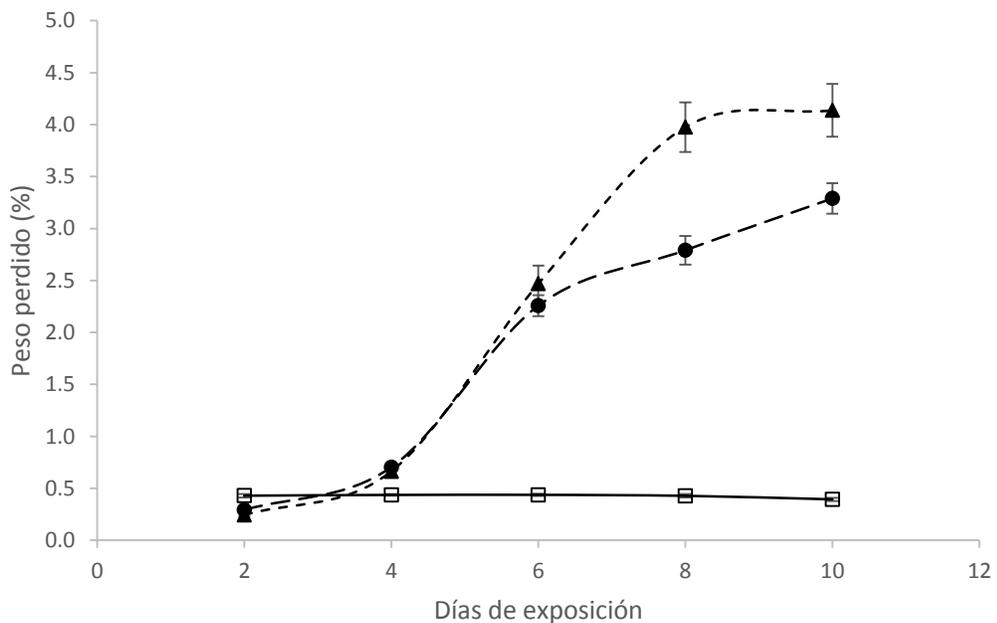


Figura 9. Porcentaje de peso perdido observado en placas de PET (□), PHBv (▲) y PHBb (●) expuestas a la biopelícula de *N. incerta*. Las barras indican promedio (n=3) ± error estándar.

3.2.3. Crecimiento de bacterias heterotróficas

El ANCOVA mostró que el tipo de plástico ($F_{(2,37)} = 26.74$, $P = 0.001$) y el día de cultivo ($F_{(1,37)} = 214.66$, $P = 0.001$) tuvieron un efecto altamente significativo en la densidad bacteriana.

La densidad bacteriana en todos los tratamientos aumentó a lo largo del tiempo. En las placas de PHBv y PHBb la cantidad de bacterias fue significativamente mayor con $\sim 10^4$ veces más bacterias respecto a la biopelícula del PET. Por otro lado, la densidad bacteriana fluctuó de manera similar para el PHBv y PHBb, por lo que no hubo diferencias estadísticas entre ellos. Cabe señalar que, el número de bacterias inicial mostró valores promedio superiores a 2×10^{11} UFC cm^{-2} . En los días subsiguientes se registró un incremento continuo hasta alcanzar densidades promedio de entre 4 y 5×10^{16} UFC cm^{-2} (Figura 9). Por su parte, la concentración de bacterias heterótrofas en el PET registró una densidad inicial promedio de 2×10^7 UFC cm^{-2} y finalizó con 5×10^{11} UFC cm^{-2} (Figura 10).

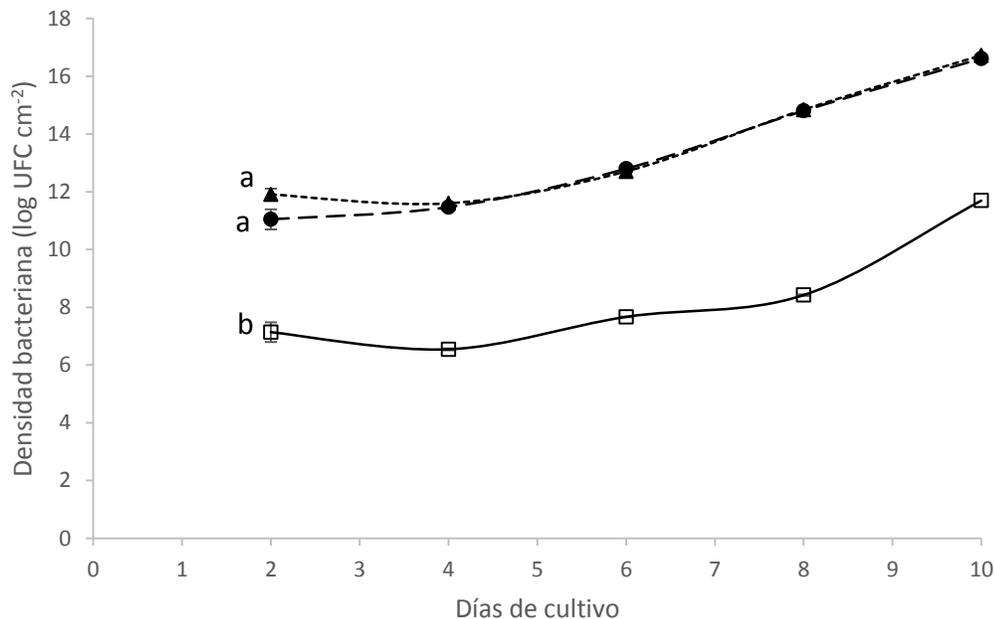


Figura 10. Bacterias heterotróficas (log UFC cm^{-2}) de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET (□), PHBv (▲) y PHBb (●). Las barras denotan promedio ($n=3$) \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas (ANCOVA, $P < 0.05$).

3.2.3.1. Crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*

A pesar de haber realizado cultivos bacterianos en TCBS, medio específico para el desarrollo de bacterias tipo *Vibrio*, no fue posible evaluar el contenido bacteriano durante los días 2, 4 y 6 del cultivo, debido a que las diluciones que se realizaron no fueron adecuadas para llevar a cabo el recuento celular, por lo que la densidad bacteriana en estos días fue incontable (INC), es decir el crecimiento bacteriano fue excesivo para poder cuantificarlo (>300 UFC recomendado para conteos confiables). Sin embargo, en los días 8 y 10 se obtuvieron conteos apropiados por lo que fue posible estimar el crecimiento. El ANOVA no mostró diferencias en la densidad de bacterias tipo *Vibrio* tanto en los conteos del día 8 ($F_{(2,6)} = 0.37$, $P = 0.705$) como para el día 10 ($F_{(2,6)} = 0.77$, $P = 0.504$). El PHBv registró valores promedio de 21.20 UFC cm⁻², mientras que para el siguiente día de muestreo se registraron 1.60 UFC cm⁻². La densidad bacteriana promedio en el PHBb fue de 7.20 UFC cm⁻² y al décimo día registró 0.60 UFC cm⁻². En contraste, la densidad de bacterias tipo *Vibrio* en la biopelícula del PET presentó los mismos valores para ambos días con 0.80 UFC cm⁻² (Tabla 9).

Tabla 9. Valores promedio (n=3) del crecimiento de bacterias tipo *Vibrio* (UFC cm⁻²) en la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.

Días de cultivo	PET	PHBv	PHBb
2	INC	INC	INC
4	INC	INC	INC
6	INC	INC	INC
8	0.80 (0.53)	21.20 (19.40)	7.20 (0.35)
10	0.80 (0.80)	1.60 (1.06)	0.60 (0.35)

INC (UFC incontables)

3.2.4. Análisis de la biopelícula mediante citometría de flujo

En las figuras 11, 12 y 13, se muestra el análisis en citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta* formada en los plásticos PET, PHBv y PHBb, respectivamente. Como se mencionó anteriormente se determinaron dos ventanas de análisis, la primer ventana agrupa células de *N. incerta*, mientras que la segunda células bacterianas. Por otro lado, la distribución de la biopelícula presentó cambios entre los días de cultivo, con ello se modificó la intensidad de fluorescencia en el filtro BL3, lo que indica un incremento en la cantidad de células registradas. Los cambios más claros se presentaron hacia el final del periodo de cultivo, donde además las bacterias se agruparon de forma definida. La distribución de la biopelícula del PHBv y PHBb, mostraron cambios más evidentes que la biopelícula del PET, sobre todo en los últimos tres días de cultivo (Figura 11, 12 y 13).

Se realizó un análisis cuantitativo del número de eventos registrados como células de *N. incerta* y bacterias (Tabla 10). El ANCOVA para el número de células registradas como *N. incerta*, no mostró diferencias significativas ($F_{(2,37)}= 2.94$; $P= 0.065$) cuando se hicieron las comparaciones entre los plásticos, por lo que el tipo de plástico no tuvo efecto sobre el crecimiento de *N. incerta* debido posiblemente a la variabilidad observada durante toda la fase de cultivo. En contraste, la pendiente presentó diferencias altamente significativas ($F_{(1,37)}= 2.94$; $P= 0.000$) al considerar los días de cultivo, por lo que el tiempo influyó en la densidad celular de *N. incerta*. Finalmente, el análisis no mostró interacción entre los factores ($F_{(2,37)}= 0.245$; $P= 0.784$).

El ANCOVA para el número de bacterias mostró que el tipo de plástico no tuvo efecto ($F_{(2,37)}= 1.77$, $P= 0.184$) sobre esta variable al considerar todo el ciclo de cultivo. Para el día de cultivo se presentaron diferencias altamente significativas ($F_{(1,37)}= 44.07$, $P=0.000$), lo que indica que el tiempo influyó en el contenido bacteriano de la biopelícula. A su vez, el análisis mostró la interacción entre ambos factores con diferencias significativas ($F_{(2,37)}= 4.42$, $P=0.019$).

La proporción de *N. incerta* y bacterias fue diferente a lo largo del cultivo en los tres tratamientos. El PET registró el menor número de células bacterianas a lo largo de todo el periodo de cultivo con un intervalo del 13.89 al 19.99% del total de las células, mientras que las células de *N. incerta* se localizaron entre el 80.01 y 86.11%. Cabe señalar que el máximo número de células se registró al octavo día de cultivo con un valor promedio de *N. incerta* de $18,748 \pm 513$ células cm^{-2} (85.34%) y de células bacterianas de $3,243 \pm 637$ células cm^{-2} (14.66%). Respecto a la biopelícula de las placas de PHBv y PHBb, la tendencia en el número de células fue similar. El porcentaje máximo de células correspondientes a *N. incerta* se registró al segundo día de cultivo con un valor promedio del 93.35%. Durante todo el cultivo la cantidad de bacterias incrementó, sobre todo en los tres últimos días de cultivo, con valores entre el 32.39 y 41.28%. El porcentaje de *N. incerta* decreció alcanzando una proporción mínima del 58.75%; sin embargo, la cantidad de células fue mayor comparada con la registrada en el PET. El mayor número de células registradas se presentaron en la biopelícula del PHBb donde en promedio fue de $58,828 \pm 12,773$ células cm^{-2} (67.61%) para *N. incerta* y de $28,531 \pm 6,539$ células cm^{-2} (32.39%) para bacterias (Tabla 10).

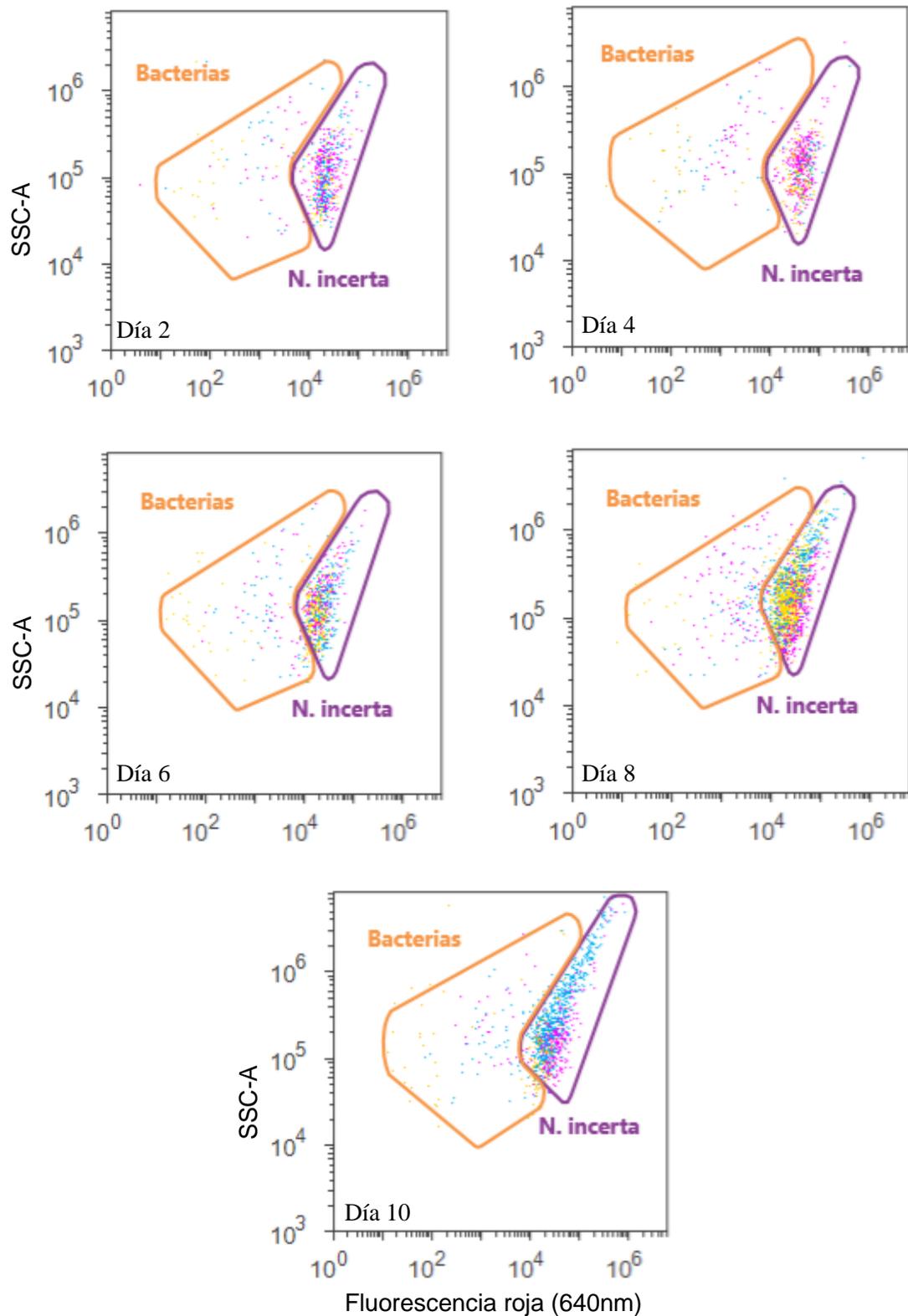


Figura 11. Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda $>640\text{nm}$. Región morada agrupa a *N. incerta* y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes ($n=3$).

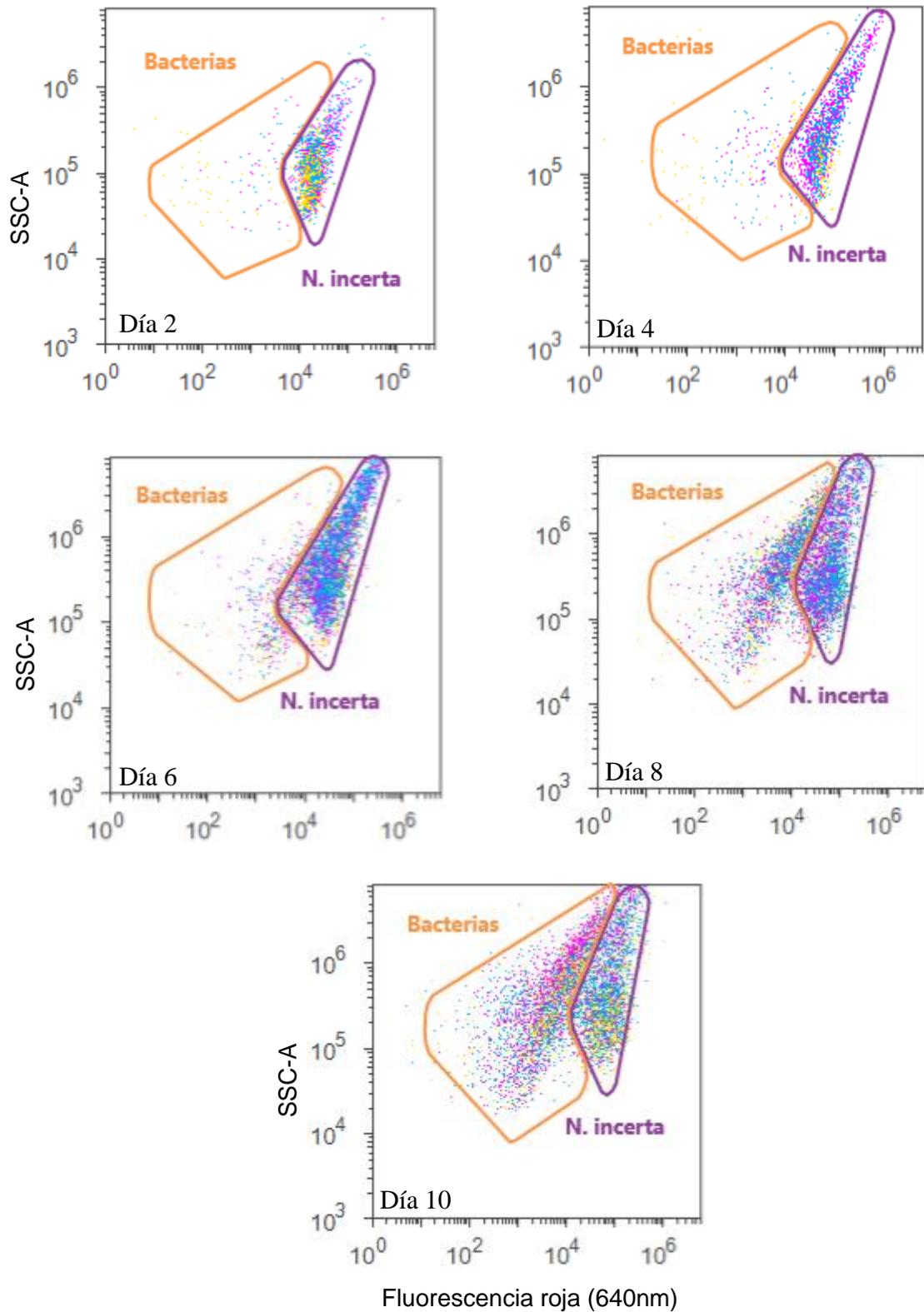


Figura 12. Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PHBv. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda $>640\text{nm}$. Región morada agrupa a *N. incerta* y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes ($n=3$).

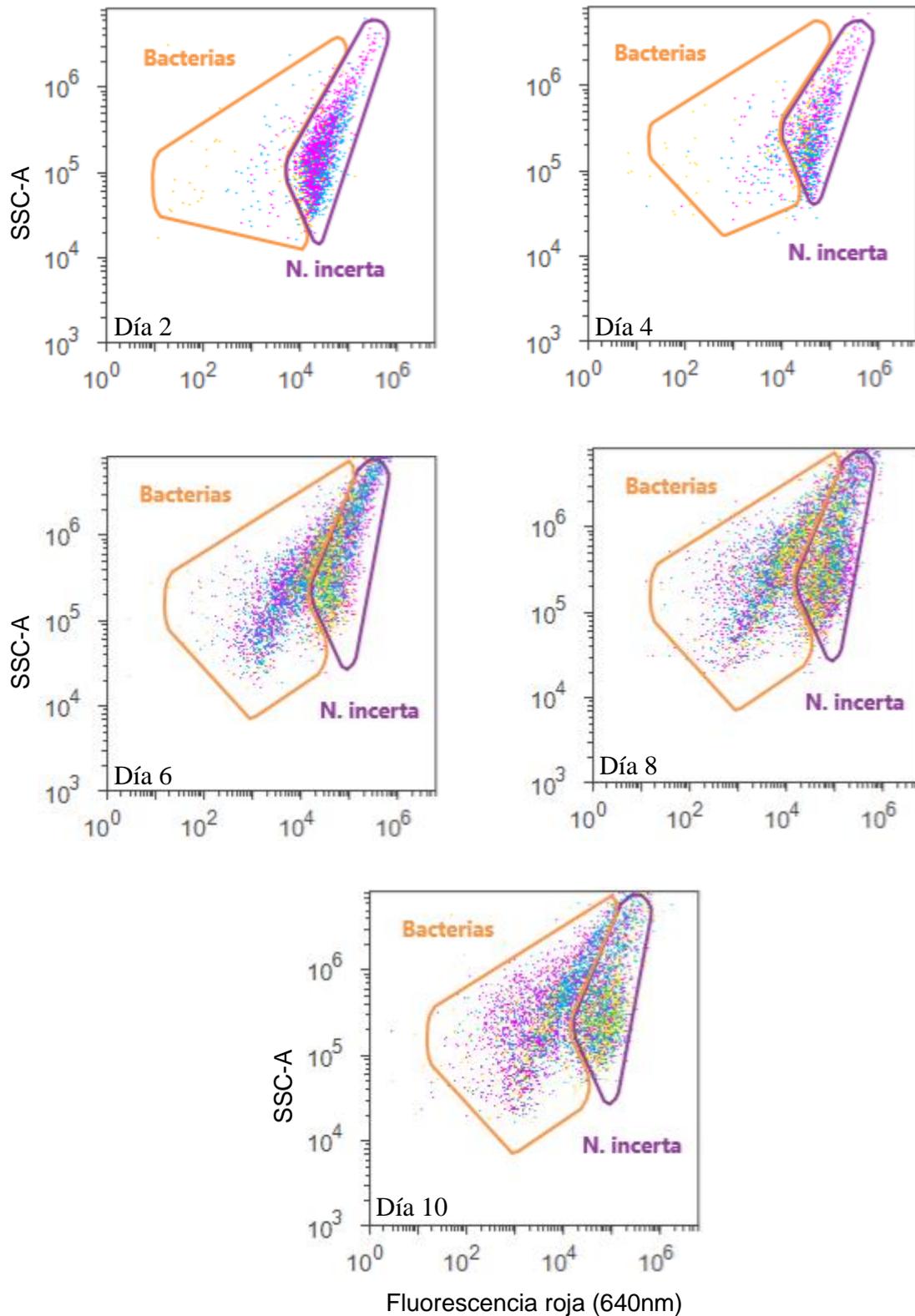


Figura 13. Análisis de citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PHBb. Eje vertical representa la complejidad relativa (SSC) y el eje horizontal indica la autofluorescencia detectada a una longitud de onda $>640\text{nm}$. Región morada agrupa a *N. incerta* y la región naranja a bacterias. Número de días representan los días de cultivo. Los colores de los puntos indican muestras diferentes ($n=3$).

Tabla 10. Número de células (cm⁻²) y porcentaje promedio (n=3) de *N. incerta* y bacterias registradas por citometría flujo en placas de PET, PHBv y PHBb. Valores entre paréntesis indican \pm error estándar.

Días de cultivo	<i>N. incerta</i>			Bacterias		
	# células cm ⁻²		%	# células cm ⁻²		%
PET						
2	2,038	(568)	80.01	490	(100)	19.99
4	5,694	(1,965)	80.43	1,086	(253)	19.57
6	8,205	(723)	86.11	1,305	(167)	13.89
8	18,748	(513)	85.34	3,243	(637)	14.66
10	11,269	(4,547)	83.55	1,945	(399)	16.45
PHBv						
2	7,313	(1,503)	92.95	506	(35)	7.05
4	19,314	(9,032)	81.63	2,577	(462)	18.37
6	44,729	(6,673)	80.36	10,796	(1,213)	19.64
8	44,369	(9,133)	61.37	26,787	(2,997)	38.63
10	42,211	(10,459)	58.75	30,822	(9,709)	41.25
PHBb						
2	10,243	(3,134)	93.35	762	(265)	6.65
4	13,267	(4,717)	84.23	2,537	(938)	15.77
6	41,851	(7,252)	67.13	23,816	(8,953)	32.87
8	58,828	(12,773)	67.61	28,531	(6,539)	32.39
10	38,941	(7,114)	58.72	28,998	(8,978)	41.28

3.2.5. Caracterización molecular bacteriana de la biopelícula de *N. incerta*

Se llevó a cabo la caracterización molecular de 17 colonias bacterianas del cultivo en matraz de *N. incerta* y de la biopelícula formada en placas de PET, PHBv y PHBb en los días de muestreo 2 y 8. También se identificó una colonia bacteriana del cultivo de *N. incerta* utilizado como inóculo y denominada como “Nav inóculo día 0”. Las secuencias de cada colonia bacteriana se obtuvieron al amplificar y secuenciar la región variable V₇-V₉ del gen 16S rDNA. Los productos de PCR para cada colonia mostraron un tamaño aproximado de 350 a 400 pb. Las secuencias se limpiaron y fueron analizadas con BLAST en la base de datos del NCBI (Anexo 9). Este análisis permitió identificar a la mayoría de las bacterias secuenciadas hasta nivel de especie. Del total de 17 bacterias analizadas, solo tres (17.64%) no se identificaron hasta especie (Anexo 9)

La colonia bacteriana de la muestra “Nav inóculo día 0” fue clasificada como *Bacillus hirokoshii*, perteneciente a la familia Bacillaceae de la clase Bacilli (Tabla 11).

En la diversidad de especies en el cultivo de *N. incerta* a nivel matraz se pudieron identificar dos clases de bacterias. Estas fueron reconocidas como Bacilli, con la mayor frecuencia registrada y Gammaproteobacterias. El número de familias fue igual al número de clases, donde la familia con mayor recurrencia (75%) fue clasificada como Bacillaceae, mientras que el 25% restante estuvo integrado por la familia Alteromonadaceae. La diversidad en género y especie siguió el mismo patrón, ya que al segundo día de cultivo se identificaron *Bacillus* spp. y *Alteromonas macleodii*; mientras que al octavo día solamente se logró registrar a la bacteria *Bacillus marisflavi*, microorganismo presente en las dos UFC aisladas para ese día de cultivo (Tabla 10 y Figura 13). Cabe mencionar que, la bacteria *Bacillus* spp. pueda estar relacionada con las especies *B. pumilus* y *B. subtilis*, debido a que la secuencia analizada en la base de datos del NCBI presentó la misma similitud (100% de cobertura, 99% identidad y 7×10^{-177} valor E) en ambas especies (Anexo 9).

La diversidad de especies en la biopelícula de todos los plásticos se redujo a la identificación de al menos dos clases bacterianas. La primera clase con el mayor número

de representantes, fue identificada como Gammaproteobacterias; mientras que el segundo grupo fue clasificado como Proteobacterias. A nivel de familia, se observó una mayor diversidad, con cinco representantes. Se pudieron identificar familias como Alteromonadaceae, Pseudomonadaceae, Hahellaceae y Rhodobacteraceae. La frecuencia de las familias encontradas en la biopelícula formada en placas de PET fue representada en su mayoría (50%) por bacterias pertenecientes a Alteromonadaceae, seguido por un 25% correspondiente a la familia Pseudomonadaceae, mientras que el 25% restante pertenecen a Hahellaceae. En la biopelícula formada en el PHBv, solamente se identificaron dos familias: Alteromonadaceae con la mayor proporción (75%) y Pseudomonadaceae con un 25% de especímenes. Entre las familias encontradas en las placas de PHB, la biopelícula del PHBb, mostró la mayor diversidad con tres familias, conformadas nuevamente por Alteromonadaceae, Pseudomonadaceae y Rhodobacteraceae. A diferencia del número de bacterias por familia encontradas en el PHBv, el PHBb mostró una mayor frecuencia de especímenes pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae (50%); el 50% restante está repartido entre Alteromonadaceae y Rhodobacteraceae, con 25% para cada una (Tabla 11).

La biopelícula del PHBb mostró la mayor variedad de especies, con representantes para el segundo día de cultivo como *Sulfitobacter marinus* y *Alteromonas macleodii*. Al octavo día de cultivo se encontraron las bacterias *Pseudomonas fulva* y *Pseudomonas pachastrellae*. La biopelícula del plástico que mostró un nivel medio de biodiversidad bacteriana fue el PET, para el que fueron identificadas las bacterias *Hahella chejuensis*, *Alteromonas macleodii* y *Pseudomonas* sp. *A. macleodii* se encontró en los días de cultivo, 2 y 8. Finalmente, las bacterias de la biopelícula del PHBv se acotaron a dos especies, *Alteromonas macleodii* y *Pseudomonas* sp., donde la primera se registró en los dos días muestreados; asimismo se presentó en las dos colonias aisladas del segundo día de cultivo (Tabla 11).

Las secuencias consenso e identificadas con género y/o especie fueron sujetas a un análisis por grupo (árbol genealógico). Este análisis reafirmó la identificación y clasificación de las bacterias, agrupando nuevamente a la familia Alteromonadaceae con

el mayor número de representantes, como consecuencia la especie *A. macleodii* se encontró en todos los tratamientos. La siguiente familia fue Pseudomonadaceae, donde las bacterias *Pseudomonas* spp. se identificaron en la biopelícula del PET y PHB. Mientras que las familias Hahellaceae y Rhodobacteraceae estuvieron representadas por las especies *H. chejuensis* y *S. marinus*. Estas especies solamente se encontraron en la biopelícula del PET y PHBb, respectivamente. Respecto a las bacterias identificadas tanto en el cultivo en matraz como en el inóculo fueron clasificadas dentro de la familia Bacillaceae en el género *Bacillus* spp. (Figura 14).

Tabla 10. Bacterias cultivables aisladas de la biopelícula de *N. incerta* en el inóculo (Nav0), en matraz (Nav) y en las placas PET, PHBv y PHBb. Las bacterias fueron identificadas mediante la amplificación de la región variable V₇-V₉ del gen 16S rDNA.

Tratamiento	Día de cultivo	UFC aisladas	Clasificación			Hábitat		Observaciones	Referencia
			Familia	Género	Especie	Marino	Suelo		
Nav (inóculo)	0	1	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. hirokoshii</i>	✓		Aislada de algas.	Nielsen <i>et al.</i> , 2009
Nav	2	1	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> spp.	✓	✓	Comúnmente encontrada en suelo, pero también en ambientes marinos y ríos.	Enciclopedia de la vida (EOL)
	2	2	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	López <i>et al.</i> , 2013
	8	*	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. marisflavi</i>	✓		Agua de mar y sedimentos.	Priya <i>et al.</i> , 2014
PET	2	1	Hahellaceae	<i>Hahella</i>	<i>H. chejuensis</i>	✓		Bacteria marina productora de agentes alguicidas.	Jeong <i>et al.</i> , 2005
	2	2	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	López <i>et al.</i> , 2013
	8	1	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	✓	✓	Biopelículas, bahías, canales de ríos, pantanos u océanos. Asociada a humanos.	Zhou <i>et al.</i> , 2009
	8	2	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	Ivars <i>et al.</i> , 2008
PHBv	2	*	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	López <i>et al.</i> , 2013
	8	1	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	✓	✓	Biopelículas, bahías, canales de ríos, pantanos u océanos. Asociada a humanos.	Zhou <i>et al.</i> , 2009
	8	2	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	López <i>et al.</i> , 2013

* Bacteria presente en las dos UFC aisladas.

Tabla 10. (Continuación)

Tratamiento	Día de cultivo	UFC aisladas	Clasificación			Hábitat		Otros	Referencia
			Familia	Género	Especie	Marino	Suelo		
PHBb	2	1	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i>	<i>S. marinus</i>	✓		Aislada de muestras de agua de mar.	Yoon <i>et al.</i> , 2007
	2	2	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	✓		Bioma marino. Sinónimo <i>Pseudoalteromonas macleodii</i>	Ivars <i>et al.</i> , 2008
	8	1	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fulva</i>	✓	✓	Asociada principalmente a fuentes terrestres. En el ambiente marino aislada de un molusco bivalvo (<i>Anadara broughtonii</i>)	Romanenko <i>et al.</i> , 2008
	8	2	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. pachastrellae</i>	✓		Bioma marino. Aislada de una esponja.	Yuan <i>et al.</i> , 2008

* Bacteria presente en las dos UFC aisladas.

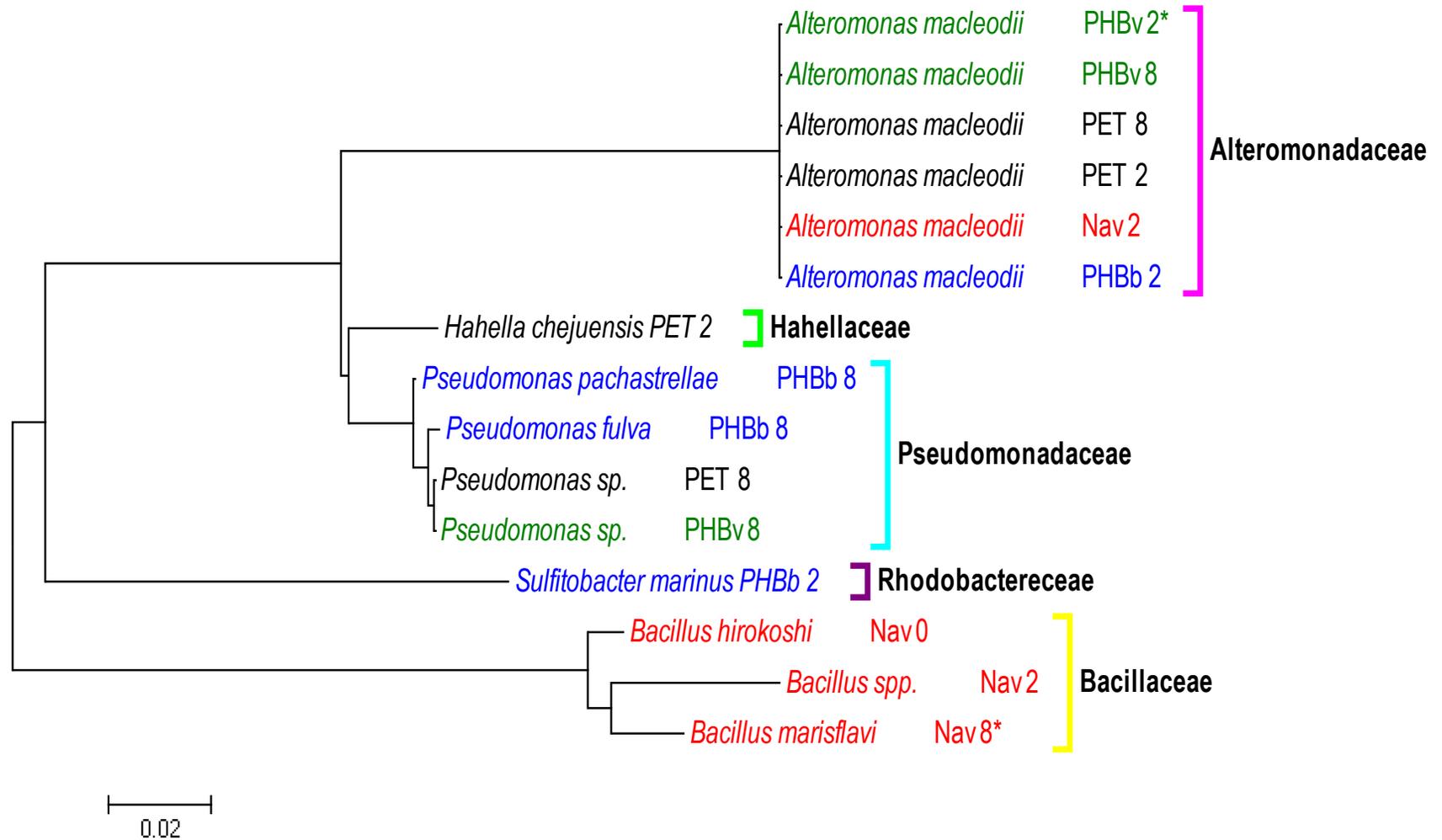


Figura 14. Clasificación de las bacterias cultivables aisladas de la biopelícula de *N. incerta* en el inóculo (Nav 0), en matraz (Nav) y en las placas PET, PHBv y PHBb. La caracterización se basó en la secuenciación de la región variable V₇-V₉ del gen 16S rDNA. * Bacteria presente en las dos UFC aisladas.

4. Discusión

4.1 Dinámica de crecimiento de *N. incerta* cultivada en matraz Fernbach y sobre los polímeros

Las diatomeas bentónicas son la principal fuente de alimento para postlarvas ($> 800 \mu\text{m}$ de longitud de concha) y juveniles tempranos de abulón (Kawamura *et al.*, 1995). En estas primeras etapas de desarrollo, los organismos requieren diatomeas de alta calidad que proporcionen una nutrición adecuada para el crecimiento y supervivencia (Wang *et al.* 1997, Daume y Ryan 2004). Diversos estudios se han centrado en la busca de especies de diatomeas que cumplan con los requerimientos nutricionales. *N. incerta*, es una especie de diatomea bentónica que es utilizada como alimento para los abulones cultivados en granjas y laboratorios de producción en países como México y Chile. No obstante, las condiciones de cultivo pueden afectar su valor nutricional, así como la producción de biomasa y composición bioquímica y por tanto su valor como alimento (Brown, 2002; Courtois de Viçose *et al.*, 2012a).

La tasa específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial de *N. incerta* en todos los tratamientos realizados en este trabajo fue de entre 1.44 y 1.91 divisiones día⁻¹. Estos valores se encuentran en el intervalo de μ reportado por otros autores. En cultivos de *N. incerta* a nivel matraz y en recipientes de 18 L se encontró un valor de μ entre 1.45 y 1.81 divisiones día⁻¹ (Simental-Trinidad, 1999 y Carbajal-Miranda, 2002). A pesar de que la intensidad lumínica utilizada en este estudio fue baja ($14.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las tasas de crecimiento encontradas para *N. incerta* fueron comparables a las tasas obtenidas en cultivos de microalgas que utilizaron entre 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La iluminación proporcionada en el cultivo de abulón puede modificar la dependencia entre el crecimiento de postlarvas y juveniles y el desarrollo de biopelículas de diatomeas como *N. incerta* (Gorrostieta-Hurtado *et al.*, 2009). En este sentido y ya que la intensidad lumínica no afectó la tasa específica de crecimiento de *N. incerta* es posible utilizarla tanto en el desarrollo de biopelículas como en el cultivo de abulón. Searcy *et al.* (2003)

indican que es posible utilizar irradiancias bajas de entre 6 y 47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el cultivo de postlarvas de abulón alimentadas con *N. incerta*, siempre y cuando se cuente con sistemas de cultivo microalgales eficientes que proporcionen el inóculo suficiente y con la frecuencia necesaria a los tanques de cultivo. Estudios con diferentes especies de abulón alimentados con *N. incerta* han encontrado que, bajo condiciones de baja intensidad de luz, se incrementa el crecimiento de postlarvas y juveniles tempranos de abulón (Huchett, 2003; Searcy *et al.*, 2003; Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal, 2004; Searcy-Bernal y Gorrostieta-Hurtado, 2007). Asimismo, Roberts *et al.* (2000) señalan que en el cultivo de abulón se necesitan niveles de iluminación moderados para evitar que las microalgas se traslapen y con ello mantener una película de diatomeas joven y saludable que favorezca el crecimiento de las mismas.

Al evaluar la dinámica de crecimiento de *N. incerta* cultivada sobre placas de PET, PHBv y PHBb y a nivel matraz, no fue posible observar en ninguno de los tratamientos la fase de adaptación (o “lag”). Una de las razones por la que no se pudo identificar esta fase fue la metodología de muestreo, la cual comenzó hasta el segundo día de cultivo donde es probable que la fase de adaptación haya concluido. El otro motivo se debe a que el inóculo utilizado se encontraba en una fase de desarrollo exponencial tardío, lo que no favoreció que los cultivos pasaran por la fase inicial (Lee *et al.*, 2013). De esta manera, la primera fase que se pudo diferenciar fue la fase exponencial desde el día 0 al día 2 de cultivo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Simental-Trinidad (1999) y Courtois de Viçose *et al.* (2012a). Ambos autores evalúan el crecimiento de *N. incerta* y refieren que esta especie presentó tasas de crecimiento exponencial entre el segundo y tercer día de cultivo. A diferencia de los cultivos de *N. incerta* sobre las placas, en el cultivo en matraz el crecimiento de *N. incerta* a través del tiempo fue exponencial desde el día 0 hasta el día 4 de cultivo. Esta tendencia, también se ha encontrado en cultivos de las diatomeas de los géneros *Nitzschia*, *Amphora*, *Navicula* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, en donde la fase exponencial finalizó entre el cuarto y quinto día de cultivo (Flores-Vergara, 1998; Carbajal-Miranda, 2002; Chávez-Medrano, 2008).

En el presente estudio la última fase de crecimiento que se observó fue la fase estacionaria. En los cultivos desarrollados sobre los polímeros, la fase estacionaria se presentó a partir del cuarto día y hasta finalizar el cultivo, mientras que en el cultivo en matraz se observó al sexto día. A pesar de que, no fue posible realizar un análisis estadístico entre el cultivo de *N. incerta* en matraz y los cultivos en placa, la densidad celular en todo el periodo de cultivo fue mayor en el cultivo en matraz comparado con los cultivos en PET, PHBv y PHBb. Es posible que las diferencias en el crecimiento se deban a la cantidad de bacterias presentes en los cultivos. El agua del cultivo en placas no estuvo libre de bacterias, por lo que estos cultivos mostraron una concentración mayor de la comunidad bacteriana comparado con el matraz. Existen evidencias de la relación entre bacterias y microalgas, las cuales van desde simbióticas vía comensalismos hasta inclusive interacciones como antagonismo, competencia o parasitismo (Olafsen, 2001; Schäfer *et al.*, 2002). Este tipo de interacciones se llevan a cabo en la “ficósfera”, zona en la que interactúan bacterias y microalgas en forma inhibitoria o estimulante debido a la liberación de compuestos extracelulares como vitaminas (Hianes y Guillard, 1974) y factores que promueven o inhiben el crecimiento (Rivas y Riquelme, 2012).

Al evaluar el promedio global de la densidad celular en 10 días de cultivo, no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos en PET, PHBv y PHBb; aunque se observó que la densidad celular de *N. incerta* en el PHB aumentó en los últimos días de cultivo. No obstante, se debe considerar que para el PET, la cuantificación celular se realizó solamente sobre una cara de la placa. El PET, al ser un material transparente y acanalado, permitió que *N. incerta* creciera sobre ambas caras de la placa, mientras que en las placas de PHB solo creció en la cara expuesta a la luz. Por otro lado, considerando que el crecimiento de los abulones depende de la cantidad de alimento suministrado (Gorrostieta *et al.*, 2009), es posible que la biomasa producida en el PHB pueda soportar altas tasas de pastoreo por parte de postlarvas y juveniles de abulón. Por ejemplo, la densidad celular en las placas de PHB fue mayor en una proporción del 30% respecto al PET al segundo día de cultivo, con una densidad promedio equivalente a 4700 cél mm^{-2} en la fase exponencial del crecimiento de *N. incerta*. Esta densidad celular podría ser utilizada para el pastoreo de abulones mayores a 1.5 mm de longitud de concha o con una edad mayor a los 30 días después de la metamorfosis. Searcy *et al.* (2001), al evaluar

el efecto de la densidad de la biopelícula en la tasa de pastoreo y crecimiento en postlarvas de *H. fulgens*, determinaron que el suministro de 4000 cél mm⁻² no es suficiente para alcanzar una tasa de pastoreo máxima en organismos de 30 a 60 días después de la metamorfosis, es decir, cuando los organismos tienen una talla de 1.5 a 2.0 mm y empieza a formarse el primer poro respiratorio. Por lo tanto, la densidad celular encontrada en el PHB podría soportar la actividad de pastoreo cuando los abulones incrementan su alimentación o cuando su tamaño corporal así lo requiera (Marsden y Williams, 1996; Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998).

4.1.1 Composición proximal

La mayoría de las investigaciones sobre la alimentación del abulón con diatomeas bentónicas se basa en determinar su composición proximal como un indicador de la calidad nutricional sin tomar en cuenta el contenido bacteriano o bien la composición total de la biopelícula formada por diatomeas y bacterias. Esto se debe a que el porcentaje de biomasa bacteriana es muy baja, alrededor del 1%, por lo tanto su contribución no es significativa. En el presente trabajo al evaluar la composición proximal de la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PET, PHBv y PHBb, y en el cultivo en matraz al sexto día de cultivo, se observó que el contenido orgánico es menor a la proporción inorgánica en todos los tratamientos. El peso seco total (PST) es mayor en el cultivo en matraz que en la biopelícula de los cultivos en placas. Esta diferencia se debe a una mayor densidad celular presente en el matraz a diferencia de las placas, esto a pesar de que la biopelícula se colectó en el mismo día de cultivo donde se presentó una diferencia de al menos 60%. Debido a que el PST está conformado por el peso seco orgánico (PSO) e inorgánico (PSI), en ambas fracciones mostraron la misma tendencia.

El análisis estadístico entre los cultivos en placa indicó diferencias significativas por efecto del tipo de plástico. Los datos de PSO mostraron una mayor cantidad de materia orgánica en la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PHBb que la biopelícula del cultivo en placas de PET. Debido a que la cantidad de materia orgánica está relacionada con su composición y contenido energético, una mayor cantidad de

nutrientes en la biopelícula de los polímeros pueden ser incorporados por postlarvas y/o juveniles de abulón. El PSO obtenido en este trabajo para todos los tratamientos (matraz y placas), con un porcentaje relativo de 25 al 42%, fue menor a lo reportado por Carbajal-Miranda (2002), quien obtuvo un porcentaje promedio de entre 46 al 68%, en cultivos de *N. incerta* en recipientes plásticos de 18 L con una intensidad de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en el presente estudio se utilizó una irradiancia de $14.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el cultivo en matraz, el cambio en la intensidad de luz pudo modificar el metabolismo de las microalgas hacia una menor síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos; los cuales conforman la fracción orgánica de la diatomea (Lebeau y Robert, 2003), por consiguiente una menor proporción de PSO.

Las diatomeas contiene altos porcentajes de cenizas evaluados mediante el PSI, aportados principalmente por el sílice de la pared celular de la microalga. En este trabajo se obtuvieron porcentajes relativos del 58 al 75%, en todos los tratamientos. Estos porcentajes son mayores a los mencionados por Simental-Trinidad (1999) y Carbajal-Miranda (2002), quienes describen para *N. incerta* en la fase estacionaria del cultivo valores promedio del 30 al 45%. En los cultivos en placa, el PSI mostró diferencias significativas entre los polímeros, en consecuencia la cantidad de materia inorgánica se comportó de la siguiente manera: PHBb y PHBv > PET. Esta diferencia podría explicarse a partir de la aportación de las bacterias, ya que el contenido de UFC cm^{-2} entre los PHB y el PET fue desigual. Brown *et al.* (1996) indican que el contenido de cenizas depende de la especie bacteriana, a pesar de ello el porcentaje promedio de cenizas es del 20%.

4.1.2 Proteínas, Carbohidratos y Lípidos

La calidad de las microalgas empleadas para alimentar a organismos acuáticos como moluscos se encuentra estrechamente relacionada con la composición bioquímica de las mismas, con su digestibilidad y asimilación. A su vez, la composición bioquímica de los cultivos microalgales depende de la especie utilizada, de la técnica del cultivo seleccionada, de la fase de crecimiento y de las condiciones ambientales del laboratorio o granja, las cuales suelen varían ampliamente (Richmond, 1986a y b).

En estudios relacionados con la alimentación del abulón se reporta el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de las diatomeas como porcentaje con base al peso seco (Carbajal-Miranda, 2002; Simental-Trinidad *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2006; Chávez-Medrano, 2008; Correa-Reyes *et al.*, 2009; Courtois de Viçose *et al.*, 2012a). En este estudio se evaluó la composición proximal de la biopelícula como $\mu\text{g cm}^{-2}$ y se obtuvo el valor porcentual. Por lo tanto, en este trabajo, se obtuvieron porcentajes relativos de proteínas del 11 al 58%, carbohidratos del 4 al 29% y lípidos del 14 al 25%, todas las fracciones orgánicas fueron evaluadas en la fase exponencial del cultivo. Estos valores difieren de los reportados por Simental-Trinidad *et al.* (2004), quienes señalan que el contenido de proteína de diatomeas bentónicas como *Navicula* spp., varía de acuerdo a la edad y condiciones de cultivo entre un 20 y 30%, los carbohidratos entre un 10 y 15% y los lípidos entre un 15 y 20%.

La composición proximal de *N. incerta* cultivada en matraz presentó valores promedio de proteínas 11%, carbohidratos 4% y lípidos 25%. Esto difiere de lo obtenido por autores como Simental-Trinidad (1999), quien en su investigación indica que la composición proximal de *N. incerta* cultivada a nivel matraz en la fase exponencial de cultivo fue de 14.75% de proteínas, 18.36% de carbohidratos y 15.08% de lípidos. No obstante, el porcentaje encontrado para cada una de las fracciones orgánicas en este trabajo se encuentran dentro del intervalo reportado por Flores-Vergara (1998) para diversas diatomeas: proteínas (11 al 69.3%), carbohidratos (2 al 40.0%) y lípidos (1.8 al 45.0%).

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos en la biopelícula de *N. incerta* formada en PHB (verde y blanco) es mayor que la evaluada en las placas de PET. Esta diferencia podría deberse a la presencia de esqueletos de carbono como una porción adicional aportado por la secreción de productos que se generan del metabolismo, específicamente del catabolismo de la materia orgánica mediante respiración celular para obtener energía bioquímica, de bacterias heterotróficas presentes en mayor proporción en la biopelícula del PHB. El carbono fijado mediante fotosíntesis es utilizado en la síntesis de diferentes biomoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos (Negoro *et al.*, 1991; Barajas-Solano *et al.*, 2012). Además del carbono aportado por las

bacterias, éstas pudieron llevar acabo la remineralización de los compuestos orgánicos excretados por las células algales y proveer de nutrimentos asimilables necesarios para la síntesis de biomoléculas. Se ha determinado que durante el crecimiento lento o fase estacionaria en cultivos microalgales la tasa de excreción de materia orgánica (aminoácidos y péptidos) es mayor (Nalewajko *et al.*, 1976). Cabe señalar, que en el presente trabajo los cultivos de la biopelícula de *N. incerta* sobre las placas se encontraban en la fase de crecimiento estacionario después del segundo y hasta el último día de cultivo, por lo que es posible que las bacterias heterótrofas hayan modificado la composición de estas sustancias rápidamente para posteriormente ser reasimiladas por las diatomeas.

El contenido de proteínas en la biopelícula del PHB presentó diferencias altamente significativas respecto a la biopelícula del PET. El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica son las proteínas (Arredondo y Voltolina, 2007). Sin embargo y ya que el cultivo se encontraba en una fase de crecimiento estacionario al momento del análisis proximal, se esperaba que el contenido proteico fuese menor. Myklestad (1974) menciona que en la fase de crecimiento estacionario, la producción de proteína disminuye debido al agotamiento de nutrientes en el medio. A pesar de ello, la cantidad de proteína en la biopelícula del PHB se encontró en una proporción relativa del 49 y 58%. Estos resultados no son consistentes con los reportados por Rojo-Salazar (2002), quien al evaluar el contenido proteico de *N. incerta* como alimento para *H. rufescens*, señala que esta diatomea presenta entre el 28-36% durante la fase estacionaria; mientras que Courtois de Viçose *et al.* (2012a) refieren que *N. incerta* en la fase estacionaria presenta 13% de proteínas en base al peso seco. Es posible que los altos porcentajes de proteína del presente estudio se deban a la aportación de altas concentraciones de bacterias heterótrofas asociadas a la biopelícula. El contenido proteico de la biopelícula formada sobre placas de PET y cultivada bajo las mismas condiciones, fue particularmente menor, con 21%; así como la biomasa bacteriana. Lo que indica que hubo una contribución de las bacterias a la fracción proteica de la biopelícula del PHB. La cantidad de proteína presente en la biopelícula del PHB puede ser favorable para el crecimiento de abulones en cultivo, dado que los requerimientos de este organismo se localiza alrededor del 40% (Viana, 2005); valor presentado en la

biopelícula del PHB (49 y 58%). Por lo que se recomienda llevar a cabo el perfil de aminoácidos esenciales de la biopelícula de *N. incerta* formada en las placas de los biopolímeros probados, puesto que las bacterias podrían aportar todos los aminoácidos específicos (Brown *et al.*, 1996) que se han identificado como indispensables en *Halietis rufescens* y que son necesarios para llevar a cabo procesos osmorreguladores (Campbell y Bishop, 1970), el metabolismo energético, entre otras funciones fisiológicas y la propia síntesis proteica (Gäde y Grieshaber, 1986).

La concentración de carbohidratos así como otros metabolitos pueden ser modificados según las condiciones ambientales y/o el estado fisiológico de la microalga (Darley, 1977). Es así que, diversos autores han señalado que el nivel de carbohidratos en *N. incerta* pueden variar entre 10% y 15% (Carbajal-Miranda, 2002; Simental-Trinidad *et al.*, 2004) y en la fase estacionaria se ha reportado un 20% (Courtois de Viçose *et al.*, 2012a). Asimismo, Granum *et al.* (2002) indican que el porcentaje de este metabolito tiende a aumentar en condiciones de limitación por nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento, donde los carbohidratos y lípidos incrementan en relación con las proteínas cuando el crecimiento cambia de fase exponencial a estacionaria. En el presente trabajo, al evaluar el contenido de carbohidratos de la biopelícula de *N. incerta* en la fase de crecimiento estacionaria, se encontró que el nivel de carbohidratos fue menor respecto a la cantidad de proteínas. A pesar de ello, el contenido relativo de carbohidratos en el PET (7%) se mantuvo dentro de lo encontrado por otros autores (Simental-Trinidad, 1999; Carbajal-Miranda, 2002). Dado que, los carbohidratos en la biopelícula del PHB (25 y 29%) presentaron diferencias altamente significativas respecto al PET (7%) es posible que las bacterias hayan contribuido al aumento de esta fracción mediante tres vías. La primera de ellas como parte de la remineralización de la materia orgánica por bacterias heterótrofas y la consecuente asimilación y producción del metabolito por parte de la diatomea. La segunda está relacionada con el aporte directo de las bacterias sumando el contenido de carbohidratos que representa entre el 2.5 y 11% (Brown *et al.*, 1996). Finalmente, la tercera vía consiste en un incremento de carbohidratos debido a que son un componente abundante en el condicionamiento de biopelículas (Jain y Bhosle, 2009). Estos carbohidratos provienen de las sustancias exopoliméricas excretadas por las diatomeas para el desarrollo y adhesión de la

biopelícula formada además por bacterias (Yallop *et al.*, 2000; Pierre *et al.*, 2012). El aumento en el contenido de carbohidratos en la biopelícula del PHB puede ser una vía de incorporación de nutrientes a la dieta de los abulones en cultivo, ya que el porcentaje relativo encontrado en el presente estudio (aprox. 27%) se localiza dentro del intervalo necesario para la dieta de juveniles de abulón y otros moluscos así como crustáceos (5 y 30%) (Brown *et al.*, 1989; Mercer *et al.*, 1993). Por ejemplo, Parker *et al.* (2007) consideran que altos niveles de carbohidratos (>25% de la composición proximal de diatomeas) mejoran el crecimiento de juveniles de abulón. Aunado a esto y a pesar de que se sabe poco acerca del metabolismo de los carbohidratos en los gasterópodos (Livingston y de Zwaan, 1993), estos constituyen una fuente importante de energía (Viana, 2000). Además, al ser herbívoros pueden degradar carbohidratos, en particular, el abulón presenta un sistema de enzimas capaces de hidrolizar carbohidratos provenientes de algas (Nakada y Sweeny, 1967).

El valor nutricional de las microalgas como alimento está influenciado en gran medida por la composición de sus lípidos, los cuales pueden ser modificados bajo diferentes condiciones de cultivo. Numerosos autores señalan que el contenido de lípidos en cultivos de *Navicula* spp. se encuentra entre 7 y 20%. Además indican que de manera similar a los carbohidratos, los lípidos se acumulan hacia la fase estacionaria del cultivo. En el presente trabajo, al evaluar la concentración de lípidos en la biopelícula de *N. incerta* formada sobre placas de PET, PHBv y PHBb, se encontró que el tipo de plástico tiene un efecto altamente significativo. En consecuencia, la concentración lipídica fue mayor en el PHB que en el PET. La proporción relativa del PHB (23 y 25%), es mayor de lo que reportan autores como Rojo-Salazar (2002) para *N. incerta* en una fase de crecimiento estacionaria con un valor de 16-20%. Simental-Trinidad (1999), obtiene para la misma especie y fase de cultivo una proporción de lípidos de 10-13%. La fracción de lípidos estimada en la biopelícula del PET fue de 15%, este valor es intermedio a lo señalado por Simental-Trinidad (1999) y Rojo-Salazar (2002). La diferencia entre las fracciones lipídicas obtenidas en este trabajo, al igual que en proteínas y carbohidratos, podría ser factor del aumento de bacterias heterotróficas, por lo que se proponen dos posibles escenarios de incorporación por parte de las bacterias a la fracción lipídica de la biopelícula. El primero, radica en el aporte directo de las células bacterianas a la fracción

lipídica. Brown *et al.* (1996) señalan que, a pesar de que las bacterias contienen bajas cantidades de lípidos, normalmente entre el 4 y 6% de su peso seco, podrían aportar una mínima fracción a la dieta de moluscos bivalvos. Este porcentaje pudo haber incrementado el valor de los lípidos de la biopelícula de *N. incerta* en el PHB. El segundo escenario se deriva de la mineralización de la materia orgánica disuelta transformada por bacterias heterotróficas a su parte inorgánica (CO_2 , NH_4^+ , PO_4^{3-}) y sintetizada en biomoléculas por las microalgas (Malone y Ducklow, 1990; Sundh, 1992; Nagata *et al.*, 2000). Se piensa que esta ruta pudo proveer a las microalgas de los nutrientes necesarios para la síntesis lipídica sin exceder su producción. Dado que el cultivo se encontraba en la fase de crecimiento estacionario, las diatomeas podrían haber producido una mayor cantidad de lípidos; sin embargo, no sucedió así. Tampoco por la limitación de nitrógeno y fósforo, que incrementan el contenido lipídico (Beer *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2010). Estos factores aumentan la concentración de lípidos por arriba del 30%, tal es el caso de diatomeas como *N. pelliculosa* y *Phaeodactylum tricornutum* bajo condiciones de estrés presenta un porcentaje de lípidos entre el 30 y 50% (Garibay-Hernández *et al.*, 2009). Por lo tanto, el incremento de lípidos en el presente estudio no se debió a factores de limitación de nutrientes o estrés.

Finalmente, el porcentaje relativo de lípidos totales en la biopelícula del PHB (~24%), determinado en el presente estudio, es significativamente mayor al valor requerido para el crecimiento del abulón y otros moluscos, el cual se encuentra entre 5 y 13% (Brown *et al.*, 1989; Mai *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 2006). Por lo tanto, es posible que la biopelícula de *N. incerta* formada en el PHB sea una fuente importante de lípidos en la alimentación del abulón. A su vez, las bacterias podrían aportar cierta fracción a la dieta como lo han sugerido Brown *et al.*, (1996), ya que además de las bacterias y en su mayoría las microalgas, pueden sintetizar diferentes ácidos grasos esenciales que sirven en la dieta. Diversos estudios realizados en abulón (*Haliothis* spp.), bajo condiciones de cultivo, han demostrado que el contenido y composición de lípidos desempeñan un papel esencial en su crecimiento, composición tisular y procesos fisiológicos (Durazo-Beltrán, 2014). Por su parte, *Navicula* spp. presenta una cantidad considerable de ácidos grasos polinsaturados (PUFA's, eicosapentaenoico (20:5n-3), decosahexaenoico (22:6n-3) y araquidónico (20:4n-6)) (Dunstan *et al.*, 1996). A pesar de ello, las bacterias podrían

aportar 20:5n-3 (Yazawa *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1993), esencial para la nutrición de estos organismos. Es necesario realizar estudios posteriores que analicen el perfil de ácidos grasos esenciales en la biopelícula de *N. incerta* formada en el PHB, ya que se perfila a ser usado como una posible alternativa en el cultivo de abulón.

4.1.3 Pigmentos

El contenido de Clorofila *a*, *c* y carotenos encontrados en la biopelícula de *N. incerta* fue mayor en las placas de PHB y matraz respecto al PET. La tendencia en la concentración de pigmentos, por ejemplo la Clorofila *a*, obtenida en este trabajo no está relacionada con el contenido de biomasa, ya que según Whyte (1987) la producción de este pigmento no siempre afecta el crecimiento de las microalgas debido a que el nivel de clorofila puede estar regulada por la luz o la concentración y forma química del nitrógeno. En cultivos de microalgas la concentración de Clorofila *a* y pigmentos accesorios así como la razón entre ellos, se han utilizado como un indicador de las condiciones del cultivo. De este modo, la razón carotenoides:clorofila *a* varía desde 0.26-1.2, mientras que la razón clorofila *c*:clorofila *a* no debiera exceder a 1. Estas proporciones, entre otras, son un indicador de la no limitación de nutrientes en cultivos microalgales (Round *et al.*, 1990; Schlüter *et al.*, 2000; Henriksen *et al.*, 2002). En el presente estudio la razón carotenoides:clorofila *a* se encontró un intervalo de 0.07 a 0.30; mientras que clorofila *c*:clorofila *a* fue de 0.20 y 0.50. Por lo tanto, se puede considerar que el cultivo no había llegado a una etapa de limitación de nutrientes, a pesar de que la estimación se hizo en la fase de crecimiento estacionario.

Es posible que la diferencia en la concentración de pigmentos entre la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de PHB y PET se deba al tipo de superficie utilizada. Por un lado, el PET es una superficie transparente donde una parte de la luz será absorbida y el resto atravesará la placa; mientras que el PHB al ser una superficie opaca una parte de la luz será absorbida y la otra reflejada. Esta diferencia pudo incrementar la energía captada por los pigmentos en la biopelícula de las placas de PHB. Por ejemplo, la concentración promedio de Clorofila *a* en el PHB (510.85 ng cm⁻²) fue mayor a la del PET (127.77 ng cm⁻²). Los pigmentos accesorios como la clorofila *c* en el PHB representaron

aproximadamente el 20% del total de clorofila, mientras que en el PET se encontró un 52%. La proporción de clorofila c en el PHB se encuentra dentro del intervalo reportado por Round *et al.* (1990), quienes señalan valores entre el 11 y 37%. Esto sugiere que en el cultivo en placas de PET, las microalgas tuvieron que extender el intervalo de absorción de la luz a través de los pigmentos accesorios. En cuanto a los carotenoides, estos fueron significativamente mayores en el PHB, y es posible que hayan funcionado de dos maneras: 1) como entidades estructurales dentro del complejo captador de luz y de reacción en el complejo proteína-pigmento y/o 2) como pigmento accesorio, captador de luz, transfiriendo energía a la clorofila a para excitarla (Masojídek *et al.*, 2013), sin llegar al grado de trabajar como un pigmento fotoprotector.

4.2 Pérdida de peso de los polímeros

Al analizar el porcentaje de pérdida de peso durante la formación de la película de *N. incerta* a lo largo 10 días, en placas de PET y PHB, las placas de PET no presentaron una pérdida significativa a lo largo del ensayo y el análisis gravimétrico señaló una pérdida del 0.43% del peso inicial durante todo el periodo de cultivo. Esto se debe a que el PET es un poliéster aromático diseñado para ser física y químicamente durable pero resistente a la degradación microbiana (Fujisawa *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001). Müller *et al.* (2001) indican que la razón de ser resistente a la biodegradación es la presencia de grandes anillos aromáticos cerca de enlaces tipo éster, lo que dificulta la alineación adecuada entre el sitio activo de la enzima y el éster. Por lo tanto no es posible que enzimas extracelulares generadas por microorganismos ataquen al PET.

Las placas de PHB perdieron en promedio 3.72% de su peso inicial al final del ensayo. Este porcentaje de pérdida es mayor respecto al PET (0.43%). No se realizó una comparación estadística entre los dos tipos de plástico (PET y PHB), pero si entre el PHB verde y blanco. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas por efecto del color de plástico, pero el tiempo de exposición a la biopelícula influyó en la pérdida de peso. Esto puede estar relacionado con el aumento de la población microbiana entre el cuarto y sexto día de cultivo, donde las bacterias incrementaron su número en un 50%.

Durante todo el periodo de cultivo, la comunidad microbiana aumentó en función del tiempo y ya que el PHB es un poliéster que es degradado por bacterias, el intervalo en la pérdida de peso se encontró entre 0.29% y 4.14% (inicio y final del cultivo). Hasta el momento no se encontró referencia alguna de la utilización de placas de PHB para la formación de biopelículas microalgales. A pesar de lo anterior, es posible relacionar el porcentaje de degradación en otros ambientes para comprender la tendencia de las placas a perder peso debido a factores como la comunidad microbiana y la energía del ambiente. Autores como Akmal *et al.* (2002), Tsuji y Suzuyoshi (2002a y b) y Sridewi *et al.* (2006) monitorearon la degradación y actividad microbiana en placas de PHB expuestas a un ambiente de clima tropical, agua de mar con y sin aireación y en un manglar. Los valores reportados por estos autores coinciden con el porcentaje de peso perdido estimado en este estudio. Akmal *et al.* (2002) encuentran que la película pierde menos del 5% de su peso inicial en las dos primeras semanas del estudio. También aíslan microorganismos degradadores de PHB y reportan bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., encontradas en este estudio como un componente de la biopelícula de *N. incerta*. A pesar de que estas bacterias fueron aisladas de lodos activados y lagos, son microorganismos que igualmente se encuentran en el ambiente marino. Tsuji y Suzuyoshi (2002a y b) indican que el porcentaje de degradación se encuentra entre 2.5 y 5% hasta las primeras dos semanas del ensayo. Sridewi *et al.* (2006) monitorearon la degradación y actividad microbiana de placas de PHB comercial en un manglar. Sus resultados muestran que durante la primera semana las placas perdieron aproximadamente el 5% respecto al peso inicial.

De acuerdo a la tasa de degradación semanal calculada por Akmal *et al.* (2002), la cual representa una pérdida de entre 0.8 y 2.7%; las placas utilizadas en la presente investigación podrían degradarse un 25% respecto a su peso inicial en un periodo de 9 semanas. En este contexto, se considera que es posible utilizar las placas de PHB en las primeras etapas de cría para postlarvas y juveniles tempranos de abulón. Esta etapa dura entre 3 y 4 meses dependiendo de las condiciones de cultivo. No obstante, la tasa de degradación del PHB podría representar una limitante en su utilización, ya que implicaría su remplazo en un menor tiempo con respecto a las placas de PET durante el cultivo. Por lo tanto, las interacciones que se podría dar entre los abulones, el PHB, la comunidad

microbiana, las diatomeas y factores ambientales deben ser analizadas para evaluar hasta qué momento podrían ser usadas como superficie de cultivo.

4.3 Crecimiento de bacterias heterotróficas

Diversos autores han señalado que las bacterias son parte importante de la alimentación del abulón, ya que se encuentran asociadas ecológicamente a las biopelículas de diatomeas (Kawamura y Takami, 1995; Erasmus *et al.*, 1997; Daume, 2006). En contraste, otras investigaciones proponen que las bacterias están involucradas en altas mortalidades de postlarvas y juveniles de abulón, por lo que se les consideran agentes patógenos (Anguiano-Beltrán y Searcy-Bernal, 2007).

La cuantificación bacteriana a nivel matraz se encontró en un intervalo equivalente a 1.3×10^3 y 8.4×10^7 UFC mL⁻¹, entre el inicio y décimo día del cultivo. Estos valores se localizan en el intervalo reportado por Suminto e Hirayama (1993), Anguiano-Beltrán (2007) y Molina-Cárdenas (2011). Asimismo, señalan que existe una relación entre la concentración de bacterias y el crecimiento de la diatomea. De esta forma, la cantidad de bacterias tiende a incrementarse en función del tiempo sin perjudicar de manera directa el crecimiento de *N. incerta*. Muestra de ello es que en los primeros días de cultivo las bacterias alcanzaron el nivel más bajo; seguido por un incremento y posterior disminución cuando *N. incerta* presentó la máxima densidad celular. Sumito e Hirayama (1993), sugiere la existencia de una interacción “cerrada” entre el crecimiento de las diatomeas y la población bacteriana. Fukima *et al.* (1991) indican que las bacterias pueden influir significativamente en el desarrollo y disminución microalgal y que este comportamiento es recíproco.

La interacción bacteria-microalga al ser recíproca influye en el desarrollo de las biopelículas y dinámica dentro del cultivo de abulón, es por ello que además se analizó la concentración bacteriana en las placas de PET y PHB, asociadas al crecimiento de *N. incerta* y al posible uso en el cultivo de este molusco. Los resultados de este trabajo indican un aumento importante en el crecimiento de la población bacteriana entre el inicio

y término del ensayo. El número de bacterias en el PHB fue estadísticamente diferente respecto al PET. La concentración de bacterias en el PHB fue en promedio 10^4 veces mayor que en el PET a lo largo de los 10 días de cultivo. Esta diferencia se debe a que el PHB es un material biodegradado por bacterias y propicia el desarrollo de las mismas al servir como una fuente de carbono y, por consiguiente de energía (Ready *et al.*, 2003; Sridew *et al.* 2006), lo que incrementó la biomasa significativamente. Se presume que el modo de generación de biomasa bacteriana dentro del microambiente de la biopelícula se haya dado de la siguiente manera: ya que el plástico (PHB) no es soluble en agua es posible que las bacterias asociadas a las diatomeas y al agua de cultivo excretaran enzimas extracelulares para poder unirse a la superficie de la placa. A su vez, estos microorganismos al excretar enzimas despolimerasas hidrolizan la cadena hasta que los fragmentos del polímero fuesen solubles en agua y sean transportados a la célula. Ahí, los intermediarios se pueden incorporar al metabolismo celular y finalmente se transfiere agua, dióxido de carbono y otros metabolitos. En particular, el PHB es degradado y mineralizado a CO_2 y agua bajo condiciones aerobias y los productos resultantes actúan como una fuente de carbono para generar energía y formar biomasa (Sridew *et al.*, 2006).

Debido a que el objetivo de la presente investigación es incorporar las placas de PHB como un sustrato tanto para el desarrollo de biopelículas como para los abulones en cultivo, es necesario analizar si el desarrollo bacteriano trae consigo efectos negativos o no al sistema de cultivo. En este sentido, la cantidad de bacterias obtenidas en los cultivos en placa, se encuentran por arriba de lo reportado por autores como Stott *et al.* (2004) quienes, al evaluar la cantidad de bacterias heterótrofas en biopelículas de diatomeas formadas sobre placas de plástico de policloruro de vinilo (PVC), utilizadas para el cultivo de abulón, obtuvieron alrededor de 4×10^4 UFC cm^{-2} . Anguiano-Beltrán (2007) en estanques de postlarvas de abulón encontró un intervalo de 6×10^4 hasta 1×10^8 UFC cm^{-2} . Estas concentraciones son menores a lo registrado en la biopelícula del PHB (2×10^{11} UFC cm^{-2}), mas no así en el PET (2×10^7 UFC cm^{-2}) que se encuentra en el intervalo señalado. Estos autores analizan la concentración de bacterias tanto en el alimento como en sistemas de cultivo para abulón y como ha sido reportado por Kawamura *et al.* (1998a) y Daume (2006) los abulones pueden consumir estas bacterias. Es posible que las UFC contabilizadas en este estudio puedan contribuir en el aumento de alimento disponible

para los abulones. No obstante, es indispensable investigar la concentración límite de bacterias que no causen efectos adversos dentro del sistema de cultivo. Por otro lado, la degradación enzimática del PHB y/o la actividad microbiana en el intestino de organismos acuáticos deriva en la liberación de ácido β -hidroxibutírico que induce efectos benéficos similares a los descritos con otros ácidos grasos de cadena corta (Defoirdt *et al.*, 2009). Se ha observado que la administración de PHB como un suplemento resulta en el aumento de la supervivencia de *Artemia franciscana* desafiada contra *Vibrio* spp. (Defoirdt *et al.*, 2007 y Van Cam *et al.*, 2009), en el aumento del rendimiento productivo y cambios en la comunidad microbiana en juveniles de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (De Schryver *et al.*, 2009), en larvas del camarón de agua dulce (Nhan *et al.*, 2010) y en alevines de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Najdegerami *et al.*, 2013). Por lo tanto, el uso de placas de PHB en el cultivo de abulón podría ayudar a mejorar la condición (crecimiento, supervivencia y prevenir enfermedades bacterianas) de los abulones.

4.3.1 Crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*

El PHB al ser un ácido graso de cadena corta puede inhibir el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio* en los sistemas de cultivo. Defoirdt *et al.* (2006 y 2007), Halet *et al.* (2007) y Nhan *et al.* (2010) demuestran que la incorporación de PHB en la dieta de crustáceos y peces inhibe el crecimiento de *Vibrio* spp. patógenos tales como *V. campbelli* y *V. harveyi*. En el presente estudio, al evaluar la cantidad de bacterias tipo *Vibrio* se identificó la presencia de estos microorganismos; sin embargo, en los primeros días no fue posible su conteo debido a que la densidad bacteriana fue muy alta. El conteo se pudo realizar al octavo y décimo día de cultivo. En ambos días no se encontraron diferencias estadísticas en la densidad de bacterias por efecto del tipo de plástico. No obstante, se pudo observar una disminución considerable de *Vibrio* hacia el final del ensayo en todos los tratamientos. Es posible que esta disminución se deba a un efecto en suma entre la acción de *N. incerta* al exudar sustancias antibacterianas y el ácido hidroxibutirato, compuesto proveniente de la degradación del PHB, que actúa como un agente de biocontrol. Molina-Cárdenas (2011) al evaluar el efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas, entre ellas *N. incerta*, sobre *Vibrio* spp. señala que la concentración de

bacterias disminuyó de manera significativa a partir del cuarto día de cultivo. Por su parte, Defoirdt *et al.* (2007) y Halet *et al.* (2007), investigaron si el PHB podría ser utilizado como agente de biocontrol suministrado en partículas o en bacterias a organismos acuáticos y argumentan que este ácido graso de cadena corta ofrece protección significativa contra *Vibrio* spp. luminiscentes. Los autores plantean que el polímero fue degradado parcialmente a β -hidroxibutirato y que la liberación de este ácido graso protege a los organismos contra patógenos. De igual modo, Lui *et al.* (2010) proponen que el PHB disminuye agentes patógenos o su virulencia como consecuencia de la interrupción de la señalización bacteriana (quorum sensing) a partir de las bacterias degradadoras de PHB.

La cantidad de *Vibrio* registrados en el presente trabajo, entre 1 y 21 UFC cm⁻² en los días 8 y 10, no excede lo reportado por Stott *et al.* (2004) quien al contabilizar *Vibrio* spp. a lo largo de 40 días en biopelículas de diatomeas en cultivo de abulón, reportan una concentración constante de 500 UFC cm⁻² durante todo el ensayo. Estos autores no encontraron evidencias que indiquen que las bacterias tipo *Vibrio* hayan afectado negativamente al cultivo; a pesar de ello argumentan que los *Vibrio* spp. son residentes del intestino de las postlarvas y colaboran en la descomposición de agar y otros polisacáridos contenidos en la dieta. Por consiguiente, es necesario evaluar la acción conjunta entre *N. incerta* y el PHB, ya sea en cultivos mixtos o directamente con abulones, donde al mismo tiempo se investigue el alcance del PHB como agente de biocontrol en moluscos.

4.4 Análisis de la biopelícula de *N. incerta* mediante citometría de flujo

Además de que la citometría de flujo es un método rápido y exitoso para caracterizar poblaciones acuáticas, también se ha utilizado para comprender la estructura y viabilidad de las células dentro de biopelículas mixtas, todo ello a partir de las propiedades individuales de las células. A su vez, en el estudio de biopelículas microalgales, la citometría de flujo permite el análisis de las bacterias no cultivables y proporciona la detección específica de ambas poblaciones (bacterias y microalgas) en una misma

muestra (Veal *et al.*, 2000). En el presente trabajo para el análisis de citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta* se utilizó la detección a 90° de la luz incidente (dispersión lateral o “side scatter”) y la fluorescencia en rojo >640 nm (BL3) para diferenciar bacterias de diatomeas (*N. incerta*). Otros estudios han utilizado la luz incidente para identificar poblaciones celulares en una misma muestra, en este caso la complejidad relativa (SSC) (Veal *et al.*, 2000), como en este trabajo. A pesar de que en este estudio el SSC mostró una mayor diferenciación entre bacterias y microalgas, autores como Veldhuis y Kraay (2000) indican que la caracterización de muestras de fitoplancton a partir de la luz incidente ya sea frontal o lateral no son muy discriminativas y la utilidad de estas señales para la identificación es limitada.

Dentro de las características de la citometría de flujo se encuentra la detección de fluorescencia, utilizada para distinguir microorganismos fotosintéticos de otros que no lo son, recurriendo a la autofluorescencia que deriva de los pigmentos (Burkill *et al.*, 1990; Veal *et al.*, 2000). En el presente trabajo, esta ventaja se utilizó para discriminar bacterias de diatomeas sin valerse de ningún tipo de colorante, técnica propuesta por Hyka *et al.* (2013). Se utilizó la fluorescencia en rojo (>640nm) proporcionada por el láser azul (488nm), facilitando una mayor discriminación entre bacterias y diatomeas, tal como ha sido reportado por otros autores (Veldhuis y Kraay, 2000; Vives-Rego *et al.*, 2000; Umorin y Lin, 2005). En los organismos fotosintéticos, la composición de pigmentos es específica, sin embargo, el pigmento primario o Clorofila *a*, es el único pigmento presente en todos ellos. Emite luz en dos rangos espectrales, pero el que se utilizó en este trabajo fue el rojo lejano (>640nm) utilizado también por Doiron *et al.* (2012) en el análisis de una biopelícula mixta entre una bacteria del género *Pseudoalteromonas* sp. y dos diatomeas *Amphora coffeaeformis* y *Cylindrotheca closterium*. En este trabajo y respecto a la fluorescencia de las células bacterianas en la emisión del rojo, es posible que en la biopelícula estuviesen presentes algunas cianobacterias provenientes del agua de cultivo y que son microorganismos importantes en la formación de biopelículas. Estos microorganismos presentan ficobiliproteínas, pigmentos que tienen una intensidad de fluorescencia máxima a 660nm (Hyka *et al.*, 2013). Cabe señalar que el filtro BL3 presenta la característica de ser “de paso largo o longpass” (LP) y posibilita la transmisión de longitudes de onda más largas en el rango activo del espectro objetivo (ultravioleta,

visible o infrarrojo) (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, 2012). Es decir, que permite detectar cualquier longitud de onda por arriba de los 460nm. No obstante, es necesario incluir otras técnicas de análisis que identifiquen de manera precisa el tipo de microorganismos que forman la biopelícula de *N. incerta*, por ejemplo microscopía de epifluorescencia o confocal láser de barrido, que proporcionan una configuración en dos y tres dimensiones y que además aportan información adicional a través de la detección y resolución de células bacterianas y de microalgas dentro de la biopelícula (Díaz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Doiron *et al.*, 2012).

En el análisis de citometría de flujo de la biopelícula de *N. incerta*, la mayoría de las muestras analizadas tendieron a desplazarse hacia el lado derecho del histograma biparamétrico SSC vs BL3. Este comportamiento se observó a medida que los días de cultivo fueron transcurriendo. Umorin y Lind (2005) al analizar la distribución del volumen celular en cultivos de *Chlorella vulgaris* por citometría de flujo describen que la dinámica de los cultivos cambia la morfología de la célula, incluyendo el tamaño celular y granularidad, influenciado también por las condiciones y densidad del cultivo, lo que pudo haberse presentado en este estudio.

Otro de los aspectos importantes de la citometría de flujo es la enumeración o cuantificación de la abundancia celular. En los cultivos de microalgas la citometría de flujo puede mejorar el control rutinario en el aumento o cambios en la composición de la biomasa, siempre y cuando la metodología sea estandarizada (Veldhuis y Kraay, 2000). A su vez, es posible correlacionar técnicas estándares de conteo y citometría de flujo (Cassoli *et al.*, 2007). En el presente estudio, se enumeró la biomasa bacteriana y de *N. incerta* a través de la citometría de flujo y no se encontró una correlación con los conteos realizados con el hematocitómetro (*N. incerta*) y con los conteos de bacterias en placa (por ejemplo Tabla 2 y Tabla 5). La abundancia registrada en citometría de flujo fue menor que los conteos con las técnicas estándares. En contraste, Cassoli *et al.* (2007) mencionan que la citometría de flujo enumera todas las bacterias contenidas en las muestras; mientras que el recuento en placa enumera solo las bacterias que son capaces de crecer bajo las condiciones del medio de cultivo y la incubación (bacterias cultivables).

Por lo tanto, la técnica estándar podría subestimar la cantidad total de bacterias dado que además una colonia no siempre se origina a partir de una sola bacteria. Una de las razones posibles que llevó a la falta de correlación entre las técnicas de conteo, podría estar relacionada con la metodología que se utilizó para fijar las muestras para citometría de flujo, ya que algunos métodos conducen a la disminución de propiedades de dispersión y cambios en la intensidad de fluorescencia, en el volumen celular, aumento de fondo y cambios conformacionales (Chao y Zhang, 2011). Por consiguiente, los cambios de estas propiedades podría subestimar el número de eventos reales. Finalmente, se recomienda utilizar otros métodos para fijar las muestras como la incorporación de nitrógeno líquido y su posterior almacenamiento a -20 °C cuando las muestras vayan a ser utilizadas después de unas pocas semanas o bien a -80 °C para periodos más largos (Vives-Rego *et al.*, 2000). Esta recomendación se sustenta debido a que y a pesar de haber utilizado una solución de formaldehído al 4%; método sugerido como la mejor opción para microalgas o fitoplancton y su utilización después de pocos días, no fue posible procesar las muestras hasta después de varias semanas.

5. Conclusiones

- La composición de la biopelícula de *N. incerta* formada sobre placas de PHB es diferente de la biopelícula formada en PET, debido a que la cantidad de bacterias heterotróficas fue significativamente mayor en el PHB respecto al PET.
- La densidad celular de la diatomea *N. incerta* no fue afectada por el tipo de plástico. Por lo tanto, las placas de poli- β -hidroxibutirato pueden ser utilizadas como sustrato sin afectar su crecimiento.
- La densidad celular de *N. incerta* fue mayor en el cultivo en matraz respecto al cultivo en placa.
- El tipo de plástico tuvo efecto sobre la composición proximal de la biopelícula de *N. incerta*. El PHB contribuyó en el incremento de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos.
- Las placas de poli- β -hidroxibutirato fueron degradadas en promedio 4.14% al ser expuestas a la biopelícula de *N. incerta* en 10 días. Lo que indica que en caso de ser utilizadas en el cultivo de abulón, se deberá considerar su reposición periódica.
- La biopelícula de *N. incerta* sobre placas de PHB soportó altas densidades de bacterias heterótrofas, indicando que el poli- β -hidroxibutirato favoreció su desarrollo.
- En todos los tratamientos se encontraron bacterias tipo *Vibrio*; sin embargo, su concentración disminuyó hacia el final del cultivo.
- El análisis de citometría de flujo permitió diferenciar bacterias de *N. incerta* mediante el uso de la complejidad relativa (dispersión lateral o SSC) y la excitación

de las células con el láser azul (488nm) y detectando la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos con el filtro BL3 (fluorescencia roja, >640nm).

- Con el uso de la región hipervariable V₇-V₉ del gen 16S rDNA se logró identificar el 83% de las bacterias cultivables a nivel de especie.
- Miembros del género *Pseudomonas* y *Alteromonas* estuvieron presentes en todos los tipos de plástico, mientras que *Sulfitobacter marinus* creció solamente en el PHB y *Hahella chejuensis* en el PET.
- Como conclusión general se obtuvo que el uso de placas de PHB no afectó el crecimiento de *N. incerta*. Sin embargo, favoreció el aumento en el contenido orgánico de la biopelícula con respecto al PET, así como la densidad de bacterias heterótrofas y de *Vibrio*; lo que indicaría que podría ser utilizado como sustrato para la formación de biopelículas en la alimentación del abulón.

6. Recomendaciones

Dado que los resultados del presente trabajo indican que el poli- β -hidroxibutirato no afectó la dinámica de crecimiento de *N. incerta* y además contribuyó en el incremento de la concentración de biomoléculas se recomienda incorporar este bioplástico al cultivo de abulón para realizar la evaluación experimental.

Analizar el perfil de aminoácidos, lípidos y pigmentos de las diatomeas cultivadas, en las distintas superficies de cultivo, usadas en la fase experimental.

A pesar de que se lograron identificar diferentes grupos bacterianos mediante la secuenciación de una región variable del gen 16S rDNA, se recomienda realizar un análisis metagenómico de la biopelícula de *N. incerta* que permita tener un conocimiento más amplio de las comunidades bacterianas que se desarrollan sobre el PET y el PHB.

Determinar bajo condiciones experimentales si los altos niveles bacterianos encontrados en la biopelícula formada sobre el PHB afectan o no el crecimiento del abulón.

Monitorear la presencia de bacterias tipo *Vibrio* a lo largo de la formación de la biopelícula para conocer su dinámica de crecimiento e identificar posibles especies patógenas.

Realizar estudios para correlacionar las técnicas estándares de conteo y la técnica de citometría de flujo.

Lista de Referencias

- Akmal, D., Azizan, M. N., y Majid, M.I.A. (2003). Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 513-518.
- Anguiano-Beltrán, C. (2007). El papel de las bacterias en la supervivencia y crecimiento de poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Doctorado en Ciencias. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California, México. 96 p.
- Anguiano-Beltrán, C. y Searcy-Bernal, R. (2007). Effects of antibiotics on the concentration of bacteria in biofilms and on the growth of *Haliotis rufescens* postlarvae. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 795-799.
- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., García-Ortega, A.M., García-Esquivel, Z., y Valenzuela-Espinoza, E. (2012). Effect of three bacterial isolates from a commercial hatchery on early red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Aquaculture International*, 20(5), 993-1001.
- Araya, R., Bahamondez, C., Barahona, K. y Silva-Aciares, F. (2010). Utilización de una biopelícula microalgal multiespecífica para optimizar la fijación larval y el crecimiento de abalón (*Haliotis rufescens*) en un criadero comercial. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1), 59-69.
- Arredondo V., B.O. y Voltolina, D. (2007). Manual Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Editado por. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México, 96 pp.
- Avendaño, R.E., y Riquelme, C.E. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research*, 30(11-12), 893-900.
- Avendaño-Herrera, R.E., y Riquelme, C.E. (2007). Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. *Aquacultural Engineering*, 36(2), 97-104.
- Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., y Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3), 173-186.
- Badii, M.H., Castillo, J., y Wong, A. (2008). Uso de Análisis de Covarianza (ANCOVA) en investigación científica (Use of covariance analysis (ANCOVA) in scientific research). Recuperado de: http://www.web.facpya.uanl.mx/rev_in/Revistas/5.1/A3.pdf.

- Barajas-Solano, A.F., Godoy-Ruiz, C.A., Monroy-Davila, J.D., Barajas-Ferreira, C., Kafarov V. (2012). Mejoramiento del secuestro de CO₂ por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio. *Revista ION* 25(2), 39-47.
- Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W., y Posewitz, M.C. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current opinion in biotechnology*, 20(3), 264-271.
- Bligh, E.G., y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D., (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205, 44 pp.
- Brown, M.R., Barrett, S.M., Volkman, J.K., Nearhos, S.P., Nell, J.A., y Allan, G.L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 143(3), 341-360.
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 3, 281-292.
- Burkill, P.H., Mantoura, R.F.C., y Cresser, M. (1990). The rapid analysis of single marine cells by flow cytometry [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Physical and Engineering Sciences*, 333(1628), 99-112.
- Campbell J.W. y Bishop S.H. (1970). Nitrogen metabolism in molluscs. En: *Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism*, Vol. I. *The Invertebrates*. Campbell J. W. (Ed.) (pp. 103-206). Academic Press, New York.
- Canizares, R. y Ontiveros, C. (1993). Comportamiento cinético de un cultivo mixto de la microalga marina *Tetraselmis chuii* y dos bacterias. *Revista Investigaciones Marinas*, 14, 86-91.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer N., y Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Cassoli, L.D., Machado, P.F., de Oliveira Rodrigues, A.C., y Coldebella, A. (2007). Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. *International Journal of Dairy Technology*, 60(1), 44-48.
- Carbajal-Miranda, M.J. (2002). Evaluación del crecimiento de postlarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens* Swaison 1822) utilizando como alimento dietas mono-específicas y mixta de diatomeas bentónicas. Maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 82 p.

- Carbajal-Miranda, M.J., Sánchez-Saavedra, M.P., y Simental, J.A. (2005). Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone postlarvae *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 401-405.
- Chávez Medrano, C.I. (2008). Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 116 p.
- Chao, Y.Q. y Zhang T. (2011). Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology Biotechnology*, 92, 381–92.
- Chiaverini, J. (1972). Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail.12:12.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., y O'Toole, P.W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research*, 38(22), e200.
- Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. y Eaton, A.D. (Eds.) (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (20a ed.). American Public Health Association, Washington, 1325 pp.
- Conover, S.A.M. (1975). Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom *Thalassiosira fluviatilis* supplied with nitrate, ammonium, or urea. *Marine Biology*, 32(3), 231-246.
- Correa-Reyes, J.G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M.T., Flores-Acevedo, N., y Vásquez-Peláez, C. (2009). Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 387-393.
- Courtois de Viçose, G., Porta, A., Viera, M.P., Fernández-Palacios, H., e Izquierdo, M.S. (2012a). Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1427-1437.
- Courtois de Viçose, G., Viera, M.P., Huchette, S., e Izquierdo, M.S. (2012b). Improving nursery performances of *Haliotis tuberculata coccinea*: Nutritional value of four species of benthic diatoms and green macroalgae germlings. *Aquaculture*, 334, 124-131.
- Darley, W. M. (1977). Biochemical composition. En *The biology of diatoms* (Vol. 13) (pp. 198-223). Blackwell Scientific Publications Oxford.

- Daume, S., Brand-Gardner S., y Woelkerling W.J. (1999). Preferential settlement of abalone larvae: diatom films vs. non-geniculate coralline red algae. *Aquaculture*, 174, 243–254.
- Daume, S., Krsinich A., Farrell S. y Gervis M. (2000). Settlement early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *Journal of Applied Phycology* 12, 479-488.
- Daume, S. y Ryan S. (2004). Nursery culture of the abalone *Haliotis laevigata*: larval settlement and juvenile production using cultured algae or formulated feed. *Journal Shellfish Research*, 23, 1019–1026.
- Daume, S. (2006). The roles of bacteria and micro and macro algae in abalone aquaculture: a review. *Journal of Shellfish Research*, 25(1), 151-157.
- Day, R., Gilmour, P., y Huchette, S. (2004). Effects of density and food supply on postlarval abalone: behaviour, growth and mortality. *Journal of Shellfish Research*, 23(4), 1009-1018.
- Defoirdt, T., Halet D., Sorgeloos, P., Bossier P., Verstraete, W. (2006). Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture*, 261,804-808.
- Defoirdt T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. y Verstraete, W. (2007). The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology* 9, 445-452.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., y Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates:(New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology advances*, 27(6), 680-685.
- De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., y Bossier, P. (2010). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1535-1541.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A., Quirós, C., (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48,385-407.
- Dinh, T.N., Wille, M., De Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., y Sorgeloos, P. (2010). The effect of poly-beta-hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 302, 76-81.
- Doiron, K., Linossier, I., Fay, F., Yong, J., Wahid, E.A., Hadjiev, D., y Bourgougnon, N. (2012). Dynamic approaches of mixed species biofilm formation using modern technologies. *Marine Environmental Research*, 78, 40-47.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Durazo-Beltrán, E. (2014). Los lípidos en la nutrición del abulón azul, molusco con potencial de cultivo. *Entreciencias*, 2(4), 125-135.
- Ebert, E.E., y Houk, J.L. (1984). Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, 39(1), 375-392.
- Erasmus, J.H., Cook, P.A. y Coyne, V.E. (1997). The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*, 155, 377-386.
- Erisken, N.T. y Iversen. L.J.J. (1995). Photosynthetic pigments as nitrogen stores in the cryptophyte alga *Rhodomonas* sp. *Journal Marine Biotechnology*, 3,193-195.
- Faturrahman, Immy Suci Rohyati, dan Sukiman. (2015). Improved of growth rate of abalone *Haliotis asinine* fed pudding probiotic-enriched protein. *Procedia Environmental Sciences*, 23, 315-322.
- Flores-Vergara, C. (1998). Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivado bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidades de luz. Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 132 p.
- Fogg, G.E. y B.J. Thake. (1978). *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. (3a ed.). University of Wisconsin Press, London. 269 p.
- Fry, J. C. (1993). *Biological data analysis: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. 448 p.
- Fujisawa, M., Hirai, H., y Nishida, T. (2001). Degradation of polyethylene and nylon-66 by the laccase-mediator system. *Journal of Polymers and the Environment*, 9(3), 103-108.
- Gäde, G. y Grieshaber, M.K. (1986). Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 83(2), 255-272.
- Garibay-Hernández A., Vázquez-Duhalt R., Sánchez-Saavedra M. P., Serrano-Carreón L. y Martínez-Jiménez A. (2009). Biodisel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38-61.
- Garland. C.D.S.L, Cooke. J.F. Grant y T.A. McMeekin. (1985). Ingestion of the bacteria on and the cuticle of crustose (non-articulated) coralline algae by post-larval and juvenile abalone (*Haliotis ruber* Leach) from Tasmanian waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 91, 137-149.

- Gasol, J.M., y del Giorno, P.A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina* 64,197-224.
- Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S.M., Dillon, J.G., y Hughes, M.K. (1993). Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(9), 1135-1148.
- Gordon H.R. y P.A. Cook. (2001). World abalone supply, markets and pricing: Historical, current and future. *Journal Shellfish Research*. 20, 567–570.
- Gordon, N., Neori, A., Shpigel, M., Lee, J. y Harpaz, S. (2006). Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture*, 252(2), 225-233.
- Gorrostieta-Hurtado, E. y Searcy-Bernal, R. (2004). Combined effects of light condition (constant illumination or darkness) and diatom density on postlarval survival and growth of the abalone *Haliotis rufescens*. *Journal Shellfish Research*, 23, 1001–1008.
- Gorrostieta Hurtado, E. (2005). Efecto de la densidad de alimento, la luz y el flujo de agua en el crecimiento de postlarvas de abulón *Haliotis* spp. Doctorado en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 220 p.
- Gorrostieta-Hurtado, E., Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C., García-Esquivel, Z., y Valenzuela-Espinoza, E. (2009). Effect of darkness on the early postlarval development of *Haliotis corrugata* abalone fed different diatom densities. *Ciencias Marinas*, 35(1), 113-122.
- Granum, E., Kirkvold, S., y Myklestad, S.M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology. Progress series*, 242, 83-94.
- Grossart, H.P. (1999). Interactions between marine bacteria and axénica diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis* and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* 19, 1-11.
- Ha, C.S., y Cho, W. J. (2002). Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Progress in polymer science*, 27(4), 759-809.
- Hahn, K. (1989). Nutrition and growth of abalone. En: Hahn K.O. (Ed). *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*. (pp. 135-156). CRC Press, Boca Raton.
- Halet D., Defoirdt T., Van Damme P., Vervaeren H., Forrez I., Van de Wiele T., Boon N., Sorgeloos P., Bossier P. y Verstraete W. (2007). Poly-b-hydroxybutyrate accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiology and Ecology* 60, 363-369.

- Henriksen, P., Riemann, B., Kaas, H., Sørensen, H.M. y Sørensen, H.L. (2002). Effects of nutrient-limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *Journal of Plankton Research*, 24(9), 835-858.
- Haines, K.C., y Guillard, R.R. (1974). Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12-producing marine bacteria. *Journal of Phycology*, 10(3), 245-252.
- Howard, D.H. (1956). The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *Journal of bacteriology*, 71(5), 625.
- Huang, Z.B., Guo, F., Zhao, J., Li, W.D., y Ke, C.H. (2010). Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture Research*, 41(11), 760-769.
- Huchette, S. (2003). Density-dependence in early life stage of abalone. Doctoral dissertation, Department of Zoology, University of Melbourne, Australia, 257 p.
- Hyka, P., Lickova, S., Přebyl, P., Melzoch, K., y Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology advances*, 31(1), 2-16.
- Jain, A., y Bhosle, N.B. (2009). Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. *Biofouling*, 25(1), 13-19.
- Jorgensen, E.G. (1977). Photosynthesis. En: Werner, D. (Eds.). The biology of diatoms. Bot. Monogr., (Vol. 13) (pp. 150-168). University of California Press, Berkeley and New York.
- Kawamura, T., y Takami, H. (1995). Analysis of feeding and growth rate of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai* fed on four species of benthic diatom. *Fisheries science*, 61(2), 357-358.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami, H. y Yamashita, Y. (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194(2), 189-199.
- Kawamura, T., (1996). The role of benthic diatoms in the early life stages of the Japanese abalone *Haliotis discus hannai*. En: Watanabe, Y., Yamashita, Y., Oozeki, Y. Eds., Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources. (pp. 355–367) A.A. Balkema, Brookfield.
- Kawamura, T., Roberts, R.D., Takami, H. (1998a). A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research*. 17,615– 625.
- Kawamura, T., Roberts, R.D., Nicholson, C.M. (1998b). Factors affecting the food value of diatom strains for post larval abalone *Haliotis iris*. *Aquaculture* 160, 81–88.

- Kawamura T., Rodney D. Roberts and Yoh Yamashita. (2001). Radula development in abalone *Haliotis discus hannai* from larva to adult in relation to feeding transitions. *Fisheries Science*, 67(4), 596-605.
- Khanna, S., y Srivastava, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40,607-619.
- Lebeau, T., y Robert, J.M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 612-623.
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1-14.
- Lee, Y.K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H.D., y Hu, Q. (2013). Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. En: Richmond, A., y Hu, Q. (Eds.) *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, (2a ed.), (pp. 37-68). John Wiley & Sons.
- Liu, Y., De Schryver, P., Van Delsen, B., Maignien, L., Boon, N., Sorgeloos, P. y Defoirdt, T. (2010). PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(1), 196-204.
- Livingston, D.R. y A. de Zwaan. (1983). Carbohydrate Metabolism of Gastropods. En: P.W. Hochachka (Ed.). *The Mollusca, Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. Vol. 1, 5, pp. 177-242.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lüning K. (1981). Light. En: Lobban, C.S. y Wynne, M.J. (Eds.). *The biology of seaweeds* (Vol. 17). (pp. 326-330). Univ of California Press.
- Mai, K., Mercer, J.P., y Donlon, J. (1995). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture*, 136(1), 165-180.
- Mai, K., Mercer, J. P., y Donlon, J. (1996). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture*, 139(1), 77-89.
- Malara, G. y Charra, R. (1972). Dosages des protéines particulières selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6, 11 p.

- Malone, T.C. y Ducklow, H.W. (1990). Microbial biomass in the coastal plume of Chesapeake Bay: Phytoplankton-bacterioplankton relationships. *Limnology and Oceanography*, 35(2), 296-312.
- Mandigan, T.M., Martinko, M.J., Bender, S.K, Buckley, H.D., y Stahl, A.D. (2015). The Foundations of Microbiology. En: *Brock Biology of Microorganisms*. (14th ed.) (pp. 154-156). Boston, Pearson.
- Marsden, I.D. y Williams, P.M.J. (1996). Factors affecting the grazing rate of the New Zealand abalone *Haliotis iris* Martyn. *Journal Shellfish Research*, 15, 401-406.
- Martinez-Ponce, D.R., y Searcy-Bernal, R., (1998). Grazing rates of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae feeding on the benthic diatom *Navicula incerta*. *Journal Shellfish Research*, 17, 627-630.
- Masojídek J., Torzillo G. y Koblížek M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. En: Richmond, A., y Hu, Q. (Eds.). *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. (2a ed.) (pp. 32-51). John Wiley & Sons.
- Mercer, J.P., Mai, K.S., y Donlon, J. (1993). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino I. Effects of algal diets on growth and biochemical composition. *Invertebrate reproduction & development*, 23(2-3), 75-88.
- Miranda-Saucedo, C.M. (2011). Crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón (*Haliotis rufescens*) alimentadas con dietas monoespecíficas de diatomeas bentónicas conservadas en frío Maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 72 p.
- Molina-Cárdenas, C.A. (2011). Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio* spp. Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 81 p.
- Müller, R.J., Kleeberg, I., y Deckwer, W.D. (2001). Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 87-95.
- Muñoz, P., Ambler, R., y Bulboa, C. (2012). Settlement, survival, and post-larval growth of red abalone, *Haliotis rufescens*, on polycarbonate plates treated with germlings of *Ulva* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(6), 890-895.
- Myklestad, S. (1974). Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 15(3), 261-274.
- Najdegerami, E.H., Tran, T.N., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon, N., y Bossier, P. (2012). Effects of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 25-33.

- Nagata, T., Fukuda, H., Fukuda, R., y Koike, I. (2000). Bacterioplankton distribution and production in deep Pacific waters: Large-scale geographic variations and possible coupling with sinking particle fluxes. *Limnology and Oceanography*, 45(2), 426-435.
- Najdegerami, E.H., Baruah, K., Shiri, A., Rekecki, A., den Broeck, W., Sorgeloos, P., y Schryver, P. (2013). Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed *Artemia* nauplii enriched with poly- β -hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. *Aquaculture Research*, 98, 1-12.
- Nakada, H.I., y Sweeny, P.C. (1967). Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 242(5), 845-851.
- Nalewajko, C., Dunstall, T.G. y Shear, H. (1976). Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal-bacterial cultures: significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates. *Journal of Phycology*, 12,1-5.
- Negoro, M., Shioji, N., Miyamoto, K., y Micira, Y. (1991). Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28(1), 877-886.
- Nell, J.A., MacLennan, D.G., Allan, G.L., Nearhos, S.P. y Frances, J. (1994). Evaluation of new microbial foods as partial substitutes for microalgae in a diet for Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* larvae and spat. En: J.A. Nell, D.G. MacLennan, G.L. Allan, S.P. Nearhos y J. Frances (Eds.). *New Microbial Foods for Aquaculture*. Final Report to Fisheries Research Development Corporation (FRDC), NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay, N.S.W.
- Nhan, D.T., Wille, M., De Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., y Sorgeloos, P. (2010). The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 302(1), 76-81.
- Nichols, D.S., Nichols, P.D., y McMeekin, T.A. (1993). Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarctic Science*, 5(02), 149-160.
- Olafsen, J.A. (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200(1), 223-247.
- Ojumu, T.V., Yu, J., y Solomon, B.O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 18-24.
- Pande, S.V., Khan, R.P., y Venkitasubramanian, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, 6, 415-423.
- Parker, F., Davidson, M., Freeman, K., Hair, S., y Daume, S. (2007). Investigation of optimal temperature and light conditions for three benthic diatoms and their suitability to commercial scale nursery culture of abalone (*Haliotis laevigata*). *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 751-761.

- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. (1984). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. (pp. 101-111). Pergamon Press, Oxford.
- Pierre, G., Graber, M., Rafiliposon, B.A., Dupuy, C., Orvain, F., De Crignis, M. y Maugard, T. (2012). Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Oléron, France). *Microbial Ecology*, 63(1), 157-169.
- Poirier, Y., Nawrath, C., y Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *BioTechnology*, (13), 142-50.
- Povolo, F., Hermida, E.B., Miyazaky, S.A., y Quagliano, J.A. (2000). Tracción en Películas de Polímero Biodegradable. Jornadas SAM 2000-IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga, 1107-1112.
- Qian, P. Y., Lau, S. C. K., Dahms, H. U., Dobretsov, S., y Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, 9(4), 399-410.
- Reddy C.S.K., Ghai R. y Kalia V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87(2): 137-146.
- Reusch, R. N. (2013). The role of short-chain conjugated poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) in protein folding. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 10727-10748.
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.Ø., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., y Bakke, A.M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136.
- Riquelme, C.E., y Avendaño-Herrera, R.E. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76(4), 725-736.
- Riquelme, C.E., y Ishida, Y. (1988). Chemotaxis of bacteria to extracellular products of marine bloom algae. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 34(5), 417-423.
- Rivas, M. y Riquelme, C. (2012). Probiotics biofilms. En: Everlon C. Rigobelo (Ed.). *Probiotics*. (Cap. 28) (pp. 623-644). InTech. Recuperado de: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/39609.pdf>.
- Roberts, R. Kawamura, T., y Takami, H. (2000). Diatoms for abalone culture: a workshop for abalone farmers. Cawthron Report No. 547, 28 p.
- Rojos-Salazar G. (2002). Supervivencia y crecimiento de poslarvas y juveniles de *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) alimentadas con diatomeas bentónicas. Maestría en

Ciencias. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California, México, 95 p.

- Romalde, L.J. (2012). Héroes y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos. *Revista AquaTIC* 37, 45-49. Recuperado de: http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/37_8.pdf
- Round, F.E., Crawford, R.M., y Mann, D.G. (1990). *The diatoms: biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press. 744 p.
- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M., y Ezura, Y. (2003). Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role of establishment of abalone *V. halioticoli* association. *Aquaculture* 219, 671-679.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. y Muyzer, G. (2002). Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 42, 25-35.
- Schlüter, L., Møhlenberg, F., Havskum, H., y Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 49-63.
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R., y Miller, K. M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256(1), 50-73.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A.E., Flores-Aguilar, R.A., y Hinojosa-Rivera, P.R. (1992). Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 105(3), 241-250.
- Searcy-Bernal, R. (1996). Boundary layers and abalone postlarval culture: Preliminary studies. *Aquaculture*, 140(1), 129-137.
- Searcy-Bernal, R., Velez-Espino, L.A., Anguiano-Beltrán, C., y Cook, P.A. (2001). Effect of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* postlarvae. *Journal of Shellfish Research*, 20(2), 587-591.
- Searcy-Bernal, R. y Gorrostieta-Hurtado, E. (2007). Effect of darkness and water flow rate on survival, grazing and growth rates of abalone *Haliotis rufescens* postlarvae. *Journal of Shellfish Research*, 26, 789-794.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons. 566 p.
- Simental-Trinidad, J.A. (1999). Producción masiva de diatomeas bentónicas empleando fertilizantes agrícolas y su efecto en la cantidad de biomasa y su composición proximal. Maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 115 p.

- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra M.P. y Flores-Acevedo N. (2004). Growth and survival of juvenile red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with macroalgae enriched with a benthic diatom film. *Journal of Shellfish Research*, 23(4), 995-999.
- Siqueiros-Beltrones D.A. (1999). Análisis taxonómico y sucesional en películas de diatomeas bentónicas utilizadas como alimento de poslarvas de abulón (*Haliotis* spp.) en cultivo. Doctorado en Ciencias. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California, México, 92 p.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., y Voltolina, D. (2000). Grazing selectivity of red abalone *Haliotis rufescens* postlarvae on benthic diatom films under culture conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(2), 239-246.
- Slattery, M. (1992). Larval settlement and juvenile survival in the red abalone (*Haliotis rufescens*): an examination of inductive cues and substrate selection. *Aquaculture*, 102, 143-153.
- Somleva, M.N., Peoples, O.P., y Snell, K.D. (2013). PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 233-252.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. (pp 321-344). Cambridge University Press, London.
- Sridewi, N., Bhubalan, K. y Sudesh, K. (2006). Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12), 2931-2940.
- Stott, A. E., Takeuchi, T., y Koike, Y. (2004). An alternative culture system for the hatchery production of abalone without using livefood. *Aquaculture*, 236(1), 341-360.
- Strickland, J.D.H., y Parsons, T.R. (1965). A manual of seawater analysis. Bulletin of Fisheries Research. Board Canada. No. 125, (2^a ed.). 203 p.
- Sui, L., Liu, Y., Sun, H., Wille, M., Bossier, P., y De Schryver, P. (2014). The effect of poly- β -hydroxybutyrate on the performance of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* Milne-Edwards) zoea larvae. *Aquaculture Research*, 45(3), 558-565.
- Suminto, y Hirayama, K. (1993). Relationship between diatom growth and bacterial population in semi mass culture tanks of diatom. Bull. *Fac. Fish. Nagasaki Univ.*, 74 (75), 37-41.
- Sundh, I. (1992). Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2938-2947.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., y Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

- Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Thimijan R.W. y Heins R.D. (1983). Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: A review of procedures for interconversion. *HortScience*, 18, 818–822.
- Tsuji, H., y Suzuyoshi, K. (2002a). Environmental degradation of biodegradable polyesters 1. Poly (ϵ -caprolactone), poly [(R)-3-hydroxybutyrate], and poly (L-lactide) films in controlled static seawater. *Polymer Degradation and Stability*, 75(2), 347-355.
- Tsuji, H., y Suzuyoshi, K. (2002b). Environmental degradation of biodegradable polyesters 2. Poly (ϵ -caprolactone), poly [(R)-3-hydroxybutyrate], and poly (L-lactide) films in natural dynamic seawater. *Polymer Degradation and Stability*, 75(2), 357-365.
- Tung, C. H., y Alfaro, A. C. (2011). Initial attachment, metamorphosis, settlement, and survival of black-footed abalone, *Haliotis iris*, on microalgal biofilms containing different amino acid compositions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2), 167-183.
- Umorin, M. y Lind, O. (2005). Cell volume distribution dynamics of *Chlorella vulgaris* Beij. in batch cultures under continuous light. *Biotechnology Letters*, 27(5), 347–54.
- Van Cam, D.T., Van Hao, N., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2009). Novel approach of using homoserine lactone-degrading and poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 291(1), 23-30.
- Van Dam, A.A., Beveridge, M.C., Azim, M.E. y Verdegem, M.C. (2002). The potential of fish production based on periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(1), 1-31.
- Veal, D. A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., y Attfield, P. V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods*, 243(1), 191-210.
- Veldhuis, M.J., y Kraay, G.W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134.
- Viana, M. T. (2000). Nutrición de abulón. En: Civera-Cerecedo R., Pérez-Estrada, C. J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.). *Avance en Nutrición Acuícola IV*. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. (pp. 33-41). Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Viana, M.T. (2005). Abalone Culture. En: A. Kelly y J. Silverstein (Eds.). *Aquaculture in the 21st Century*. (pp.1-24). American Fisheries Society Symposium 46.

- Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von y Caron G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology reviews*, 24, 429–48.
- Wang, Qi-Hua, Shu-Hong, W., Ming-Jin, D., Mei, L., Ruo-Fu, S., y Ai-Hua, C. (1997). Studies on culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone I. Effects of temperature and light intensity on growth rate. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 15(4), 296-303.
- Wang, Y., Claeys, L., van der Ha, D., Verstraete, W., Boon, N. (2010). Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on *Escherichia coli* and *Legionella beliardensis* assessed by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87,331-341.
- Webb, H.K., Crawford, R.J., Sawabe, T., e Ivanova, E.P. (2009). Poly (ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes and Environments*, 24(1), 39-42.
- Whyte, J.N. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60(3), 231-241.
- Williams, S.F. y Peoples O.P. (1996). Biodegradable plastics from plants. *Chemtech* 26, 38-44.
- Woolnough, C.A., Yee, L.H., Charlton, T., y Foster, L.J.R. (2010). Environmental degradation and biofouling of 'green' plastics including short and medium chain length polyhydroxyalkanoates. *Polymer International*, 59(5), 658-667.
- Yallop, M.L., Paterson, D.M. y Wellsbury, P. (2000). Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments. *Microbial Ecology*, 39(2), 116-127.
- Yazawa, K., Araki, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, A., y Kondo, K. (1988). Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal of biochemistry*, 103(1), 5-7.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. (5th ed.) (pp. 286-295). Pearson Prentice Hall.

Anexos

Anexo 1. Conversión de unidades fotométricas a quanta (densidad de flujo de fotones)

Para convertir las unidades de iluminancia (lux) a quanta se realizó lo siguiente:

Conversión de lux a irradiancia (lux a $W m^{-2}$) (Thimijan y Heins, 1983)

$$W m^{-2} = \frac{(lx) (mW lm^{-1})}{(1000 mW W^{-1})}$$

Donde:

lx= Lux

$mW lm^{-1} = 4.02$

Nota: el valor de $mW lm^{-1}$ depende de la longitud de onda emitida por el tipo de luz. En este caso, la longitud de onda emitida por la lámpara tipo LED Marineland está entre 400 y 700nm (Figura A1).

$$\mu m m^{-2} s^{-1} = (W m^{-2})(cte)$$

Donde:

$cte = 4.57 \mu mol s^{-1} W^{-1}$

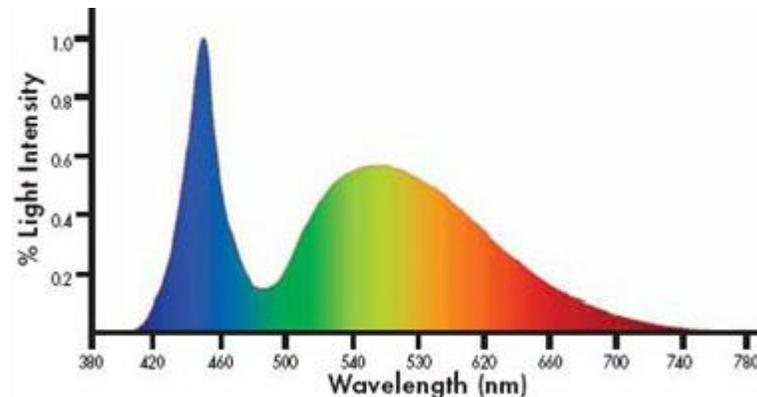


Figura A1. Espectro de emisión dado por una lámpara LED para acuario Marineland.
http://www.americanaquariumproducts.com/Aquarium_Lighting.html#energy

Anexo 2. Determinación de Proteínas.

Malara y Charra (1972), Lowry *et al.* (1951)

Soluciones.

Solución A. Na_2CO_3 al 2% en NaOH al 0.1 N.

Solución B1: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%

Solución B2: Tartrato de sodio y potasio al 1%

Solución C: (Mezcla Sol. A + Sol. B1 + Sol. B2)

Concentración 100:1:1 → 100mL Sol. A + 1mL Sol. B1 + 1mL Sol. B2

Solución D: Concentración 1:1 → 1 Vol. de Folin Ciocalteu + 1 Vol. de H_2O destilada.

Extracción y determinación.

1. Colocar el filtro en un tubo de centrífuga de 15 mL y agregar 1 mL de NaOH 0.1 N. Macerar con una varilla de vidrio. (Primera extracción).
2. Enjuagar la varilla con 1 mL de NaOH 0.1 N.
3. Colocar los tubos en un baño a 100 °C por 15 min.
4. Enfriar los tubos con un baño de agua a temperatura ambiente y centrifugar a 4 °C a una velocidad de 4000 rpm por 15 min.
5. Colocar el sobrenadante en un tubo de ensayo limpio.
6. Realizar una segunda extracción. Llevar a cabo los pasos del 1 al 4. Añadir un 1 mL extra de NaOH 0.1 N (volumen final de NaOH 3 mL).
7. Colocar el sobrenadante en el mismo tubo de ensayo.
8. Tomar 1 mL de la mezcla del sobrenadante y colocarlo en otro tubo de ensayo.
9. Agregar 5 mL de Sol. C, inclusive al blanco. Reposar durante 10 min.

10. Agitar los tubos con vórtex, la muestra tomará un color azul, y dejar reposar durante 1:30 h en oscuridad.
11. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro a 750 nm.

Nota: Agregar 1 mL de NaOH 0.1 N en un tubo de ensayo, el cual servirá como blanco. Dar el mismo tratamiento que a las muestras.

Anexo 3. Determinación de Carbohidratos.

Whyte (1987), Dubois *et al.*, (1956)

Soluciones.

Fenol 5%.

H₂SO₄ concentrado.

H₂SO₄ 1 M.

Extracción y determinación.

1. Colocar los filtros en un tubo de centrifuga de 15 mL y agregar 1 mL de H₂SO₄ 1 M.
2. Macerar el filtro con una varilla de vidrio y enjuagar con 2 mL de H₂SO₄ 1 M.
3. Agregar 2 mL de H₂SO₄ 1 M y colocar los tubos en un baño de agua a 100°C por un periodo de 1 h.
4. Enfriar los tubos en un baño de agua a temperatura ambiente y centrifugar a 4 °C a 1500 x g durante 15 min.
5. Colocar 1 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo limpio y agregar 1 mL de la solución de fenol al 5%.
6. Dejar reposar durante 40 min. Posteriormente agregar 5 mL H₂SO₄ concentrado. Enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente.
7. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro a 485 nm.

Nota: Como blanco se utilizará un tubo con 1 mL de fenol al 5%. Dar el mismo tratamiento que a las muestras.

Nota: Agregar el H₂SO₄ concentrado lentamente, con el tubo inclinado, por las paredes del mismo y mezclar suavemente. Con ello, se evitará la pérdida de carbohidratos, ya que la reacción es sumamente exotérmica.

Anexo 4. Determinación de Lípidos.

Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972), Pande *et al.* (1963)

Proporción Cloroformo-Metanol-Agua: 2 mL de cloroformo

4 mL de metanol

0.6 mL de agua

Mezclar el cloroformo y el metanol.

Extracción y determinación.

1. Colocar el filtro en un tubo de centrifuga de 15 mL y agregar 0.6 mL de agua destilada.
2. Macerar el filtro con una varilla de vidrio y enjuagarla con 1 mL de la mezcla cloroformo-metanol.

Nota: Utilizar un baño de agua fría para evitar que se evaporen los solventes.

3. Agregar 2 mL de la mezcla de solventes cloroformo-metanol y centrifugar a 4 °C a una velocidad de 1500 x g por 15 min.
4. Colocar el sobrenadante en un tubo de ensayo limpio.
5. Realizar una segunda extracción con 3 mL de la mezcla de solventes.
6. Centrifugar y verter el sobrenadante en el mismo tubo de ensayo. Mezclar.
7. Agregar 2 mL de agua destilada para formar la bifase, abajo lípidos con cloroformo y arriba agua con metanol.
8. Agitar vigorosamente y centrifugar a 1500 x g por 15 min. Se forma la bifase.
9. Separar la fase agua-metanol (arriba) con una pipeta Pasteur.
10. Colocar los tubos de ensayo en una estufa a una temperatura entre 45 y 50 °C por 36 h o hasta que se evapore el cloroformo.

11. Una vez que se halla evaporado el cloroformo, agregar 3 mL de dicromato ácido al 2%. Tapar los tubos con papel aluminio.
12. Colocar los tubos en un baño de agua a 100 °C por 15 min. Enfriar con un baño de agua a temperatura ambiente.
13. Agregar 4.5 mL de agua destilada y mezclar. Enfriar nuevamente.
14. Leer la densidad óptica de las muestras en un espectrofotómetro a 590 nm.

Nota: Utilizar como blanco un tubo con 0.6 mL de agua destilada y 6 mL de cloroformo-metanol. Dar el mismo tratamiento que a las muestras.

Anexo 5. Ecuaciones utilizadas para la determinación de Pigmentos

(Strickland y Parsons, 1965).

$$(Ca) \text{Clorofila } a = 11.85 E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630}$$

$$(Cc) \text{Clorofila } c = 24.52 E_{630} - 1.67E_{664} - 7.60E_{647}$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6(E_{480} - 1.49E_{510})$$

Nota: Corregir el coeficiente de extinción debido a la turbidez en el extracto. Corregir la absorbancia 510 y 480nm.

$$E_{510} = E_{510} - (2 * E_{750})$$

$$E_{480} = E_{480} - (3 * E_{750})$$

Anexo 6. Estandarización de lecturas en citometría de flujo para la caracterización de la biopelícula de *N. incerta* sobre diferentes plásticos.

Para ajustar los parámetros de lectura en citometría de flujo se realizó lo siguiente:

1. Seleccionar el canal y filtro donde las muestras presenten la mejor señal de fluorescencia.
 - 1.1. Para discriminar el o los filtros adecuados utilizar muestras de cada grupo celular. En este caso se utilizó una muestra de bacterias asociada al cultivo de *N. incerta*, así como también la propia diatomea. Si no es posible obtener muestras individuales utilizar como referencia partículas con o sin fluorescencia (ejemplo microspheres Molecular Probes®) (Figura A7.1 y A7.2).
2. Compensar el Voltaje de los filtros con cada una de las muestras, dar énfasis a los filtros donde las células presenten mayor fluorescencia (Tabla A7.1).
3. Identificar la posición o ventana de análisis de cada una de las muestras en un histograma biparamétrico (dot-plot) (Figura A7.3)
4. Cuando los parámetros hayan sido compensados y se haya identificado la posible ventana de análisis, leer en el citómetro muestras de la biopelícula y bacterias para confirmar que los parámetros fijados (filtros, Voltaje, etc.) sean los correctos.

De acuerdo a la estandarización se obtuvieron los siguientes valores de configuración (Voltaje) para cada uno de los canales y filtros.

Tabla A7.1. Valores del Voltaje (mV) utilizado en el Attune® Acoustic Focusing Cytometer para la caracterización de la biopelícula.

Voltaje (mV)							
FSC	SSC	BL1	BL2	BL3	VL1	VL2	VL3
2100	2250	1950	1950	1500	1250	1800	2350

Donde: FSC (Luz dispersada frontalmente), SSC (Luz dispersada lateralmente), BL1 (filtro azul 1, 530nm), BL2 (filtro azul 2, 577nm), BL3 (filtro azul 3, >640nm), VL1 (filtro violeta 1, 450nm), VL2 (filtro violeta 2, 522nm) y VL3 (filtro violeta 3, 603).

En la estandarización para caracterizar a la biopelícula de *N. incerta* mediante citometría de flujo, se obtuvieron diversos histogramas biparamétricos que permiten el análisis de las muestras y la identificación de las posibles agrupaciones celulares. Para ello se utilizaron bacterias provenientes del cultivo de *N. incerta*, crecidas en el medio de cultivo LB, y partículas de la biopelícula de *N. incerta* disgregada procedentes de la cepa y del cultivo en matraz.

Se graficó la señal registrada por el detector SSC (luz dispersada lateralmente) contra la señal registrada por el detector FSC (luz dispersada frontalmente) para cada de una de las muestras (bacterias y *N. incerta*). A su vez, se registró a partir de un histograma la intensidad de la señal de cada uno de los detectores SSC y FSC en muestras separadas de bacterias y *N. incerta* (Figura A7.1).

Asimismo, la Figura A7.1 y A7.2 muestran el análisis de la señal de fluorescencia en citometría de flujo para las células bacterianas y microalgales (*N. incerta*). Cada grupo celular está descrito por un histograma, donde la distribución de fluorescencia se representa en escala logarítmica. Se midió la intensidad de fluorescencia con los filtros VL1 (450nm), VL2 (552nm) y VL3 (603), los que permiten el paso de luz azul, verde y naranja, respectivamente, del espectro visible y cuya fuente de excitación provino del láser Violeta (405nm). También, se utilizó el láser Azul (488nm), donde bacterias y microalgas emitieron fluorescencia con los filtros BL1 (530nm), BL2 (577nm) y BL3 (640nm) que corresponde al verde, naranja y rojo. Este análisis permitió seleccionar los filtros adecuados para la caracterización de la biopelícula formada por *N. incerta* en diferentes plásticos. De este modo, las muestras se analizaron con el filtro BL3, debido a que la señal de fluorescencia presenta mayor exactitud y describe de forma independiente a células bacterianas y microalgales.

Finalmente el análisis anterior permitió identificar dos ventanas de análisis independientes para bacterias y *N. incerta* (Figura A7.3). Estas fueron utilizadas para identificar ambas agrupaciones en la biopelícula de *N. incerta* formada en placas de los plásticos PET y PHB.

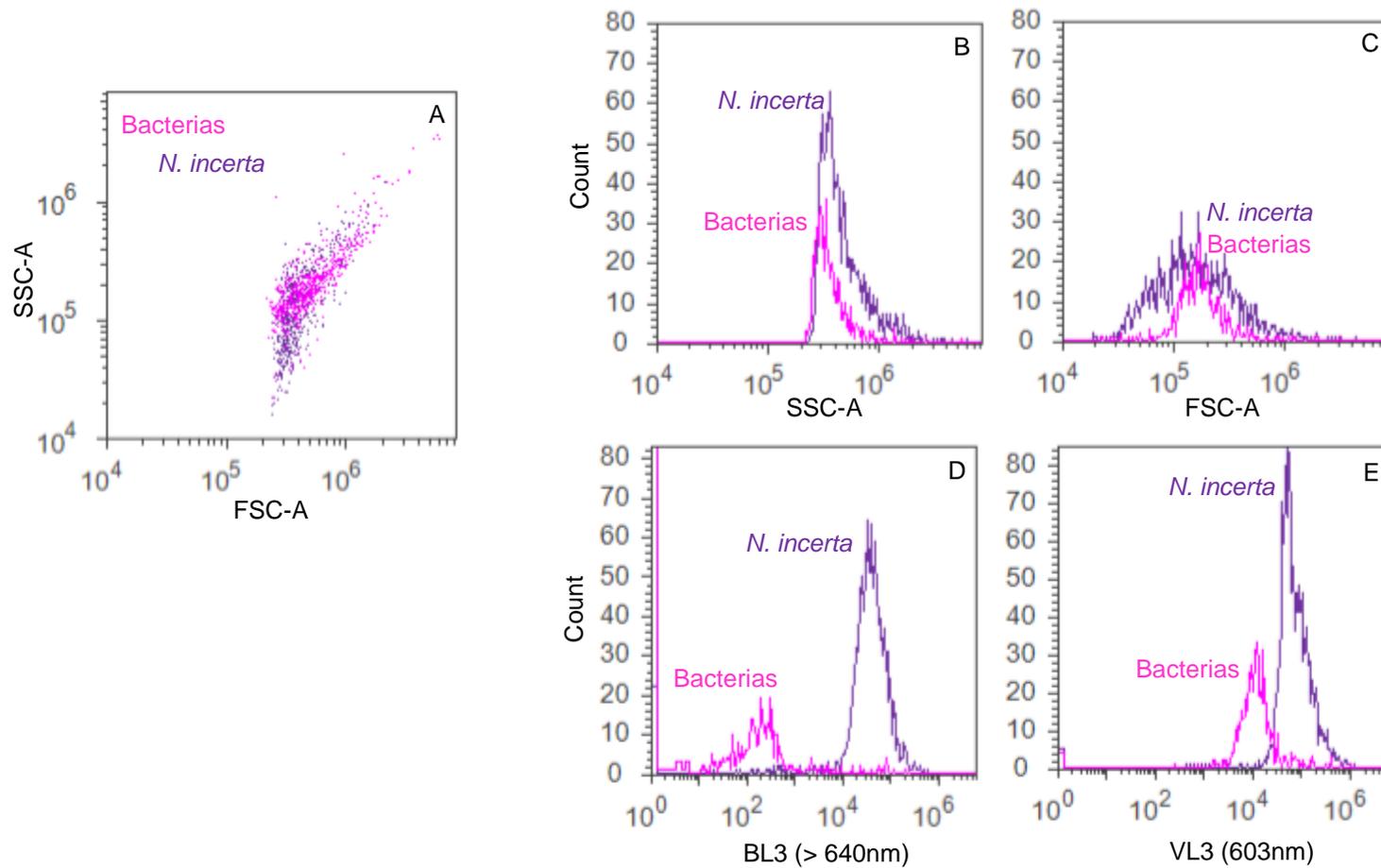


Figura A7.1. Análisis de citometría de flujo de células bacterianas (asociadas al cultivo de *N. incerta*) y de *N. incerta*. A) Histograma biparamétrico en escala logarítmica de bacterias y *N. incerta*. Dispersión lateral (SSC) y dispersión frontal (FSC). B y C) Intensidad de la señal de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). D y E) Señal de fluorescencia en rojo (> 640nm) y naranja (603nm).

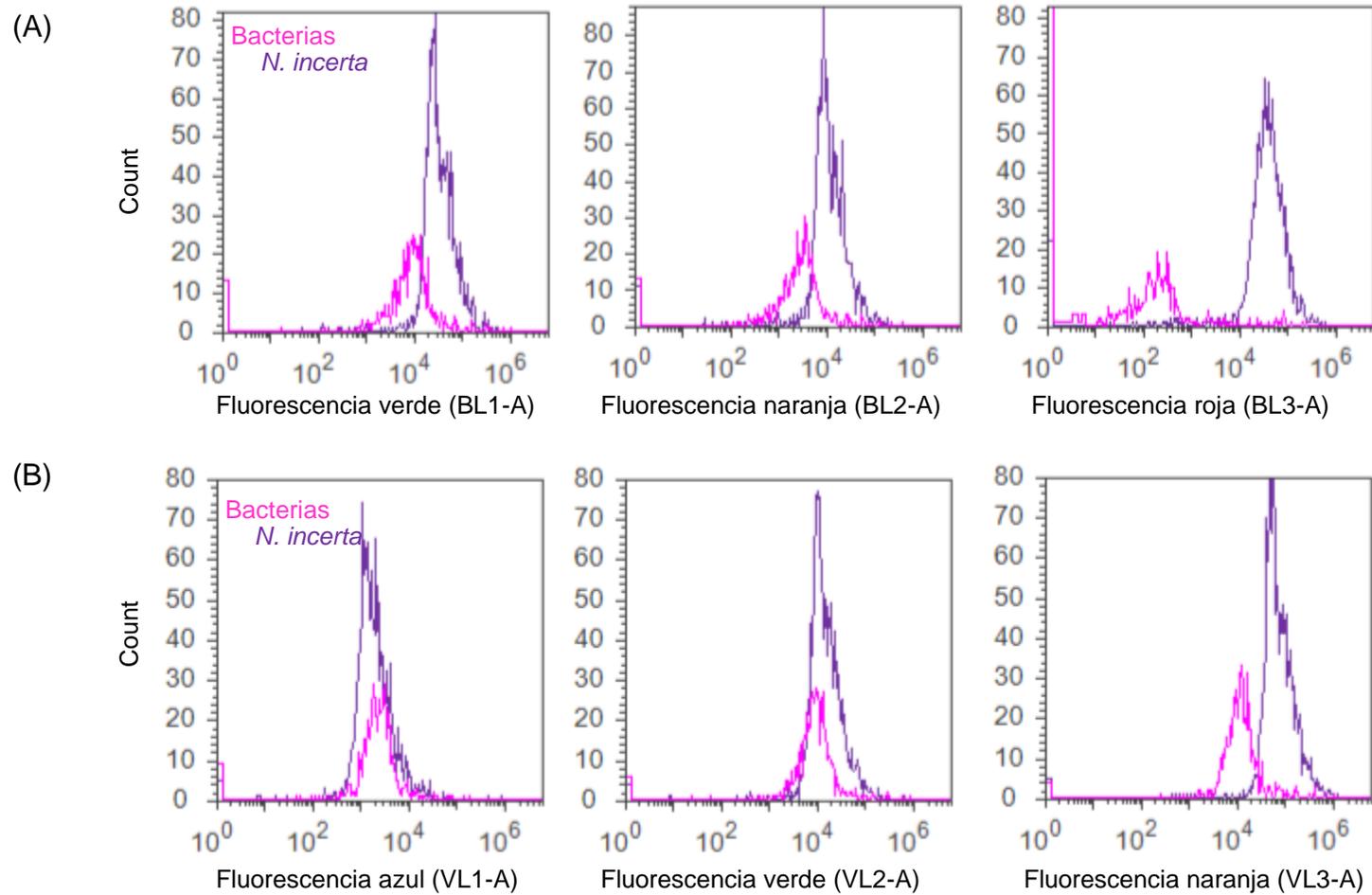


Figura A7.2. Señal de fluorescencia de bacterias y *N. incerta* en el Attune® Acoustic Focusing Cytometometer. A) Fuente de excitación con el láser Azul (488 nm) y fluorescencia con los filtros BL1 (530 nm), BL2 (577 nm) y BL3 (> 640 nm). B) Fuente de excitación con el láser Violeta (405 nm) y fluorescencia con los filtros VL1 (450 nm), VL2 (522 nm) y VL3 (603 nm).

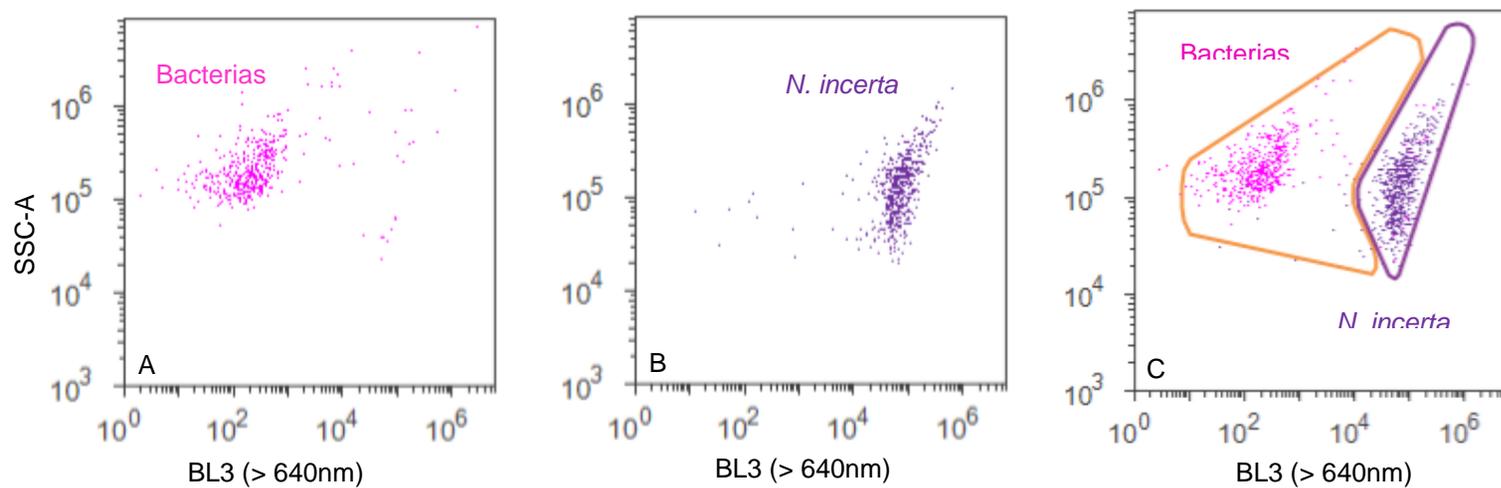


Figura A7.3. Análisis de citometría de flujo de células bacterianas (asociadas al cultivo de *N. incerta*) y *N. incerta*. A) Histograma biparamétrico (SSC-A vs BL3) en escala logarítmica de bacterias. B) Histograma de *N. incerta*. C) Ventanas de análisis para bacterias en naranja y *N. incerta* en morado.

Anexo 7. Pretratamiento del cultivo bacteriano en LB antes de la extracción de DNA con el Kit DNeasy® Blood and Tissue de Qiagen.

Obtener un cultivo celular con una densidad máxima de 2×10^9 células correspondiente a 2 unidades de densidad óptica (DO_{600nm}). La cantidad de células bacterianas por mL fue estimada considerando que una unidad de DO es igual a 1×10^9 células mL^{-1} (DNeasy® Blood and Tissue Handbook). Para realizar esta estimación se tomaron 2 μL del cultivo bacteriano antes de ser preservados en glicerol y se leyó su DO_{600nm} con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000).

Nota: En el presente trabajo, el cultivo celular se obtuvo de las bacterias crecidas en el medio de cultivo LB por un periodo de entre 12 y 18 h, del cual se tomaron 750 μL y fueron preservados con 250 μL de glicerol (ver sección 2.7.1).

1. Diluir la muestra con 500 μL de LB estéril y centrifugar a 16000 x g durante 10 min. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el precipitado en 1 mL de PBS (50 mM KH_2PO_4 y 150 mM NaCl) pH 7.4 estéril. Centrifugar a 16000 x g durante 10 min. Descartar el sobrenadante.

Continuar según el protocolo de extracción de DNA con el Kit DNeasy® Blood and Tissue de Qiagen. Considerar las siguientes especificaciones:

Adicionar 50 μL del amortiguador AE directamente sobre la membrana. Y seguir con el protocolo.

Nota: Para obtener el máximo rendimiento, repetir la elución.

Nota: en caso de que la columna se obstruya aumentar el tiempo de centrifugado.

Anexo 9.

Tabla A1.9. Resultados del análisis de homología del gen 16S rDNA región V7-V₉ realizado en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tratamiento	Muestra (día.UFC)	Especie más cercana en el NCBI		Cobertura (%)	Valor E	ID (%)	Acceso
		Género	Especie				
Nav inóculo	0	<i>Bacillus</i>	<i>B. hirokoshii</i>	100	9.00E-180	100	NR_119070
Navicula	2.1	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	100	7.00E-177	99	AB537163
		<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	100	7.00E-177	99	KF278709
Navicula	2.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	9.00E-180	100	CP004848
Navicula	8.1	<i>Bacillus</i>	<i>B. marisflavi</i>	100	3.00E-176	99	KJ575057
Navicula	8.2	<i>Bacillus</i>	<i>B. marisflavi</i>	100	9.00E-180	100	KJ575057
PET	2.1	<i>Hahella</i>	<i>H. chejuensis</i>	100	7.00E-166	98	NR_074812
PET	2.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	9.00E-180	100	CP004848
PET	8.1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	97	1.00E+175	100	FJ169986
PET	8.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	1.00E-175	99	CP004848
PHBv	2.1	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	2.00E-180	100	CP004848
PHBv	2.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	9.00E-180	100	CP004848
PHBv	8.1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	97	4.00E-175	100	FJ169986
PHBv	8.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	0.00E+00	100	CP004848
PHBb	2.1	<i>Sulfitobacter</i>	<i>S. marinus</i>	100	5.00E-167	100	NR_043936
PHBb	2.2	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>	100	9.00E-180	100	CP001103
PHBb	8.1	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fulva</i>	100	7.00E-166	98	NR_074659
PHBb	8.2	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. pachastrellae</i>	97	9.00E-169	99	EU603457