

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



INMOVILIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PIGMENTARIA EN  
TAPETES MICROBIANOS ARTIFICIALES

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

CARLOS GRANADOS MACHUCA

Ensenada Baja California, a 8 de Febrero de 1999

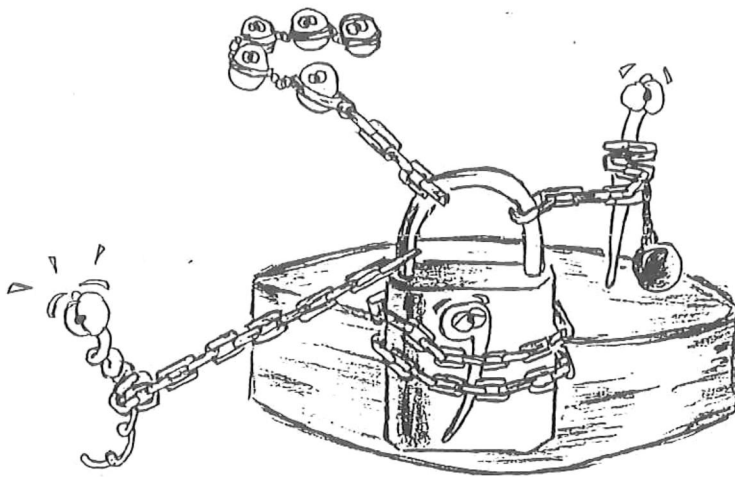
## RESUMEN

Se desarrolló una metodología sencilla y económica para la construcción de tapetes microbianos para su uso en la biorremediación de efluentes contaminados, principalmente de origen acuicultural. Para lograr dicho objetivo, se utilizó lana de fibra de vidrio como soporte del tapete, y un homogenizado de tapetes microbianos naturales del brazo San Quintín, de la Bahía de San Quintín, B.C. Estos tapetes presentan un patrón general en su distribución vertical, con comunidades autotróficas, heterotróficas, anaeróbicas estrictas y facultativas, así como quimiolitotróficas, sin embargo, estos tapetes son dominados por las algas azul-verdes (cianobacterias). Estas poblaciones forman estructuras laminadas debido a la limitación de luz y oxígeno a lo vertical del tapete. Un homogenizado de tapetes microbianos naturales aclimatados, se inoculó en los soportes de lana de fibra de vidrio. Se tomaron muestras durante 20 días. Se determinó el contenido de clorofila  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno y bacterioclorofila  $a$ .

A las concentraciones en mg/gr de muestra, se les aplicó la prueba estadística no paramétrica de Tukey, para comparaciones múltiple ( $\alpha = 0.01, 0.05$  y  $0.1$ ) respectivamente. No se encontró diferencias significativas entre 40 y 80 gramos de inóculo ( $\alpha = 0.01$ ), mientras que entre 40 y 120 ( $\alpha = 0.05$ ), así como entre 80 y 120 ( $\alpha = 0.01$ ) se encontraron diferencias significativas. El registro fotográfico indicó la presencia de la clorofita *Chlorella* sp., las cianobacterias *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Trichodesmium* sp., y *Anabaena* sp., así como la presencia de bacterias púrpuras.

Este estudio demuestra la factibilidad de fabricar biofiltros, de una manera práctica, a partir de tapetes naturales utilizando lana de fibra de vidrio como soporte. Nuestro trabajo indica que la lana de fibra de vidrio es un soporte adecuado por su estructura filamentosa, y el inóculo de 40 gramos fue el mejor, en la construcción de tapetes microbianos.

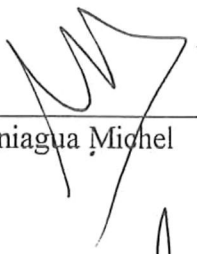
INMOVILIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PIGMENTARIA EN TAPETES  
MICROBIANOS ARTIFICIALES




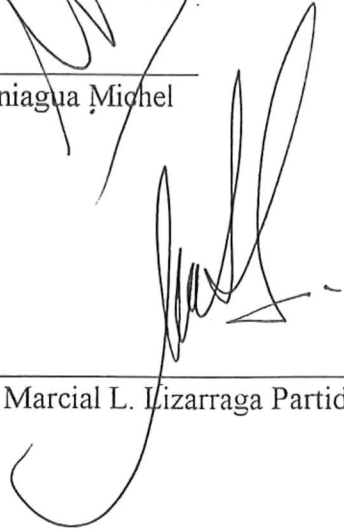
TESIS  
QUE PRESENTA

CARLOS GRANADOS MACHUCA

APROBADO POR

  
Dr. José de Jesús Paniagua Michel

  
Dr. José A. Zertuche González.

  
Dr. Marcial L. Lizarraga Partida

*DEDICATORIA*

Con amor para mí esposa Dolores y mis hijos Juan Carlos y Andrea

## AGRADECIMIENTOS.

A mi director Dr. José de Jesús Paniagua Michel, por sus consejos, orientación y paciencia durante el desarrollo del trabajo, así como la facilidad de utilizar equipo para el análisis de las muestras.

Al Dr. José A. Zertuche González y al Dr. Marcial L. Lizarraga Partida, por sus valiosos comentarios y correcciones al escrito.

Al Oc. Raúl Yepíz V. por su ayuda durante los análisis de la muestras y opiniones durante el procesado de los datos.

Al Dr. Eduardo Santamaria del Ángel por su asesoría en la aplicación estadística.

## INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general.	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Obtención de tapetes naturales	10
3.1.1. Localización del área muestreo	10
3.2. Aclimatación de los tapetes naturales	10
3.3. Preparación del inóculo	13
3.4. Construcción de tapetes	13
3.5. Registro de parámetros	18
3.6. Peso del sustrato	18
3.7. Peso inicial del inóculo	18
3.8. Extracción de pigmentos	18
3.9. Espectro de absorción	19
3.10. Análisis de pigmentos	20
3.11. Registro de microorganismos.	20
4. RESULTADOS.	22
4.1. Condiciones de cultivo y características de los tapetes sembrados	22
4.1.1. Aclimatación	22
4.1.2. Preparación del inóculo.	22
4.1.3. Construcción de tapetes.	22
4.1.4. Monitoreo de parámetros.	22
4.2. Espectros de absorción pigmentaria de los tapetes microbianos.	23
4.2.1. Espectro de absorción del primer muestreo ( día cero)	23
4.2.2. Espectro de absorción del cuarto muestreo (día siete)	25
4.2.3. Espectro de absorción de octavo muestreo ( día 15)	26
4.3. Concentración pigmentaria de los tapetes construidos	29
4.4. Determinación del tamaño óptimo de inóculo para la construcción de tapetes microbianos	32
4.4.1. Análisis estadístico	32
4.4.2. Razones pigmentarias	37
4.4.2.1. Clorofila/ $\beta$ -caroteno	37
4.4.2.2. Clorofila a / Bclorofila a	39
4.4.2.3. Ponderación de la concentración de pigmentos en relación al tamaño del inóculo	39
4.5. Microorganismos del tapete	40

INDICE GENERAL(Continuación)

5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIONES	56
7. LITERATURA CITADA.	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Longitudes de onda de los principales pigmentos fotosintéticos según la bibliografía	7
II	Concentración en mg/gr de $\beta$ -caroteno en tapetes construidos con 40, 80 y 120 grs.	30
III	Concentración en mg/gr de clorofila a en tapetes construidos con 40, 80 y 120 gr	31
IV	Concentración en mg/gr. de bacterioclorofila a en tapetes construidos con 40, 80 y 120 gr.	32
V	Comparación de los tres tamaños de inóculos, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey ( $\alpha = 0.01, 0.05$ y $0.1$ ) de comparación múltiple, para la concentración de $\beta$ -caroteno en mg/gr de muestra.	37
VI	Comparación de los tres tamaños de inóculos utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey ( $\alpha = 0.01, 0.05$ y $0.1$ ) de comparación múltiple, para la concentración de clorofila a en mg/gr de muestra	38
VII	Comparación de los tres tamaños de inóculos, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey ( $\alpha = 0.01, 0.05$ y $0.1$ ) de comparación múltiple, para la concentración de bacterioclorofila a en mg/gr de muestra.	38

LISTA DE FIGURAS ( Continuación)

17	Concentración de Clorofila <i>a</i> en mg/gr. de muestra, en los tapetes construidos con 80 gramos de inóculo.	34
18	Concentración de Clorofila <i>a</i> en mg/gr de muestra, en los tapetes construidos con 120 gr de inóculo	34
19	Concentración de Bacterioclorofila <i>a</i> en mg/gr. de muestra, en los tapetes construidos con 40 gramos de inóculo.	35
20	Concentración de Bacterioclorofila <i>a</i> en mg/gr. de muestra, en los tapetes construidos con 80 gr. de inóculo	35
21	Concentración de Bacterioclorofila <i>a</i> en mg/gr. de muestra, en los tapetes construidos con 120 gramos de inóculo.	35
22	Razones ( R ) Clorofila <i>a</i> / $\beta$ -caroteno en los tapetes construidos con 40, 80 y 120 gramos de inóculo.	41
23	Razones ( R ) Clorofila <i>a</i> / Bacterioclorofila <i>a</i> en los tapetes construidos con 40, 80 y 120 gramos de inóculo.	42
24	Ponderación de los componentes pigmentarios mayores (mg/gr.) en función con el tamaño de inóculo.	43
25	Fotografía <i>in vivo</i> de una parte del consorcio microbiano a) <i>Cymbella</i> sp. b) <i>Nitzschia</i> sp. c) <i>Navicula</i> sp. y d) <i>Anacystis</i> sp.	46
26	Fotografía <i>in vivo</i> de a) <i>Trichodesmium</i> sp. y b) <i>Oscillatoria</i> sp. ( masa de tricomas• y tricoma sencillo + )	49
27	Fotografía del consorcio microbiano <i>in vivo</i> . a) mostrando la matriz de cianobacterias ( + ) y bacterias púrpura ( • ). b) <i>Phormidium</i> sp. c) <i>Chlorella</i> sp. y d) <i>Anabena</i> sp.	50

## 1.- INTRODUCCION

El desarrollo acelerado de la Acuicultura Costera a nivel mundial ha traído como consecuencia una profunda perturbación sobre los ecosistemas, afectando no solo a las pesquerías sino a la Acuicultura misma y a los ecosistemas a través de la liberación de efluentes cargados con con nutrientes. Estas descargas ocasionan una eutroficación que puede conducir al deterioro de la calidad del agua ( Enander y Hasselstron, 1994).

Los nutrientes y desechos orgánicos principales que se generan en los cultivos intensivos de camarón, consisten de material sólido ( principalmente alimento no consumido, heces y fitoplancton) y metabolitos disueltos ( amonio, urea y dióxido de carbono) ( Phillips et al., 1993; Boyd y Clay, 1998 ). Estos componentes contaminan las zonas costeras, provocando efectos nocivos en los ecosistemas.

La depositación de desechos orgánicos de granjas de crustáceos, peces y moluscos bivalvos, influyen los ecosistemas bentónicos en la vecindad de las operaciones acuiculturales. Entre los cambios que ocurren se incluyen: la formación de sedimentos anóxicos, en casos extremos la liberación de dióxido de carbono, metano y sulfuro de hidrógeno, incrementando el consumo de oxígeno por el sedimento, flujo de nutrientes disueltos y cambios en la estructura de las comunidades bentónicas (Seafdec, 1995, Rosenthal, 1994).

Debido a los grandes volúmenes de agua que son descargados durante el desarrollo de actividades acuiculturales, es necesario diseñar métodos alternativos de tratamiento biológicos de bajo costo, y de acuerdo a los principios de preservación de las condiciones naturales de los cuerpos de agua receptores. En este contexto, el tratamiento biológico de efluentes se considera una alternativa para reducir el impacto sobre la calidad del medio ambiente externo al desarrollo acuicultural (Boyd y Clay, 1998).

Los procesos biológicos son más idóneos para eliminar la contaminación orgánica, que los mecanismos físicos y químicos, sin embargo, por sus altos costos requieren de adecuación para un funcionamiento eficiente en tratamientos de grandes volúmenes de agua.

Las aguas de desecho en drenajes domésticos o municipales, agrícolas o industriales, usualmente contienen grandes cantidades de nitrógeno y fósforo, aun cuando son tratadas en forma biológica por remoción de sólidos en suspensión (tratamiento primario) y remineralización bacteriana de compuestos orgánicos disueltos o tratamiento secundario (Scramm, 1991). Sin embargo, etapas adicionales para eliminar los elementos que permanecen en el efluente, podría incrementar los costos (Oswald, 1988b).

La aplicación de unidades independientes de cultivos de microalgas para el tratamiento terciario, basado en la habilidad de estos organismos para usar nitrógeno y fosfatos para su crecimiento (Richmond, 1986), su capacidad para

remover metales pesados ( Rai et al., 1981 ), así como también algunos compuestos orgánicos tóxicos (De la Noüe et al., 1992), se ha venido utilizando con frecuencias tanto en investigación como en aplicaciones precisas.

Los productores primarios han sido ampliamente utilizados en la remoción de nitrógeno y fósforo de efluentes contaminados ( Reddy y De Busk, 1987). Sin embargo, el tratamiento basado solo en organismos autótrofos sera limitado debido a la heterogeneidad de elementos, permitiendo que permanezcan como residuos secundarios. Además, los procesos de descomposición aerobia y anaerobia, ya sea algas o bacterias, se realiza de manera independiente, lo cual dificulta la cinética y eficiencia de remediación.

Los tratamientos biológicos que contemplen la participación heterótrofica puede ofrecer alternativas viables. Recientemente García (1996) obtuvo resultados satisfactorios de reducción de la carga orgánica y de remoción de compuestos nitrogenados mediante tapetes microbianos construidos a partir de aislados de tapetes microbianos naturales de Guerrero Negro B.C.S.. Sin embargo, por el nivel de nutrientes que estos tapetes trataron, se esperaría que cargas orgánicas superiores requieran de un sistema de tapetes más funcional y más estructurado.

Los tapetes microbianos se encuentran distribuidos a través de todo el mundo, principalmente en áreas donde las condiciones de climas áridos prevalecen a lo largo de la línea de costa. Sin embargo, estos pueden ser

localizados tanto en la parte supralitoral, como sublitoral (D'Antoni et al, 1989). Estos presentan un gradiente de especies y condiciones fisico-químicas con disposición vertical (Pfennig, 1986; Guerrero y Mas, 1989; Jorgensen 1989, y Pentecost, 1984). Estos factores influyen tanto la composición de especies, como la abundancia relativa de pigmentos (Stal, et al, 1985; Palmisano et al. 198). Debido a este gradiente, el crecimiento en los tapetes se da preferentemente en forma laminar, aunque la distribución de los microorganismos ocurre de una manera común en estas estructuras bentónicas (D'Antoni et al., 1989; Pfennig, 1986; Piersen et al, 1990 y Jorgensen y Des Marais, 1986)). Estas comunidades bentónicas llegan a crecer en pozas someras hipersalinas (Joergensen, 1989), así como en temperaturas que oscilan entre 18 a 35°C (Javor, 1984; Des Marais, 1989).

Los tapetes microbianos en el medio ambiente natural son comunidades bentónicas densas, conformados de cianobacterias (típicamente el principal organismo formador del tapete), bacterias fototróficas anaeróbicas y bacterias quimiolitotróficas. Estos también contienen poblaciones de bacterias heterotróficas (Villanueva et al., 1994, Bender et al, 1994). Los componentes autótrofos y fijadores de nitrógeno proveen nutrientes a los tapetes microbianos ( Pearl, et al., 1989). Su estructura se desarrolla en forma laminar y vertical debido a las condiciones físicas y químicas del lugar (Jorgensen y Des Marais, 1986).

En el medio natural, los tapetes microbiales juegan un papel importante como absorbentes, filtradores y transformadores de varios nutrientes y contaminantes, que incursionan en las zonas intermareales y costeras. Además de que los tapetes presentan zonas óxicas y anóxicas, por lo tanto pueden oxidar y reducir metales (Oren y Padan, 1978).

Actualmente existen escasas metodologías accesibles para la construcción de tapetes microbianos. A pesar de que en los últimos años la investigación para la construcción de tapetes microbianos se desarrolla de manera prometedora, esta pertenece a determinadas empresas, por lo que dichas investigaciones se encuentran patentadas. Aún cuando estas iniciativas son incipientes, otras aplicaciones referentes a la inmovilización de microorganismos ha avanzado en la implementación de una gran variedad de soportes para inmovilizar activamente la estructura interna del ecosistema: malla plástica (nylon) (Bender et al., 1991), matriz de ensilado de pasto (Phillips et al., 1994), fibra de vidrio (Bender et al., 1995, 1994), malla con coco o piedra caliza (Goodroad et al., 1995), forraje fermentado sobre balsas o biorreactores (Bender y Phillips, 1996).

Debido a que no es fácil obtener una metodología sistemática desarrollada por diferentes investigadores, es necesario realizar estudios básicos sobre la construcción de tapetes microbianos a partir de inóculos naturales con fines específicos.

La ventaja de utilizar inóculos naturales, se da en el momento en el cual el inóculo cubre la totalidad del soporte, reduciendo el tiempo en la colonización y activación de los tapetes, esto permite una mayor superficie para que se establezcan las bacterias y organismos autotrófos y heterótrofos. Además de su excelente capacidad de filtración, así como poderse construir de una manera sumamente económica, los ubica como una alternativa confiable enmarcada en los principios de la bio-remediación, como son no presentar contaminación secundaria, reciclado de los contaminantes y tecnología compatible ecológicamente.

Debido a la complejidad de los tapetes microbianos, se requiere identificar los grandes grupos de microorganismos contenidos en ellos, sustentándose en el principio de que los consorcios formadores poseen diferentes pigmentos característicos vía ácido mevalónico requeridos para realizar funciones básicas y accesorias en la fisiología de los componentes microbianos ( Tabla 1 ).

Entre estos se encuentran la clorofila  $\alpha$ , principal componente tanto de diatomeas y cianobacterias, que se considera el principal componente en el desarrollo del tapete, además de la bacterioclorofila  $\alpha$ , encontrada en las bacterias púrpuras y ubicadas en la tercera posición del tapete y por último las bacterias verdes sulfurosas, en las cuales se encuentra la bacterioclorofila  $c$ , como principal componente en el centro reactivo (fig.1). Con base en su

abundancia por cantidad de muestra tomada, se puede seleccionar la cantidad de inóculo necesario para la construcción del tapete.

Tabla 1.- Longitudes de onda de los principales pigmentos fotosintéticos según la bibliografía ( X= no reportadas )

Pigmentos	1	2	3	4	5	6	7	8
Carotenoides	X	400-500	465,495 455,481 447,477	X	X	X	480	X
Clorofila <i>a</i>	660,665	435 670-680	430, 664	675	680		X	664
Bclorofila <i>a</i>	768,770 591	375, 590, 790-810 830-920	368, 590 770	800, 850	850	770	X	X

(1) Stal et al., 1984

(2) Beverly et al., 1989

(3) Villanueva et al., 1994

(4) Ward et al., 1989

(5) Pfenning 1989

(6) Clayton, 1963.

(7) Sternan, 1988

(8) Strickland y Parson, 1972

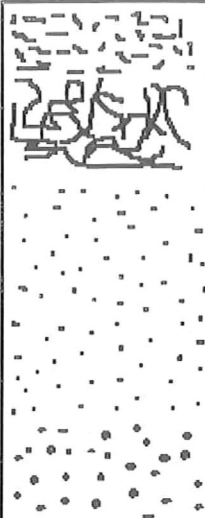
	Diatomeas y cianobacterias	Clorofila a
	Cianobacterias	
	Bacterias púrpuras sulfurosas	Bclorofila a
		Bclorofila b
	Bacterias verdes sulfurosas	Bclorofila c

Fig. 1. Componentes en los tapetes microbianos naturales

Con el incremento en la actividad acuicultural, y los grandes volúmenes de agua que son vertidos a cuerpos de agua marino y dulceacuícolas y a la carencia de metodologías alternativas dentro del contexto de biorremediación, se ve la necesidad de desarrollar una metodología práctica y económica en la construcción de tapetes microbianos. De tal manera, que en el presente trabajo se propone construir tapetes microbianos artificiales, a partir de homogeneizado de tapetes microbianos naturales, utilizando lana de fibra de vidrio como soporte, que contengan diversas comunidades y de fácil fabricación.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Construir y caracterizar tapetes microbianos destinados para la biorremediación de efluentes acuiculturales marinos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- .- Construcción de tapetes microbianos sobre soporte de lana de fibra de vidrio.
- .- Determinar la cantidad de inóculo necesario en la construcción de tapetes microbianos.
- .- Evaluar los componentes pigmentarios, como un índice de caracterización para la construcción de tapetes microbianos.
- .- Caracterizar morfológicamente algunos de los componentes principales de los tapetes construidos e identificarlos a nivel de grandes grupos taxonómicos..

### 3.- MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1.- OBTENCION DE TAPETES NATURALES.

##### 3.1.1. Localización del área de muestreo.

Se colectaron tapetes microbianos naturales, en Bahía de San Quintín, en la parte Norte del Brazo San Quintín, Baja California, México (Fig. 2). Estos tapetes fueron colectadas durante el mes de Agosto de 1998 en pozas durante el período de marea baja. La salinidad al momento del muestreo se encontraba en 65 o/oo y la temperatura en 35°C. Una vez colectados, los tapetes (fig.3) fueron colocados en una hielera (fig. 4) conteniendo el agua del sitio de colecta y trasladados al laboratorio de la Facultad de Ciencias Marinas. En el laboratorio, los tapetes se colocaron en acuarios, inicialmente con agua del lugar de muestreo. Se le añadió suficiente agua para que estos fueran cubiertos, aproximadamente 5 cm.

#### 3.2- ACLIMATACION DE LOS TAPETES NATURALES

Con el fin de aclimatar a los tapetes a las condiciones de 5 o/oo más similares (36-40 o/oo) a la de los efluentes semi-extensivos de cultivos de camarón, se inició un proceso de aclimatación gradual. Se disminuyó progresivamente la salinidad del medio natural (60 o/oo) a intervalos de 5 o/oo por períodos de 3 días. Durante el tiempo de aclimatación diariamente se repuso la agua evaporada, utilizado un medio inorgánico (Allen y Arnon, 1955) y un medio con compuestos orgánicos BG (Thompson et al., 1988) para

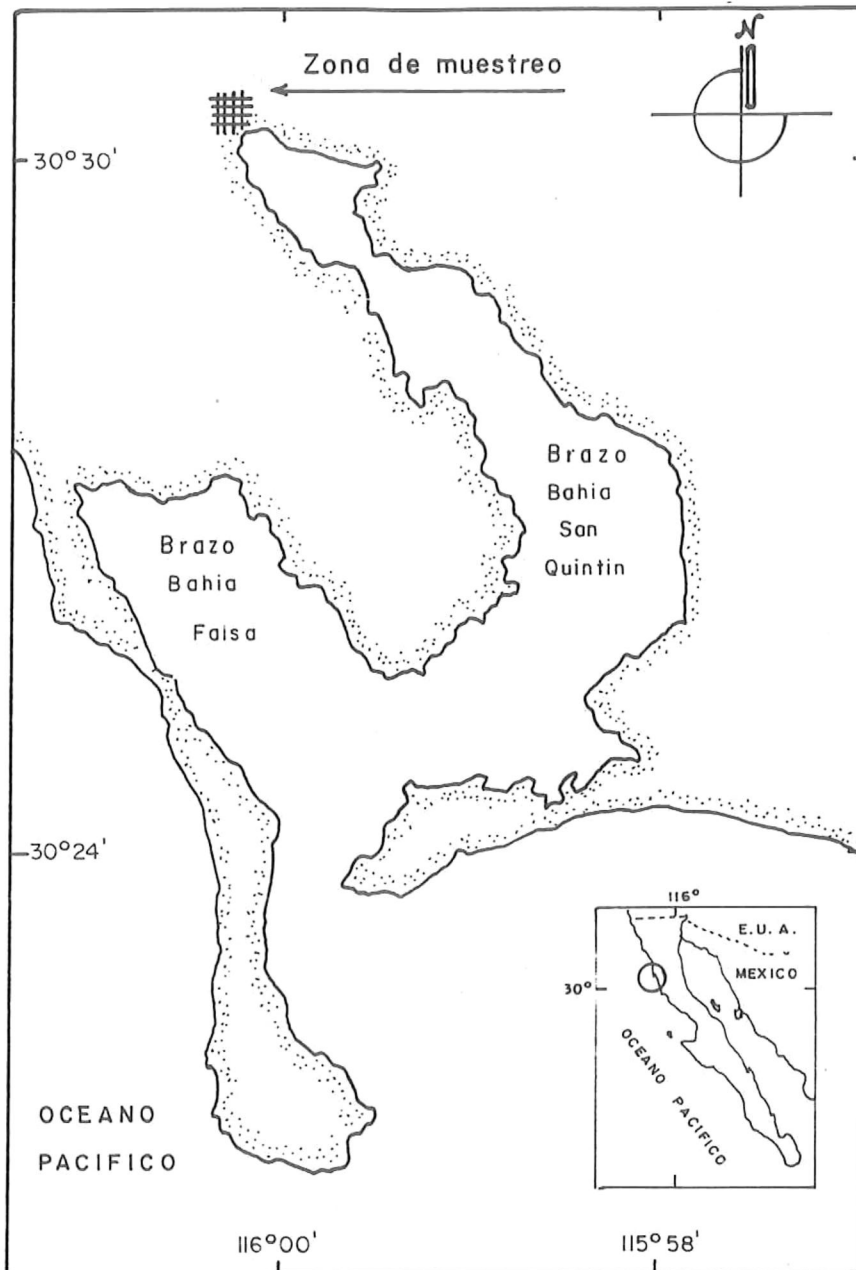


Fig. 2. Localización del area de muestreo de los tapetes microbianos naturales.



Fig. 3. colecta de tapetes microbianos naturales.

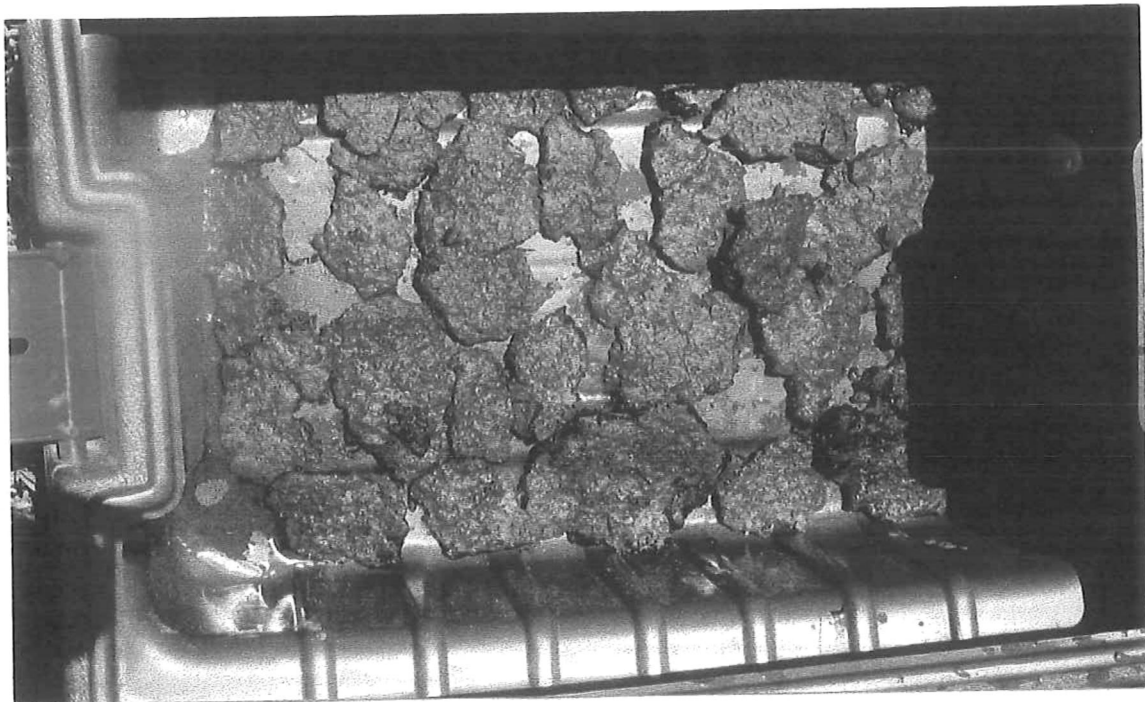


Fig. 4. Tapetes microbianos naturales en hieleras.

algas verde-azules disueltos en agua dulce para reducir la salinidad. La mezcla de medio de cultivo fue utilizada durante los días impares y agua dulce sola los días pares, durante los 15 días que duró la aclimatación (fig. 5).

### 3.3- PREPARACIÓN DEL INOCULO.

Los tapetes naturales aclimatados a salinidad de 40 o/oo, fueron limpiados eliminando la parte inerte de los mismos. Se eligieron los primeros 5mm del tapete natural, ya que la parte viva del consorcio se encuentra en solo unos milímetros de grosor. Una vez seleccionado el material a utilizar, fue introducido a una licuadora ( fig. 6) para su homogenización utilizando un poco de agua de la encontrada en los tapetes. El producto homogenizado obtenido en forma de pasta fue utilizado posteriormente para sembrar soportes inertes (fig.7a, b)

### 3.4.- CONSTRUCCION DE TAPETES.

En previos experimentos ( Bender et al., 1994; García, 1996 ) se observó que la lana de fibra de vidrio presentaba una superficie en la cual el inóculo se adhería perfectamente, por lo que se decidió utilizarlo. Así se realizaron seis secciones de  $266 \text{ cm}^2$  (19 x 14 cm ) ( fig. 8).

Se utilizó como unidad de referencia la cantidad de inóculo necesario para lograr la cobertura mínima sobre el soporte destinado para la construcción de cada tapete (  $0.150 \text{ gr/cm}^2$  ). Partiendo de esta cantidad, se sembraron dos tapetes con 40 gr, cada uno, dos tapetes con incrementos en una, así como



Fig. 5. Acondicionamiento de los tapetes naturales en el laboratorio.

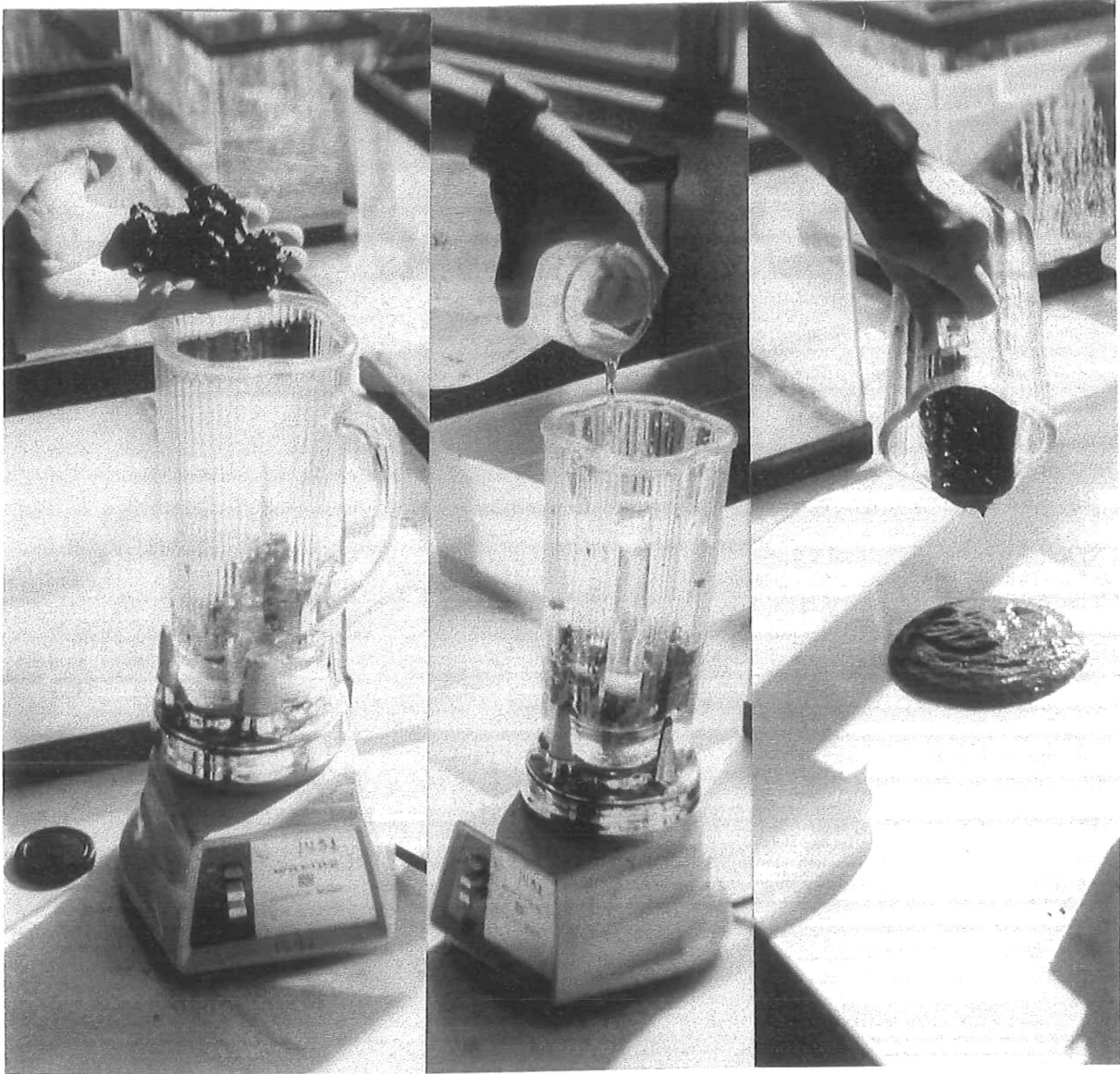
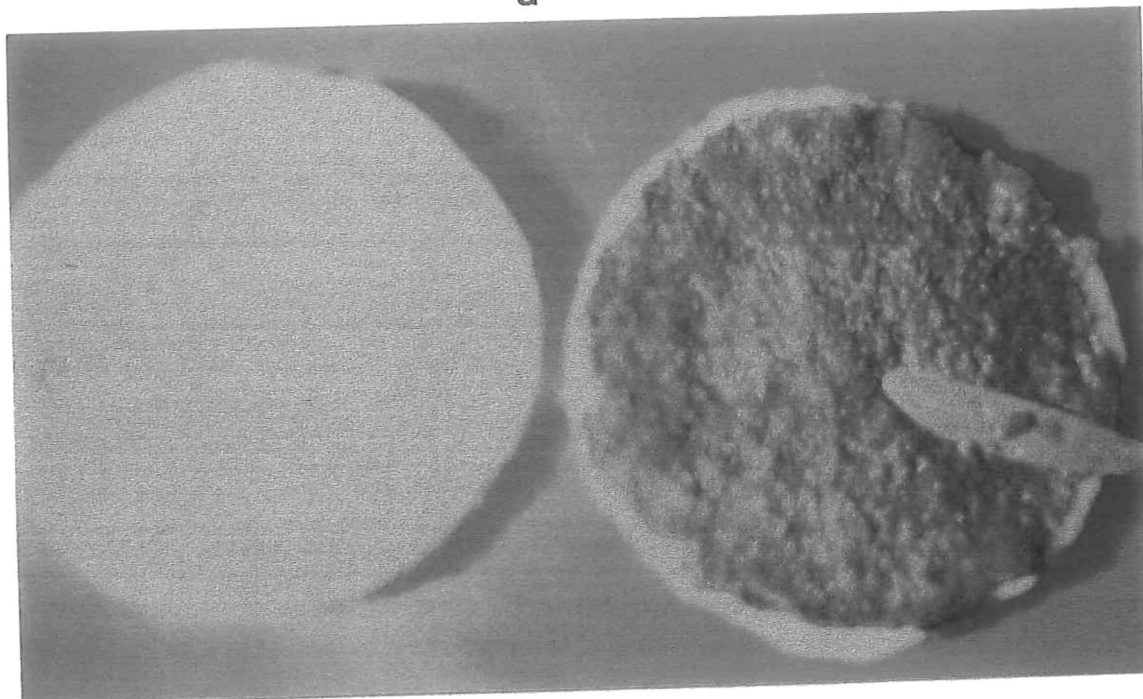


Fig. 6. Homogeneizado de los tapetes microbianos naturales acondicionados

a



b

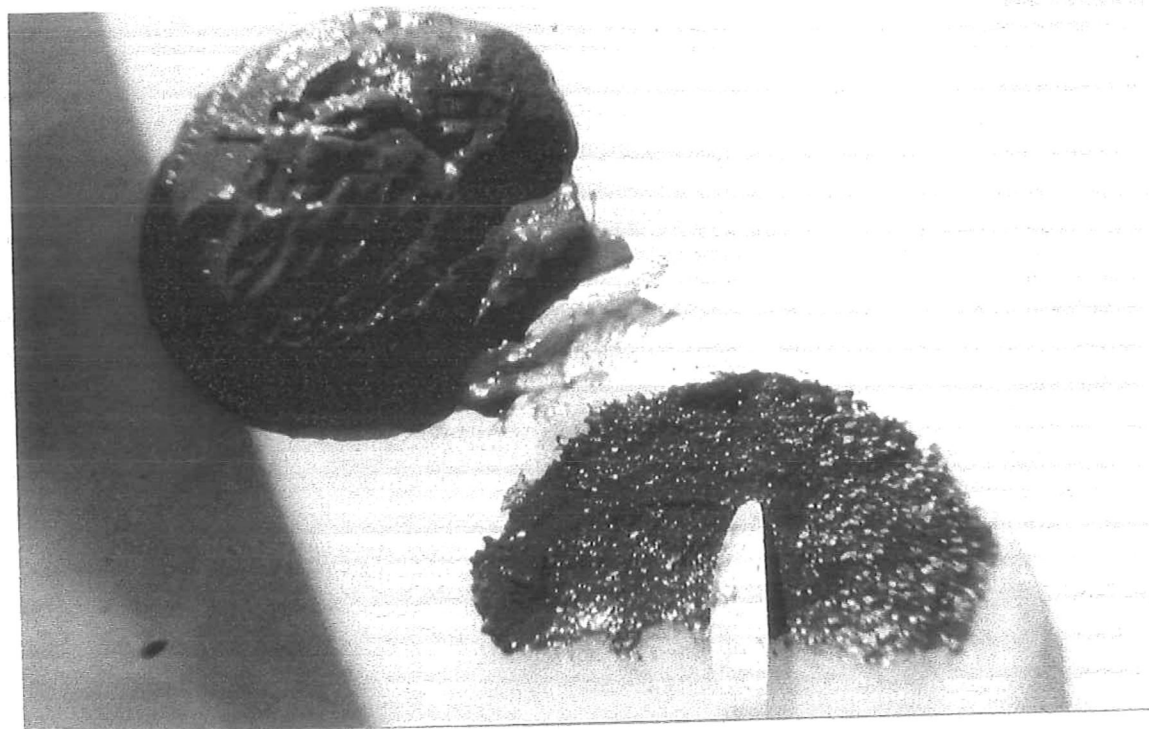


Fig. 7. Soporte utilizado en la construcción de los tapetes microbianos ( a ) .  
Homogeneizado y aplicación del homogeneizado ( b )

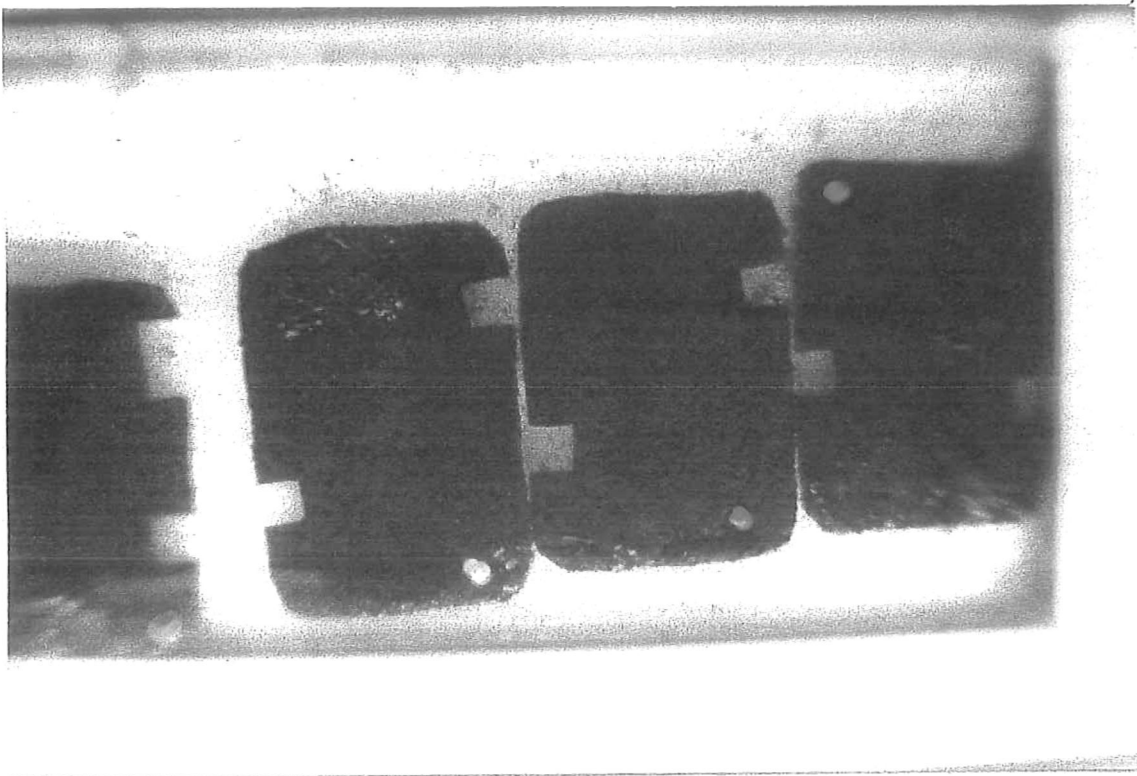


Fig. 8. Muestreo de los tapetes construidos.

dos veces la unidad de referencia. Las cantidades de inóculo determinadas fueron  $0.300 \text{ gr/cm}^2$  ( 80 gr,) y  $0.451 \text{ gr/cm}^2$  (120 gr,) de inóculo.

### 3.5. REGISTRO DE PARÁMETROS.

Los parámetros que se registraron sistemáticamente durante el experimento fueron la temperatura y la salinidad. Debido a que se trabajó con un sistema cerrado, fue necesario observar estos parámetros diariamente.

Las lecturas de temperatura se registraron utilizando un termómetro marca BGR con un intervalo de  $+120 -50$  (  $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  ). La salinidad fue medida utilizando un refractómetro marca Reichert-Jung. (  $0.2 \text{ o/oo}$  )

### 3.6.- PESO DEL SUSTRATO.

Del soporte utilizado en la construcción de los tapetes, se cortaron cinco fracciones de  $4 \text{ cm}^2$  cada una, se pesaron y se determinó su peso promedio.

### 3.7.- PESO SECO INICIAL DEL INÓCULO

Se eligió un tapete para determinar el peso medio de cada tapete una vez inoculado. Se cortó una fracción de  $4 \text{ cm}^2$ , dividiéndola en 4 subfracciones de  $1 \text{ cm}^2$ . Posteriormente se determinó su peso húmedo, después fueron colocadas en la estufa a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas hasta peso constante, y posteriormente se determinó su peso seco.

### 3.8.- EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS.

Los muestreos se iniciaron el día en que fueron inoculados los soportes, y posteriormente cada dos días, durante 18 días. Se cortó aleatoriamente una

sección de 4 cm<sup>2</sup> de cada inóculo. Esta se dividió en cuatro secciones de 1 cm<sup>2</sup> las cuales se pesaron en una balanza marca OHAUS (0.0001 g), posteriormente fueron introducidas en tubos de extracción de plástico de 14 ml y se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C en un refrigerador por 24 horas, tiempo necesario para la extracción de pigmentos.

Anterior al inicio del proceso de extracción, se realizó una prueba para determinar la concentración de solvente a utilizar. Para esto fueron utilizadas cuatro diferentes combinaciones de solvente. Se determinó una relación de metanol/hexano 5: 7 (v/v), (metanol/hexano), para las bacterioclorofilas y 6.5 ml de acetona para la clorofila a y β-caroteno. La extracción se realizó inmediatamente después de haberse llevado a cabo el muestreo.

### 3.9.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN.

Después de 24 horas, los extractos obtenidos fueron centrifugados para eliminar impurezas y se mantuvieron a 4°C previo a su análisis. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Hewlet-Packard modelo HP 8453 con arreglo de diodos, utilizando un barrido continuo de longitudes de onda entre 119 - 900 nm.

El análisis de pigmentos se realizó en penumbra y utilizando luz verde para evitar excitación de citocromos e interferencia en la cuantificación de pigmentos

### 3.10.- ANALISIS DE PIGMENTOS.

La concentración de la clorofila  $a$  se determinó mediante el empleo de las ecuaciones propuestas por Stermán (1988) , mientras que para el caso de los carotenoides totales se utilizó la ecuación de Strickland y Parson (1972) . En ambos caso en  $\mu\text{g/ml}$  y se utilizó acetona como solvente.

$$\text{Cl } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Caro} = 4.0 A_{480}$$

Las concentraciones de bacterioclorofila  $a$  fueron estimadas mediante una curva de calibración empleado un estándar comercial y metanol como solvente (fig. 9).

### 3.11.- REGISTRO DE MICROORGANISMOS.

Se realizaron observaciones utilizando un microscopio compuesto, para determinar la presencia de algunos microorganismos formadores de los tapetes y se tomaron fotografías de los mismos.

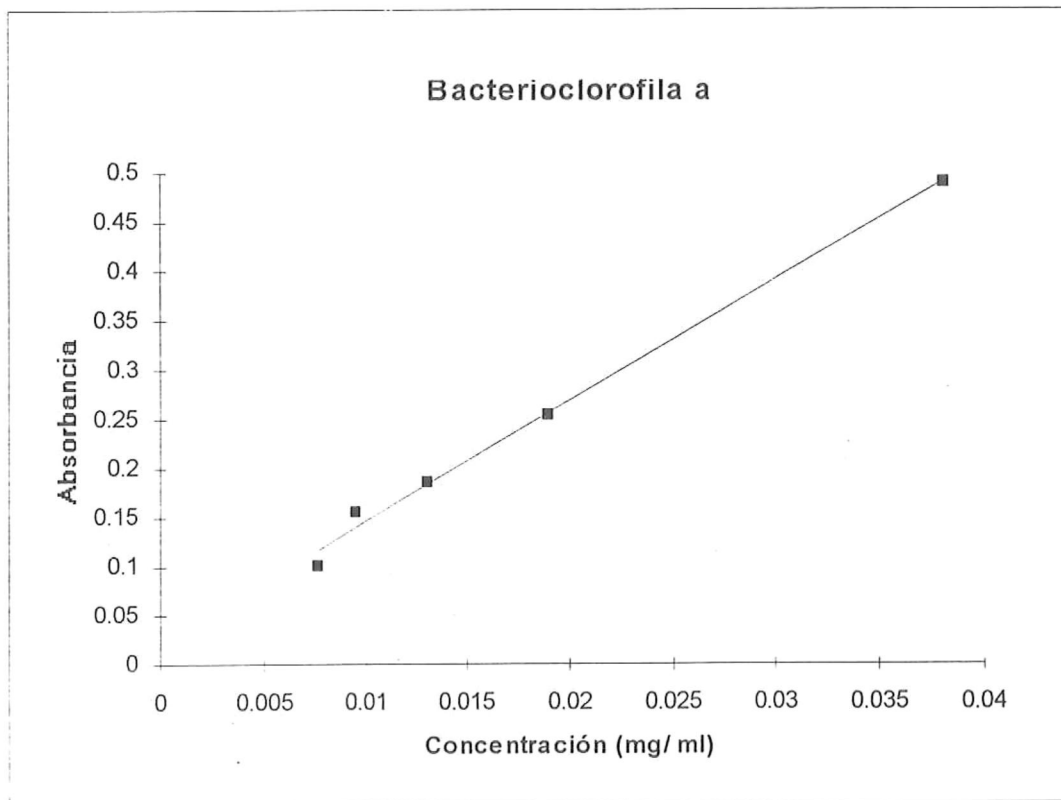


Fig. 9.- Curva de calibración para la estimación de la concentración de bacterioclorofila *a* en los tapetes construidos.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. CONDICIONES DE CULTIVO Y CARACTERISTICAS DE LOS TAPETES SEMBRADOS.

#### 4.1.1. Aclimatación.

Los tapetes respondieron bien al período de aclimatación, evidencia de ello fue la permanencia de la capa autotrófica de los tapetes, indicando buenas condiciones de ellos durante los 15 días de aclimatación.

#### 4.1.2. Preparación del inóculo.

Los tapetes microbianos naturales aclimatado, fueron colocados en una licuadora, obteneiendose un material pastoso y fácil de ser inoculado en los soporte utilizados para su construcción.

#### 4.1.3. Construcción de tapetes.

Con el fin de realizar una estandarización de las cantidades de los homogenizados de los inóculos sembrados en relación al soporte utilizado, se estimó el peso promedio de el algodón de fibra de vidrio utilizado. Así se determino un peso de  $0.016 \text{ g/cm}^2$ .

Del peso seco de cada tapete se obtuvieron las determinaciones promedio de la biomasa seca, mismas que fueron  $0.049$ ,  $0.075$  y  $0.1321 \text{ g/cm}^2$  para los tapetes con 40, 80 y 120 g de inóculo respectivamente.

#### 4.1.4. Monitoreo de parámetros.

Se registrarón temperaturas promedio de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  durante la mañana, mientras que por la tarde el promedio estimado fue de  $36 \pm 2^\circ \text{C}$

La salinidad promedio a la cual se mantuvieron los tapetes, esta fué de  $36 \pm 3$  o/oo. Aunque la temperatura estuvo regida por el medio ambiente, la concentración de la salinidad ajustada mediante agua corriente obedeció a que se trató de semejarse lo más posible a las condiciones prevaecientes en los efluentes de granjas de cultivo semiintensivos de camarón.

#### 4.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN PIGMENTARIA DE LOS TAPETES MICROBIANOS.

##### 4.2.1. Espectro de absorción del primer muestreo ( día cero)

Los espectros de absorción para los tapetes construidos con 40, 80 y 120 gramos de inóculo, se presentan en las figuras 10-12. Para el primer día de muestreo en los tres tamaños de inóculos, se observaron los componentes típicos del espectro de absorción de los fotoautótrofos y fotoheterótrofos. La componente en la región del violeta y azul del espectro (400-500) se encuentra claramente definida en los tres tamaños de inóculos, sin embargo, en los tapetes con 40 gramos de inóculo se registró una absorbancia considerablemente menor (fig.10). Las componentes carotenoides registraron una absorbancia considerable en acetona. Se registró el máximo característico del pigmento  $\beta$ -caroteno a los 480 nm, de diatomeas y cianobacterias y otras microalgas eucariotas (*Chlorella* sp. *Dunaliella* sp.) consideradas como los componentes

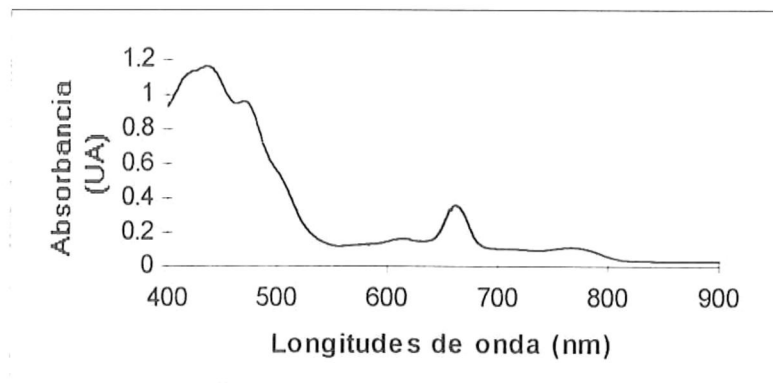
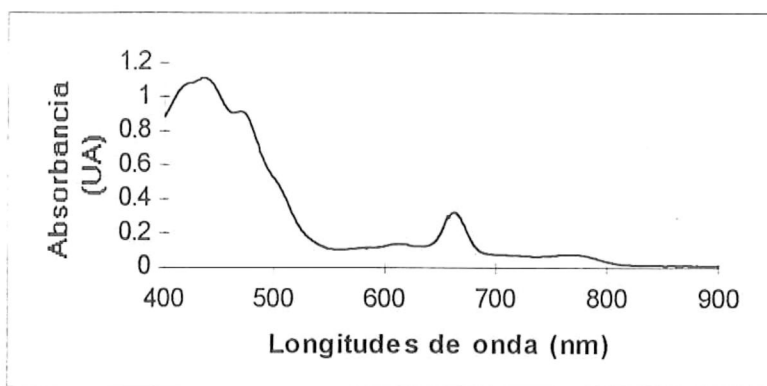
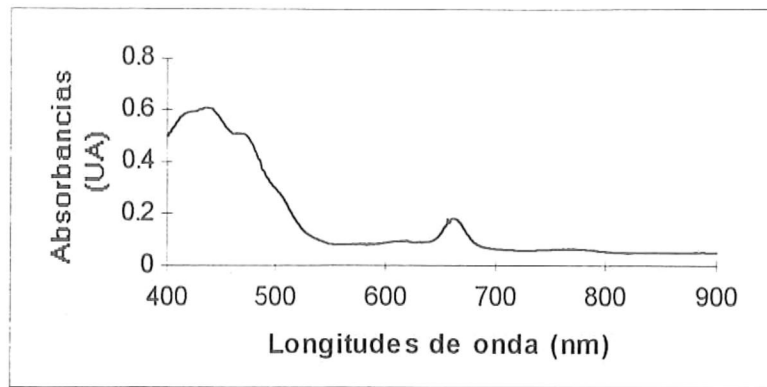


Fig. 10. Comparación de espectros de absorción pigmentaria del día cero, entre 40,80 y 120 gramos de inóculo.

fotoautótrofos principalmente y en menor grado fotoheterótrofos en el consorcio del tapete. Sin embargo, se observó una disminución en el verde-naranja del espectro (500-600 nm), representado por ficobilinas, absorbiendo en los 300 nm. Esta disminución fué más evidente en los tapetes con 40 gr de inóculo ( fig 10), que presentan una absorbancia muy similar los tapetes construidos con 80 y 120 gr de inóculo.

Se observó claramente un incremento en la región de rojo del espectro (650-680) cuya componente principal a 665 nm corresponde a la clorofila  $\alpha$ , pigmento registrado tanto en diatomeas como cianobacterias. Este incremento fué mas marcado en los tapetes con 80 y 120 gr (fig. 10), mientras que en los tapetes con 40 gr se presentó la menor absorbancia registrada en esta sección del espectro. Posteriormente se presentó una disminución al final del rojo mismo que continua hacia el infrarojo (700-900). La componente principal en esta región asociada a las bacterias púrpura y bacterias verdes sulfurosas en los tapetes, presentan máximos de absorbancias principalmente a los 770 nm y 900 nm respectivamente.

#### 4.2.2. Espectro de absorción del cuarto muestreo (día siete)

Los análisis pigmentarios del cuarto día de muestreo en los tres tamaños de inóculos indican un comportamiento similar al inicio del muestreo, con los componentes típicos del espectro, y una clara intensificación en la región violeta-azul del espectro, caracterizada por los carotenoides del tapete (400-

500 nm). Sin embargo, la intensificación se ve más marcada en los tapetes construidos con 80 y 120 gramos de inóculos (fig.11), con las menores absorbancia en esta región, en los tapetes con 40 gramos. Posteriormente se registró una disminución muy marcada hacia la región del verde-naranja, espectro representado por la ficoeritrinas (566 nm). Un incremento muy similar se dió en la región de naranja-rojo del espectro (650-680) en los tres tapetes . En esta región representada por la clorofila *a*, asociada a la presencia de organismos fotoautótrofos en el tapete (diatomeas, flagelados y cianobacterias). Hacia final del espectro (700-900 nm), región del rojo e infrarojo, se presentó una disminución muy similar y además esta caracterizada por la presencia de bacterioclorofila *a* (770 nm) y bacterioclorofila *b* (900 nm), y representadas por las bacterias púrpura y bacterias verdes sulfurosas respectivamente.

#### 4.2.3. Espectro de absorción del octavo muestreo.( día 15 )

Después de dos semanas se pudo observar que la región del violeta -azul se presentó claramente definida (400-500), sin embargo, se observaron diferencias marcadas entre los tres tamaños de inóculos. Una forma muy similar se determinó en el espectro en los tapetes con 40 y 80 gr de inóculo (fig. 12). En los tapetes con 40 gr se registrarón las menores absorbancias, mientras que en los tapetes con 120 gr las mayores. Esta región del espectro, se

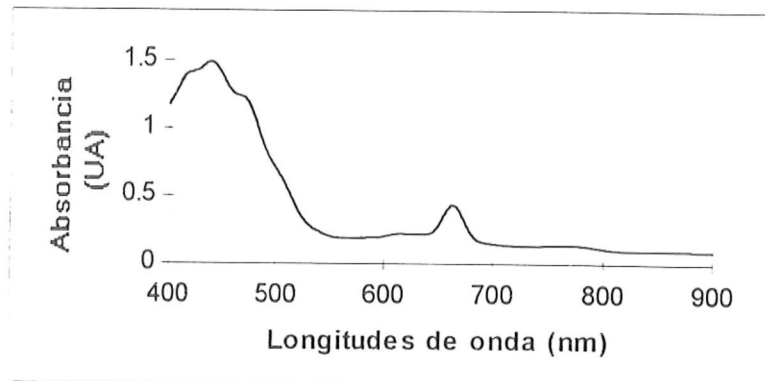
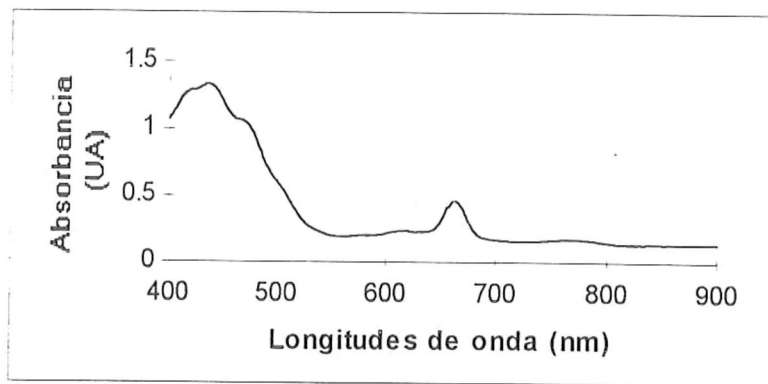
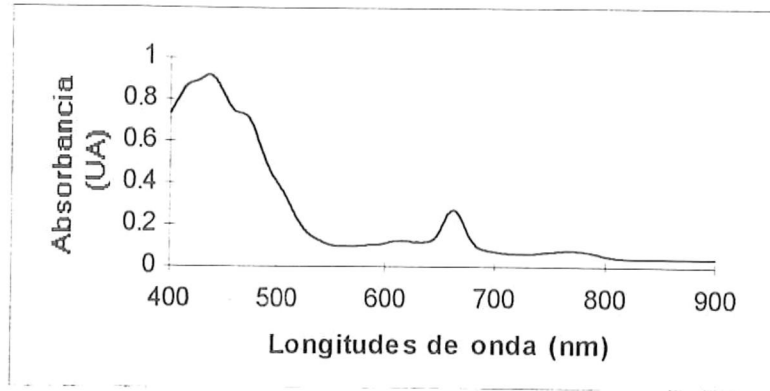


Fig. 11. Comparación de espectros de absorción pigmentaria del día siete, entre 40,80 y 120 gramos de inóculo.

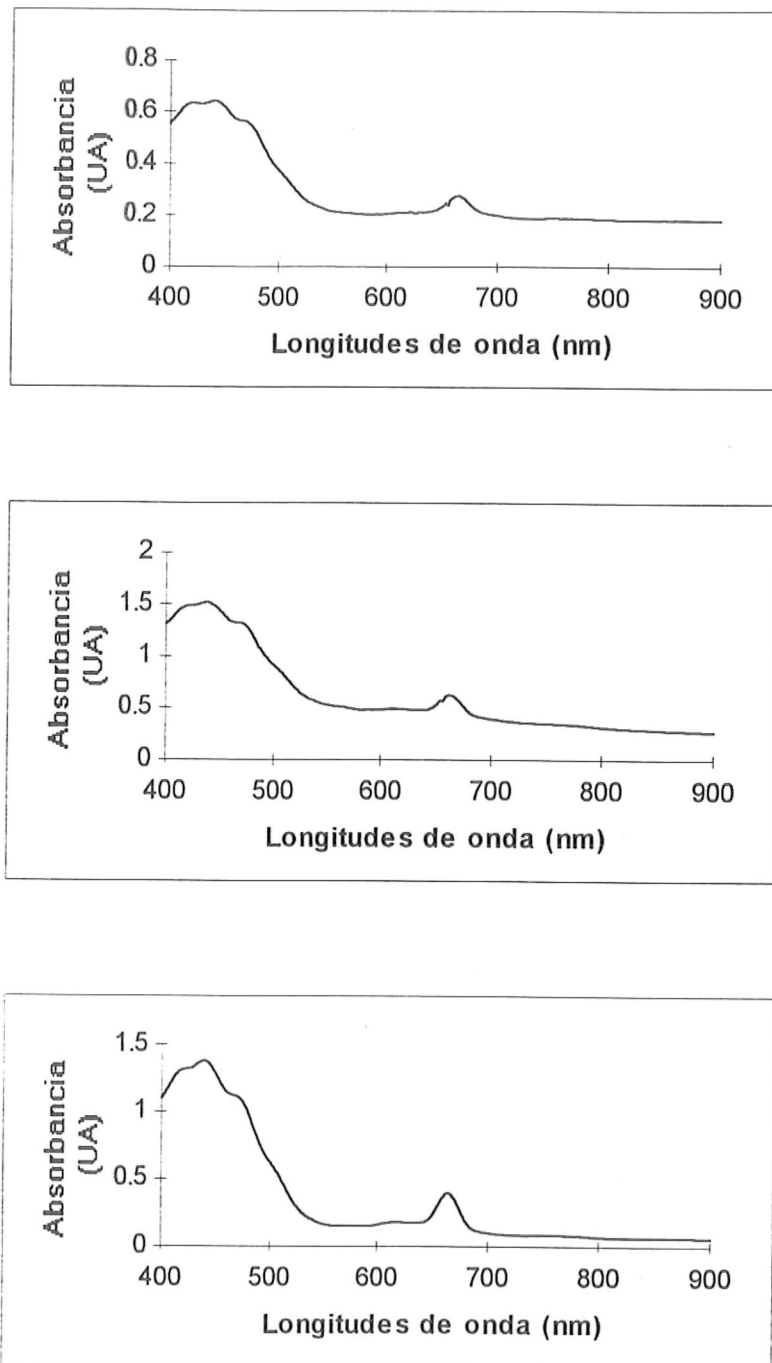


Fig. 12. Comparación de espectros de absorción pigmentaria del día quince, entre 40, 80 y 120 gramos de inóculo.

encuentra asociada a los carotenoides del tapete, a su vez relacionados con diatomeas, flagelados y cianobacterias.

En la región del verde-naranja (500-600 nm) caracterizada por las ficoeritrinas (566 nm), se observó una marcada diferencia entre los tres tamaños, con una menor disminución en los tapetes con 80 gr, seguido por los de 40 gr y finalmente la menor absorbancia, se encontró en los tapetes con 120 gr de inóculo.

En la región del naranja-rojo (650-680 nm) la absorbancia fue mayor en los tapetes con 80 gr de inóculo, seguido por los de 40 y finalmente de 120 gr. En esta región se encuentra como componente principal a la clorofila *a* (665 nm).

Tanto en los tapetes con 80, como en los de 120 gr se observó, en la región del rojo-infrarojo, una disminución, aunque esta se registró con mayor intensidad en los construidos con 120 gr de inóculo (fig. 12). En los tapetes con 40 gr las absorbancias se mantuvieron casi constantes en esta región del espectro (700-900), caracterizada por la presencia de bactericlorofila *a* y bacterioclorofila *b* (770 y 900 nm, respectivamente).

#### 4.3. CONCENTRACIÓN PIGMENTARIA DE LOS TAPETES MICROBIANOS CONSTRUIDOS.

Las concentraciones de  $\beta$ -caroteno registradas en los tres tamaños de inóculos, se presentan en la Tabla II, además de la secuencia gráfica de estas en la figuras 13-15 respectivamente. En las gráficas 13-15, se observó una concentración inicial de aproximadamente 0.26 mg/gr en los tres inóculos. Un comportamiento casi constante en los 120 gr (alrededor de 0.3 mg/gr). Una característica similar se registró en el tapete construido con 80 gr de inóculo, cuyas concentraciones tuvieron alrededor de 0.35 mg/gr de muestra. Sin embargo, en los 40 gr de inóculo, puede observarse mayor concentración de  $\beta$ -caroteno, con incremento hacia los últimos muestreos del experimento.

Tabla. II. Concentración (mg/gr.) de  $\beta$ -caroteno en tapetes contruidos con 40,80 y 120 grs.

	40 gramos	80 gramos.	120 gramos
Muestra	C O N C E	N T R A C	I O N E S
1 (0 días)	0.2606	0.2987	0.2129
2 (3 días)	0.2436	0.4435	0.3085
3 (5 días)	0.1757	0.3391	0.3274
4 (7 días)	0.6216	0.3728	0.3205
5 (9 días)	0.6277	0.3231	0.2673
6 (11 días)	0.6145	0.5655	0.2667
7 (13 días)	0.3548	0.4377	0.2894
8 (15 días)	0.3636	0.3660	0.3184
9 (17 días)	0.6161	0.3159	0.2479

Las concentraciones de clorofila a en mg/gramo de muestra en los tres tamaños de inóculos son presentadas en la Tabla III, y su representación gráfica en las figuras 16-18. Gráficamente se puede observar una concentración

alrededor de los 0.3 mg/gr de muestra en los tres tamaños de inóculos. Se observa un comportamiento más irregular en los 40 gr de inóculos, con disminuciones muy marcadas los primeros días, para presentar incrementos marcados la mitad del experimento, para disminuir durante los tres últimos muestreos. Sin embargo, en los inóculos de 80 y 120 gr, se observó un comportamiento más constante a lo largo del experimento, con concentraciones muy similares.

Tabla III. Concentración (mg/gr) de **Clorofila  $\alpha$**  en tapetes construidos con 40,80 y 120 grs

	40 gramos	80 gramos	120 gramos
Muestra	C O N C E	N T R A C	I O N E S
1 (0 días)	0.3293	0.3759	0.2685
2 (3 días)	0.3534	0.5311	0.4633
3 (5 días)	0.2457	0.4920	0.4775
4 (7 días)	0.8944	0.5657	0.4854
5 (9 días)	0.9335	0.4775	0.4281
6 (11 días)	0.8926	0.8076	0.3804
7 (13 días)	0.5388	0.6265	0.4115
8 (15 días)	0.5646	0.5099	0.4591
9 (17 días)	0.4426	0.4000	0.3671

Las concentraciones en mg/gr correspondientes a la bacterioclorofila  $\alpha$  para los tres inóculos son presentadas en la tabla IV, así como su curva de calibración fig. 9, así como su respectivo comportamiento gráfico figuras 19-21. En las figuras se observa una concentración inicial muy parecida, sin embargo, las concentraciones más altas son observadas en 80 y 120 gramos de inóculo, aunque se observa mayor variación en los 120 gramos.

Tabla IV. Concentración ( mg/gr.) de **Bacterioclorofila  $\alpha$**  en tapetes contruidos con 40,80 y 120 grs.

	40 gramos	80 gramos	120 gramos
Muestra	C O N C E	N T R A C	I O N E S
1 (0 días)	0.7962	0.5520	1.0310
2 (3 días)	0.3350	0.3345	0.1168
3 (5 días)	0.4120	0.4323	0.4493
4 (7 días)	0.6508	0.6924	0.2229
5 (9 días)	0.5452	0.5370	0.3563
6 (11 días)	0.5216	1.3735	0.5520
7 (13 días)	0.6015	0.4514	0.1852
8 (15 días)	0.1538	0.9543	1.0110
9 (17 días)	0.4751	0.4064	0.3234

#### 4.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO OPTIMO DE INÓCULO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE TAPETES MICROBIANOS.

##### 4.4.1.- Análisis Estadístico.

Debido a que las concentraciones no presentaban una distribución normal, se les aplicó una prueba estadística no paramétrica de Tukey, Tukey(1953 en Zar, 1984) a tres niveles de confianza (  $\alpha = 0.01, 0.05$  y  $0.1$  ), para comparaciones múltiples en los tapetes con 40, 80 y 120 gr. de inóculo. Esta prueba fué aplicada para  $\beta$ -caroteno, clorofila  $\alpha$  y bacterioclorofila  $\alpha$ .

La comparación de  $\beta$ -caroteno para los tres tamaños de inóculos, se presenta en la tabla V. Al realizar la comparación entre los tapetes con 40 (1) contra 120 gr (3), se encontro diferencia entre ellos, en los tres niveles de

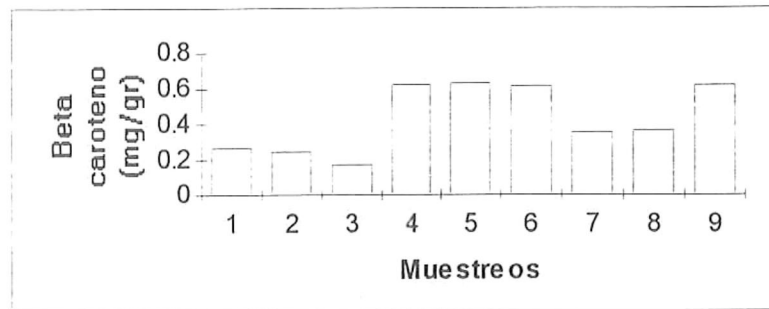


Fig. 13. Concentración de  $\beta$ -caroteno, en los tapetes construidos con 40 gramos de inóculo

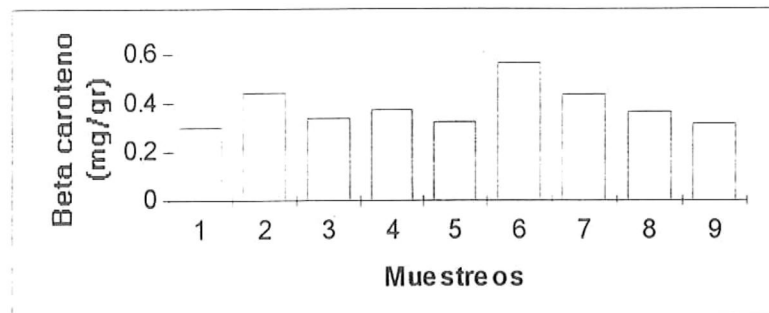


Fig. 14 Concentración de  $\beta$ -caroteno, en los tapetes construidos con 80 gramos de inóculo.

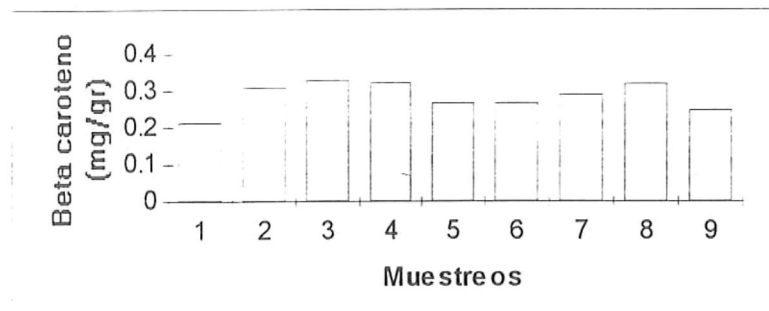


Fig. 15 Concentración de  $\beta$ -caroteno, en los tapetes construidos con 120 gramos de inóculo

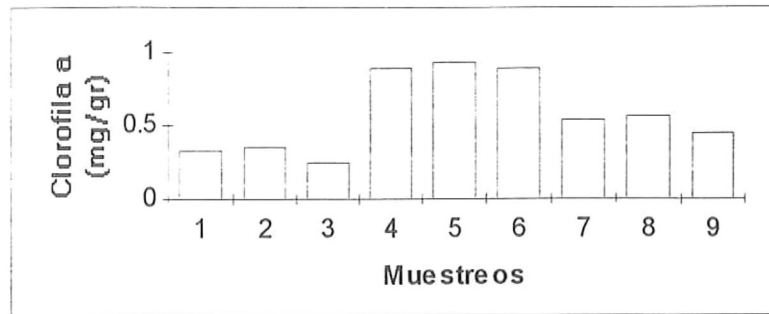


Fig. 16 Concentración de Clorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 40 gramos de inóculo.

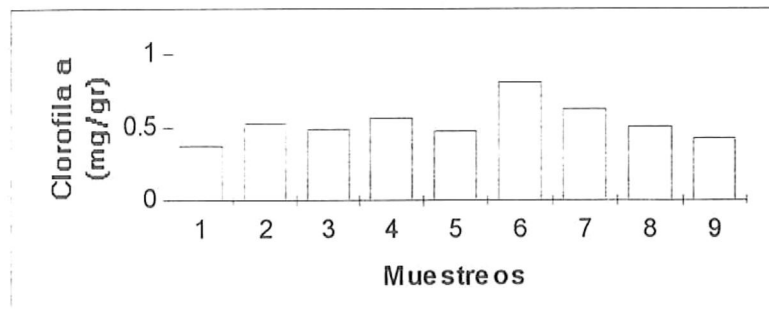


Fig. 17 Concentración de Clorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 80 gramos de inóculo.

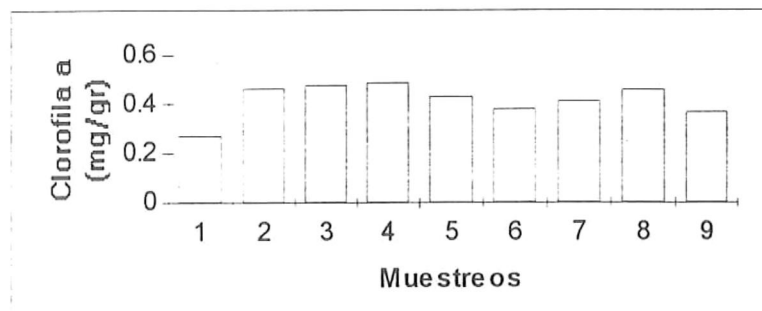


Fig. 18 Concentración de Clorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 120 gramos de inóculo.

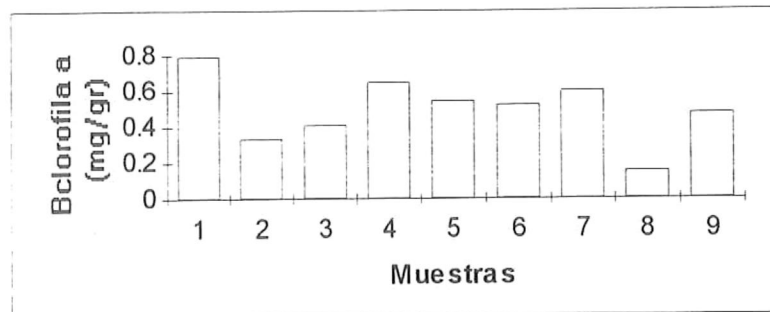


Fig. 19 Concentración de Bacterioclorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 40 gramos de inóculo.

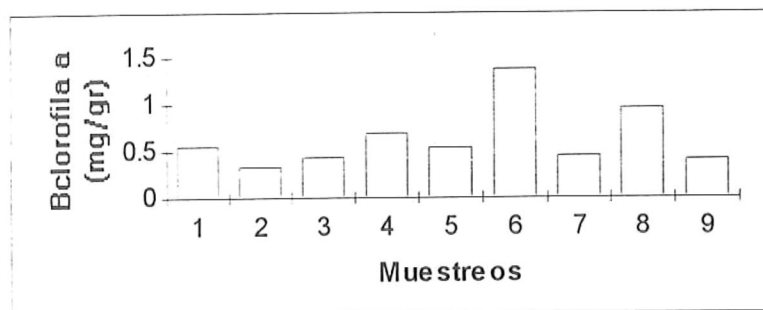


Fig. 20 Concentración de Bacterioclorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 80 gramos de inóculo.

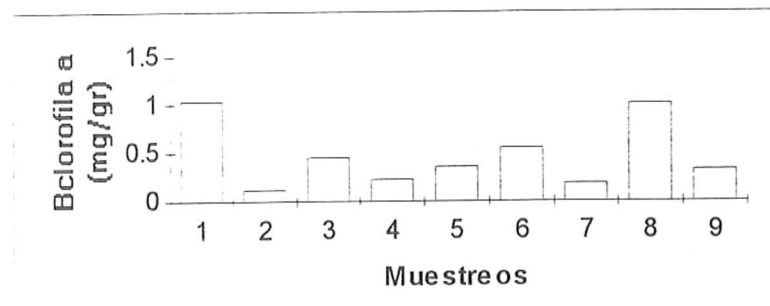


Fig. 21 Concentración de Bacterioclorofila  $\alpha$ , en los tapetes construidos con 120 gramos de inóculo.

confianza, debido a que 120 gramos presentó menor concentración de  $\beta$ -caroteno. De igual manera, se observó diferencias entre los tapetes con 80 (2) contra 120 (3), lo que indicó mayor concentración del pigmento en los tapetes construidos con 80 gramos de inóculo, mientras que en la comparación hecha entre los tapetes de 40 (1), contra 80 gramos (2), indica que no existen diferencias entre ellos, por lo que el contienen concentraciones similares de  $\beta$ -caroteno.

En la tabla VI se presentan los resultados estadísticos de la comparación de los tres tamaños de inóculo, utilizando la clorofila  $\alpha$  como comparación. Primeramente se observa que entre los tapetes con 40 gramos (1) contra 120 (3), presentaron diferencias significativas a los tres niveles de confianza, registrándose mayor contenido de clorofila  $\alpha$  en los tapetes con 40 gramos. De igual manera, la comparación entre 80 (2) contra 120 gramos (3), indican que son significativamente diferentes. Sin embargo, al realizar la comparación entre los tapetes con 40 (1) y 80 gramos (2), no se detectó diferencias entre ellos, por lo que presentan concentraciones de clorofila  $\alpha$  similares.

Finalmente los resultados estadísticos al utilizar a la bacterioclorofila  $\alpha$  como indicador se presentan en la tabla VII. La comparación de los tapetes con 40 (1) contra 80 gramos (2), así como 80 (2) contra 120 gramos (3), y 40 (1) contra 120 gramos (3) presentan diferencias muy significante ( $\alpha = 0.1$  y  $0.05$ ) lo que indica que las concentraciones de bacterioclorofila  $\alpha$  son diferentes entre

ellos .Sin embargo, al realizar nuevamente la comparación a un diferente nivel de confianza (  $\alpha= 0.01$ ) indicó que solo la comparación entre 40 (1) contra 80 gramos (2), son significativamente iguales las concentraciones de bacterioclorofila  $\alpha$ .

Tabla V.- Comparación de los tres tamaños de inóculos, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey (  $\alpha= 0.01$ ; 0.05 y 0.1 ) de comparación múltiple, para la concentración de  $\beta$ -Caroteno en mg/gr., de muestra.

Inoculos	Diferencia ( $R_B-R_A$ )	EE	q	q 0.1 $\alpha,3 *$	q 0.05 $\alpha,3^{**}$	q 0.01 $\alpha,3^{***}$	Conclusiones
1 Vs 3	146-77=69	4.51	15.30	2.902	3.314	4.12	<b>Rechaza <math>H_0</math></b> , por lo tanto 1y3 son diferentes *
1 Vs 2	155-146=9	4.51	1.99	2.902	3.314	4.12	<b>Acepta <math>H_0</math></b> por lo tanto 1y2 son iguales *
2 Vs 3	155-77=78	4.51	17.29	2.902	3.314	4.12	<b>Rechaza <math>H_0</math></b> , por lo tanto 2y3 son diferentes *

\*= siginificante \*\*= muy significativa \*\*\*= Altamente significativa

#### 4.4.2. Razones pigmentarias.

Se realizó una comparación de las razones pigmentarias entre las concentraciones de los tres pigmentos utilizados como un índice para evaluar el tamaño del inóculo.

##### 4.4.2.1. Clorofila/ $\beta$ -caroteno,

Tabla VI.- Comparación de los tres tamaños de inóculos, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey ( $\alpha = 0.01; 0.05$  Y  $0.1$ ) de comparación múltiple, para la concentración de **Clorofila  $a$**  en mg/gr., de muestra.

Inoculos	Diferencias	EE	q	q 0.1 $\alpha, 3^*$	q 0.05 $\alpha, 3^{**}$	q 0.01 $\alpha, 3^{***}$	Conclusiones
1 Vs 3	139-84=55	4.51	12.19	2.902	3.314	4.12	<b>Rechaza Ho</b> , por lo tanto 1 y 3 son diferentes.*
1 Vs 2	151-39=12	4.51	2.66	2.902	3.314	4.12	<b>Acepta Ho</b> , por lo tanto 1 y 2 son iguales*
2 Vs 3	151-84=67	4.51	14.85	2.902	3.314	4.12	<b>Rechaza Ho</b> , por lo tanto 2 y 3 son diferentes.*

\*= Significante \*\*= Muy significativo \*\*\*= Altamente significativo.

Tabla VII.- Comparación de los tres tamaños de inóculos, utilizando la prueba estadística no paramétrica de Tukey ( $\alpha = 0.01; 0.05$  y  $0.1$ ) de comparación múltiple, para la concentración de **Bacterioclorofila  $a$**  en mg/gr., de muestra

Inoculos	Diferencias ( $R_B - R_A$ )	EE	q	q 0.1 $\alpha, 3^*$	q 0.05 $\alpha, 3^{**}$	q 0.01 $\alpha, 3^{***}$	Conclusiones
1 Vs 3	128-102=26	4.51	5.76	2.902	3.314	4.120	<b>Rechaza Ho</b> , por lo tanto 1 y 3 son diferentes ***
1 Vs 2	146-128=18	4.51	3.99	2.902	3.314	4.120	<b>Acepta Ho</b> , por lo tanto 1 y 2 son iguales ***
2 Vs 3	146-102=44	4.51	9.75	2.902	3.314	4.120	<b>Rechaza Ho</b> , por lo tanto 2 y 3 son diferentes ***

\* = Significante \*\*= Muy significativo \*\*\*= Altamente significativo.

Las razones correspondientes a los tres tamaños de inóculo, se presentan en la figura 22. Primeramente se observa en 40 gr. de inóculo un comportamiento descendente hacia el final del experimento. Sin embargo, en los tapetes con 80 y 120 gramos se observa que el radio se mantiene casi constante a través de todos los muestreos realizados.

#### 4.4.2.2. Clorofila $\alpha$ / Bclorofila $\alpha$

La relación clorofila  $\alpha$ /Bclorofila  $\alpha$  se presenta en la figura 23. En esta relación se observa claramente un comportamiento ascendente en los tapetes con 40 gr., mientras que en 80 y 120 gr. de inóculo, se observa una comportamiento descendente en esta relación pigmentaria.

#### 4.4.3.3 Ponderación de la concentración de pigmentos en relación al tamaño de inóculo.

La ponderación de las concentraciones de los tres pigmentos utilizados para la evaluación del tamaño de inóculo es presentada en la figura 23. Primeramente para el pigmento  **$\beta$ -caroteno**, se registró un mayor porcentaje (39%) en los tapetes con 40 gramos de inóculo, seguido por los construidos con 80 con un 35 % y finalmente el de 120 gr con 27%.

Con respecto a la **clorofila  $\alpha$** , se tiene una mayor concentración en los tapetes con 40 gr de inóculo, con un 38 %, mientras que en los construidos con 80 gr. se presentó un 35%, mientras que para los 120 gr se registrarón 27%.

La ponderación realizada a las concentraciones de bacterioclorofila  $\alpha$  arrojan un porcentaje del 29 % en los tapetes con 40 gr de inóculo, mientras que con 80 gr. se obtuvo un 37 %, para registrarse el menor porcentaje en los tapetes contruidos con 120 gr.

#### 4.5. MICROORGANISMOS DEL TAPETE.

En la lista 1, se presentan los organismos observados en los tapetes contruidos. Entre estos se encuentran diatomeas *Navicula* sp., *Nitzchia* sp., y *Cymbella* sp. Así como algunas cianobacterias, entre las que se encuentran *Oscillatoria* sp., *Trichodesmium* sp., *Anacystis* sp., *Anabaena* sp., y *Phormidium* sp., además de bacterias púrpuras.

Lista 1.- Microorganismos presentes en los tapetes contruidos.

*Navicula* sp.  
*Nitzchia* sp.  
*Cymbella* sp.  
*Anacysitis* sp.  
*Trichodesmiu* sp.  
*Oscillatoria* sp.  
*Anabaena* sp.  
*Phormidium* sp.  
*Chorella* sp.  
Bacterias púrpuras.

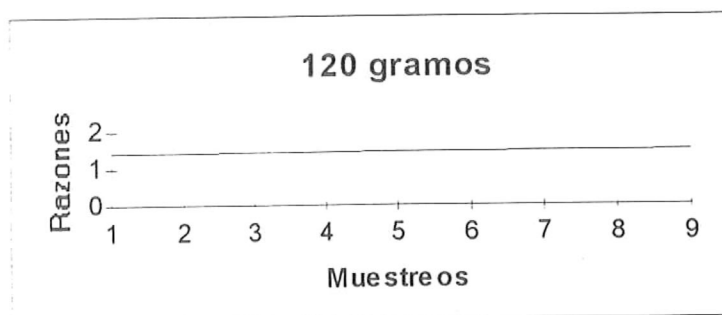
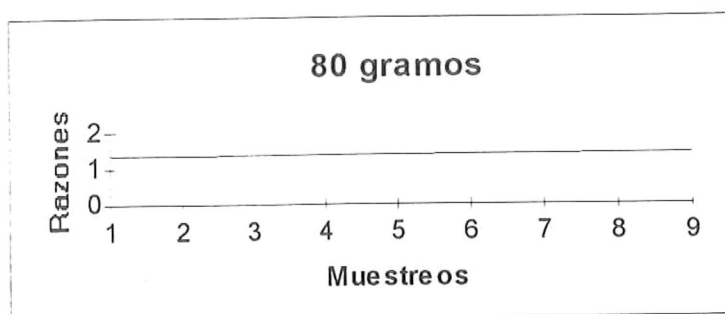
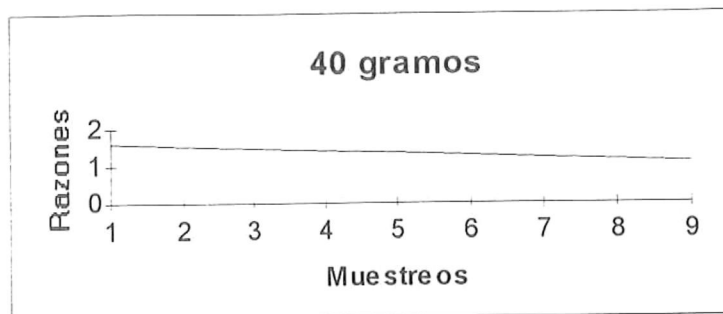


Fig. 22 Razones clorofila *a* /  $\beta$ -caroteno en los tapetes construidos con 40, 80 y 120 gramos de inóculo

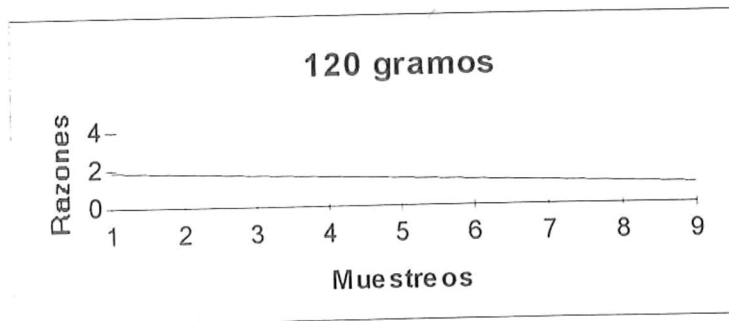
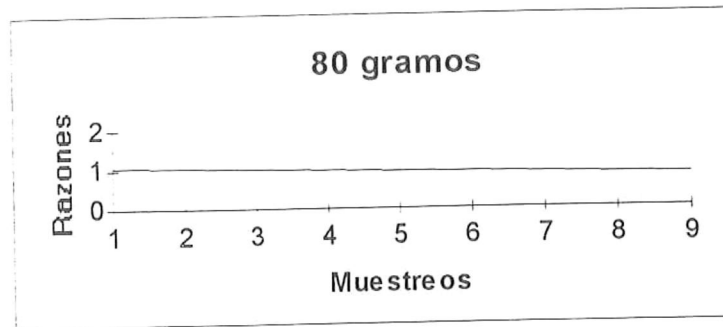
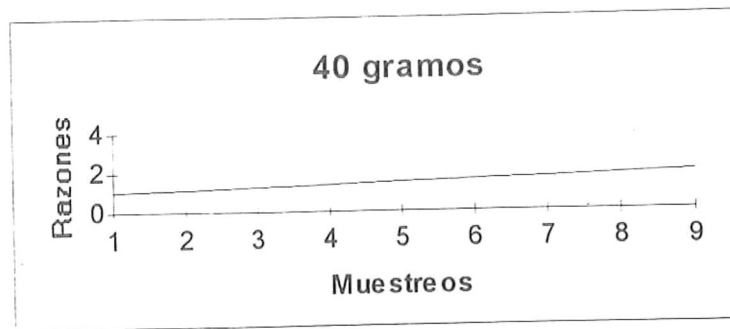


Fig. 23 Razones clorofila *a* / bacterioclorofila *a* en los tapetes construidos con 40, 80 y 120 gramos de inóculo

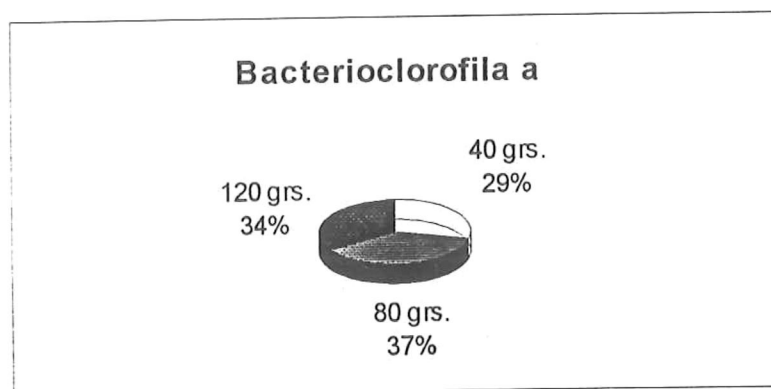
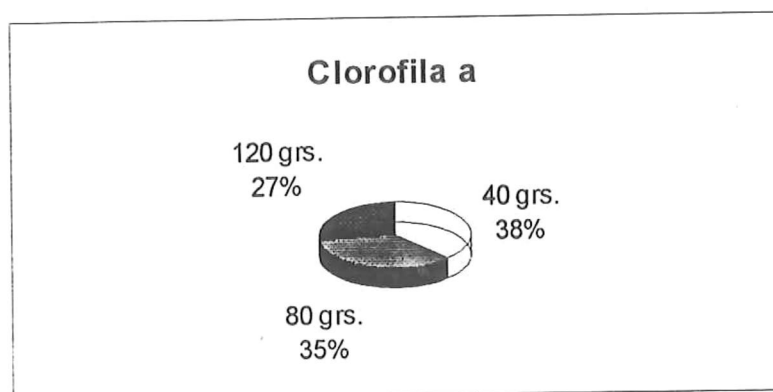
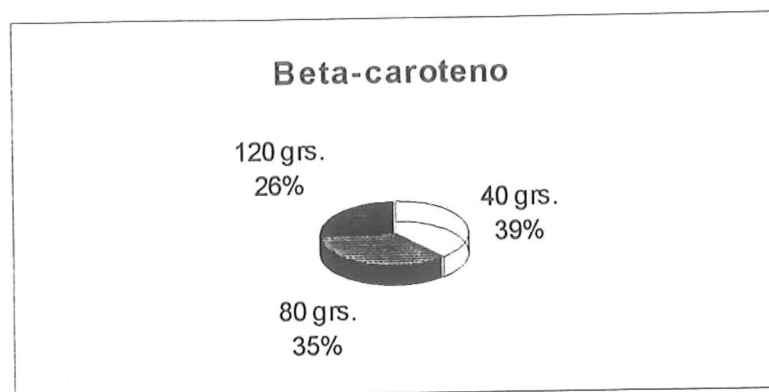


Fig. 24. Ponderación de los componentes pigmentarios mayores (mg/gr) en función del inóculo.

## 5. DISCUSIÓN

Los tapetes construidos y aclimatados a salinidades encontradas en cultivos de camarón semiintensivos ~40o/oo, presentaron una evolución adecuada, como son cambio de coloración de negro a verde, culminandose con la presencia de burbujas , lo que indica el buen funcionamiento de la capa superficial del tapete, de acuerdo a lo observado *in vivo* en el microscopio óptico.

Los espectros de absorción presentados en las figuras 9-11, muestran claramente la gama de pigmentos contenidos en los consorcios microbianos. Aquí se puede apreciar la presencia de los pigmentos característicos en los microorganismos que conforman los tapetes naturales. Beverly y Olson, 1989, mencionan que todos los centros reactivos contienen uno de los siguientes pigmentos: clorofila  $\alpha$ , bacterioclorofila  $\alpha$ , bacterioclorofila  $b$  ó bacterioclorofila  $b$  y otros pigmentos que funcionan como colectores de luz, entre los que se encuentran las clorofilas y los carotenoides. Sin embargo, en el presente trabajo solo se consideraron tres pigmentos  $\beta$ -caroteno, clorofila  $\alpha$  y bacterioclorofila  $\alpha$ .

Guerrero y Mas, 1989, mencionan que la parte más superior de la comunidad consiste de microorganismos fotótrofos aerobios, tales como las diatomeas y cianobacterias fotoheterótrofas, adaptadas más a regimenes turbulentos de la capa de mezcla. Estas protegen de las altas radiaciones a los

microorganismos situados bajo la primera capa. De modo que estas altas intensidades en la superficie ocasionan que las diatomeas generen mayores concentraciones de pigmentos carotenoides, entre los que se encuentran el fotoprotector  $\beta$ -caroteno el cual absorbe luz a los 480 nm (Strickland y Pearson, 1972), así como en cianobacterias los pigmentos zeaxantina, cantaxantina y echinenone (Stewart, 1974). Estos pigmentos generalmente son utilizados contra los daños de fotooxidación (Beverly y Olson, 1989; Loeblich, 1982), no obstante, en las comunidades bentónicas, se le confiere poca ventajas como colectores de luz en los organismos que crecen en el primero y segundo mm del tapetes. Martheron y Baulaigue (1977 en Beverly y Olson, 1989), determinaron que los carotenoides tienen una función significativa en medios ambientes profundos, donde las longitudes de onda largas no penetran. Guerrero et al., (1987); Elchler y Pfennig, (1988); Fischer et al, (1996) , encontraron en bacterias púrpura sulfurosas, okenone y sprilloxantina como principales carotenoides. En el presente trabajo se hicieron observaciones *in vivo* al microscopio óptico, se obtuvieron imágenes, que indican la presencia de varios géneros de diatomeas, entre las cuales se encuentran *Cymbella* sp. (fig. 25a), *Nitzchia* sp. (fig. 25b), *Navicula* sp. (fig. 25c). Estas dos primeras especies fueron identificadas en Laguna Figueroa (Laguna Mormona), en trabajos previos de distribución de microorganismos en tapes microbianos laminados ( Stolz, 1990). Esta laguna se encuentra situada a poca distancia del

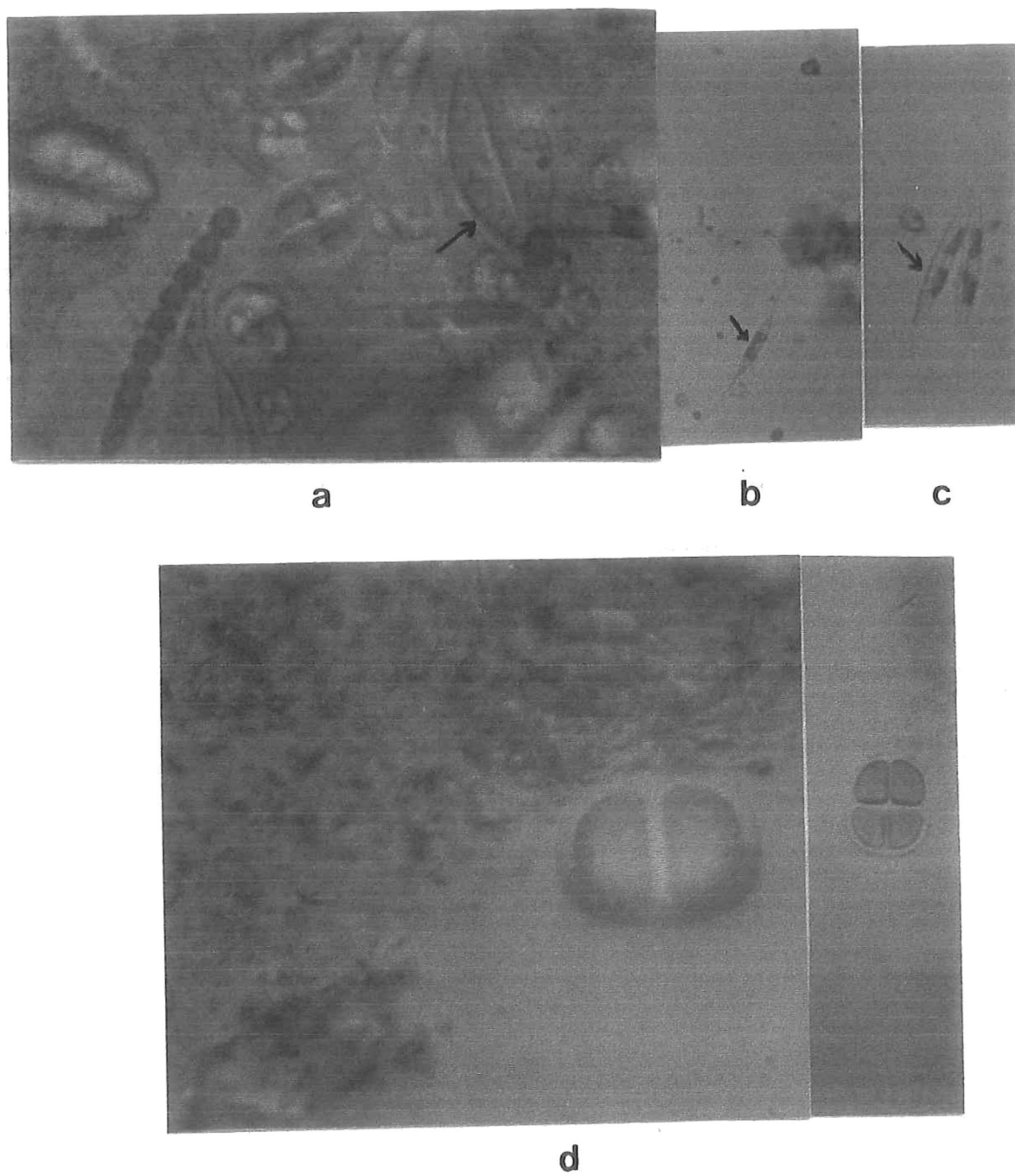


Fig. 25. Fotografía *in vivo* de una parte del consorcio microbiano. a) *Cymbella* sp. b) *Nitzschia* sp. c) *Navicula* sp. y d) *Anacystis* sp.

área de muestreo del presente trabajo, además de que es una zona hipersalina, la cual es protegida de la entrada directa de aguas de Océano Pacífico, lo que hace que exista mucha acumulación de materia orgánica, y en algunos caso aguas con condiciones casi anóxicas. Estas diatomeas constitutivas de los tapetes estan asociadas y han sido registradas en cuerpos de aguas contaminadas (Weber, 1971).

Con respecto a las razones clorofila a/  $\beta$ -caroteno, en los tres tamaños de inóculos ( fig. 22), indican una tendencia descendente en los 40 gr de inóculo, lo cual puede ser un indicador de que los organismos componentes de la primera capa se aclimataron adecuadamente a las condiciones ofrecidas durante el experimento. Este resultado fue corroborado al analizar los inóculos de 80 y 120 gr, donde la relación clorofila a/ $\beta$ -caroteno, se mantuvo casi constante durante el experimento.

La segunda capa en un tapete esta habitada principalmente por cianobacterias filamentosas, componentes muy importante en su estructura, así como algunas Clorofitas y bacterias quimiotróficas como Nitrosomonas y Nitrobacter. Estos organismos filamentosos permiten que el resto de los microorganismos del consorcio se puedan establecer, ya que la biomasa poblacional crea una estructura reticular que favorece el asentamiento o inmersión de sedimento y material orgánico. Las cianobacterias se consideran como el principal organismo formador de los tapetes, de allí que se denominen

también tapetes cianobacterianos, aunque en su estructura se encuentren una gran variedad de bacterias. Estos organismos contienen bacterioclorofila y clorofila  $\alpha$  como principal pigmento, los cuales se ubican de 375 a 920 nm (Pfennig, 1986 ); 665 nm ( Stal et al, 1984 ); 664 ( Villanueva et al, 1994 ). Los carotenoides son otros componentes pigmentarios que se encuentran en menor concentración. Sin embargo, la absorción de luz por esos organismo en aguas someras o ambientes bentónicos (tapetes) no interfiere con las longitudes de onda o espectro de absorción de las bacterias púrpuras o verdes (Pfennig, 1989).

Entre los registros de organismos componentes del tapete obtenidos de muestras *in vivo* se observaron varios géneros de cianobacterias , *Oscillatoria sp.* (figs. 26a y 27a), *Trichodesmium sp.* (fig. 26a), *Anacystis sp.* (fig. 25d), *Anabaena sp.* (fig. 27d) y *Phormidium sp.* (fig. 27b), una clorofita *Chlorella sp.* (fig. 27d). Tanto *Phormidium sp.* como *Oscillatoria sp.* fueron detectadas previamente por Stolz, 1990 en los tapetes estudiados en Laguna Figueroa.

La presencia de bacterioclorofila  $\alpha$  dentro del tapete sugiere una cercana asociación fotosintética con diatomeas y cianobacterias. Este pigmento se da en los componentes del tercero y cuarto nivel del tapete, correspondiendo a las bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas (capas de color púrpura fig. 27a). Una de las características comunes de este grupo es su condición anaeróbica (Beverly y Olson, 1987), sin embargo, pueden ser encontradas con

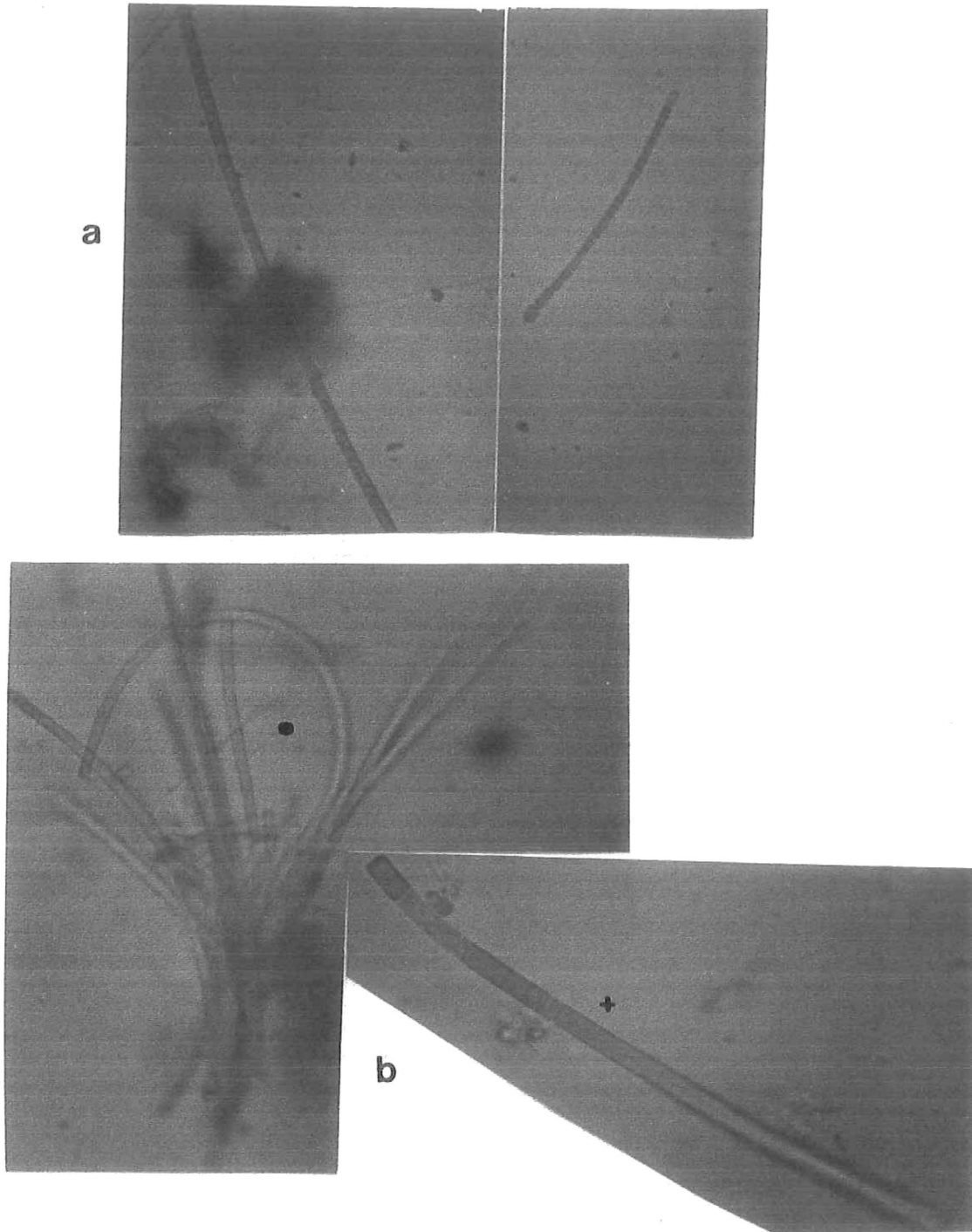


Fig. 26. Fotografía *in vivo* de a) *Trichodesmium* sp. y b) *Oscillatoria* sp.  
(masa de tricomas • y tricoma sencillo +)

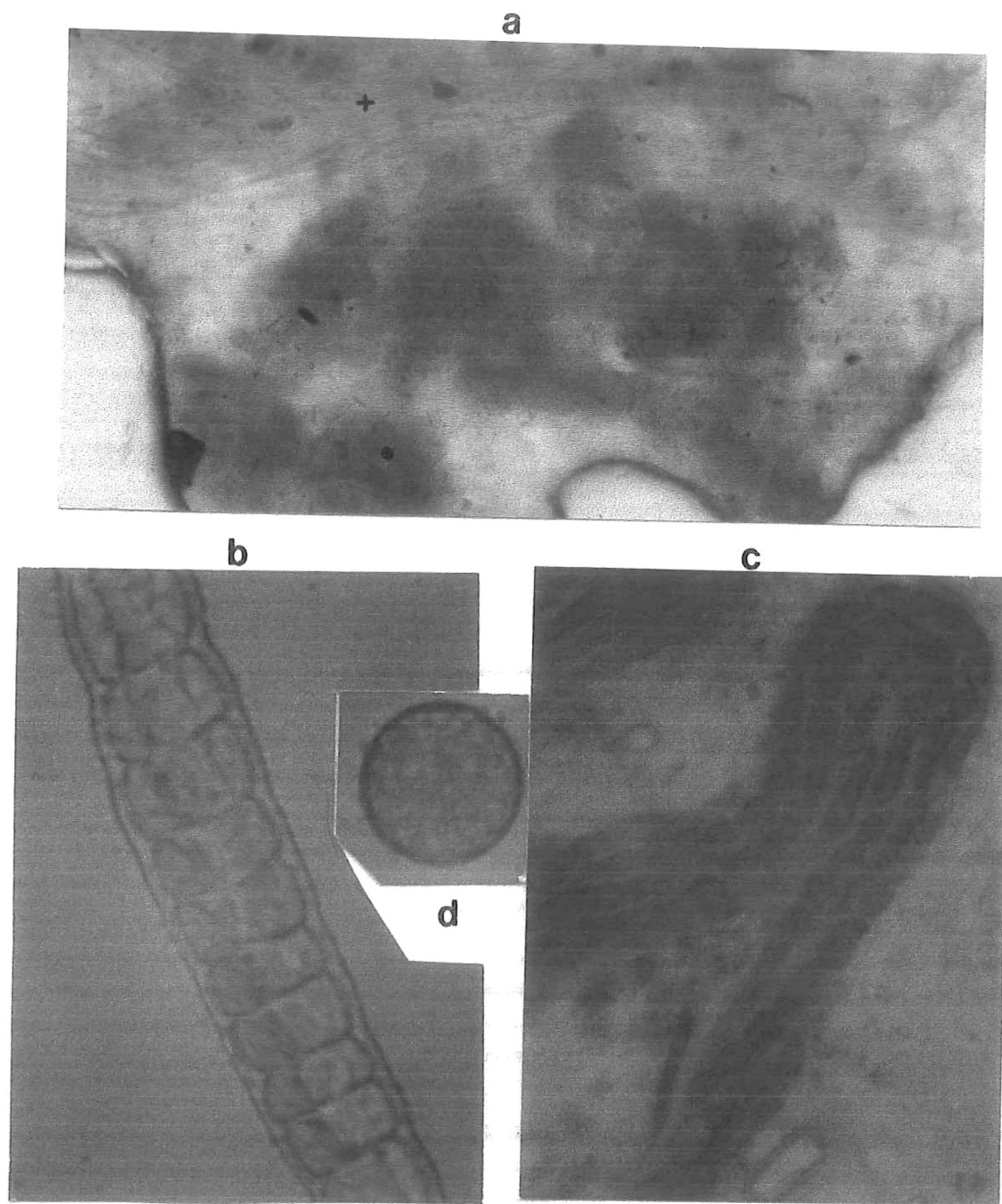


Fig. 27. Fotografía del consorcio microbiano *in vivo*. a) mostrando la matriz de cianobacterias (+) y bacterias púrpura (•). b) *Phormidium* sp. c) *Chorella* sp. y d) *Anabaena* sp.

características fototróficas anaerobias obligadas, así como fototróficas y quimiotróficas facultativas (Pfennig, 1989). La característica quimitrófica representa una significancia ecológica, ya que tales especies son metabólicamente más flexibles que las fototróficas estrictas, pudiendo ocupar nichos con condiciones cambiantes ( aerobias/anaerobias ) ( Nicholson et al, 1987), lo que permite continuar creciendo con oxígeno en ausencia de luz. Estas características permitirán a las bacterias púrpuras adaptarse adecuadamente a las condiciones prevalecientes donde el tapete sea colocado para llevar a cabo trabajos de biorremediación.

Este grupo de bacterias púrpuras en tapetes naturales, presenta absorbancia en los 850 nm ( Nicholson et al, 1987). Sin embargo, longitudes de onda de este grupo de bacterias han sido registradas en 830-920 ( Beverly y Olson, 1989), y a 800 nm (Ward et al, 1989). Jorgensen y Des Marais (1986), determinaron que intensidades de luz abajo de 700 nm es baja para soportar fotosíntesis aerobia, sin embargo, la radiación sobre los 700 nm y particularmente sobre los 1000 nm permanece disponible, debido a que la profundidad de penetración dentro del sedimento, se incrementa con la longitud de onda de la radiación. Pierson et al, (1990), encontraron que longitudes de onda corta 400-500 nm, son fuertemente atenuadas en los 2 mm superiores del tapete y longitudes de onda más largas > 700 nm rojo y cercanamente al

infrarrojo, penetraron a mucho más profundidad donde esta fue atenuada por la bacterioclorofila  $\alpha$  contenida en bacterias anaerobias fotosintéticas.

Lo anterior es indicativo de que cada componente de los tapetes microbianos, ecológicamente se encuentra distribuido a lo ancho de gradiente vertical del tapete, lo que permite que el consorcio funcione de una manera integral, sin llevarse a cabo una competencia interespecífica por la luz, nutrientes y espacio.

Fossing, et al. (1995), mencionan que la concentración de nitratos sobre la capa de agua que cubre el tapete de las bacterias sulfurosas, es de alrededor de 25 ( $\mu\text{M}$ ), decreciendo a cero en los 3cm. Sin embargo, concentraciones extremadamente altas arriba de 500  $\mu\text{M}$  de nitratos fueron medidas en filamentos limpios de la formadora de tapetes *Thioploca* de 6 cm de profundidad en el mismo sitio. Esto indica una relación entre los organismos fotótrofos aerobios y los anaerobios en el consorcio del tapete. No obstante, podría darse la competencia intraespecífica por algún parámetro específico.

Las oscilaciones en los valores registrados, son debidas a la forma irregular de distribuir el homogeneizado o inóculo. Además del error incurrido al cortar cada sección, ya que al hacerlo en lana de algodón plástico se contrae, lo que no permite un corte uniforme entre ellos, observándose esto en las concentraciones obtenidas de los pigmentos monitoreados. Sin embargo, los

trabajos relacionados con la construcción de tapetes microbianos, no indican un seguimiento pigmentarios a lo largo de su activación.

La clorofila  $a$  y la bacterioclorofila  $a$  son pigmentos importantes dentro de un tapete microbiano, ya que son integrantes de varios de los componentes biológicos biológicos en su estructura ( Pfenning, 1989; Beverly y Olson, 1989). Sin embargo, no fue posible cuantificar la importancia poblacional en cada uno de ellos , debido a que no fue evaluado el número de microorganismos. Por tal razón, la determinación del tamaño del inóculo fue realizado estadísticamente con base en su concentración estandarizada de la clorofila  $a$ ,  $\beta$ -caroteno y bacterioclorofila  $a$ , apoyándose en las razones y ponderaciones pigmentarias.

Las aplicaciones estadísticas arrojaron evidencia de que las concentraciones de  $\beta$ -caroteno, clorofila  $a$  y bacterioclorofila  $a$ , son similarmente significativas ( $\alpha = 0.1$ ) en los tapetes con 40 y 80 gramos, lo que indica que en la construcción podría ser utilizado cualquiera de los dos tamaños de inóculos. De acuerdo a lo observado se recomendaría un inóculo de 40 gramos, lo cual aseguraría la permanencia del inóculo en el soporte y al paso del efluente por ellos. Esto es reforzado con la información obtenida en las razones desarrollados de clorofila  $a/\beta$ -caroteno y clorofila  $a$ /bacterioclorofila  $a$ , lo cual indican que el radio en clorofila  $a$ /bacterioclorofila  $a$  disminuye fuertemente en los tapetes con 40 gramos de inóculo. Esto puede ser un indicador de las

buenas condiciones del tapetes, ya que el ambiente donde la bacterioclorofila  $\alpha$  es encontrada en mayor concentración, es en condiciones anaerobias.

La ponderación de las concentraciones de pigmentos en mg/gr. de muestra indican una mayor proporción de  $\beta$ -caroteno en los tapetes con 40 gramos de inóculo, igualmente, la concentración de clorofila a, se ve favorecida en los tapetes con 40 gramos, así como una menor concentración de bacterioclorofila  $\alpha$ , pudiendo ser un indicador de buenas condiciones, debido a que los organismos que la contienen presentan características anaerobias (Pfennig, 1989) Esto nos permite inclinarnos por 40 gramos de inóculo, debido a que el contenido de los fototrófos se encuentra más equilibrado con los heterotrófos, además de que el consorcio total puede desarrollarse en grosores de 1-5 mm ( Pfennig, 1989)

Esto lleva a la conclusión de utilizar 40 gramos de inóculo en futuras construcciones de tapetes microbianos. Durante el tiempo de muestreo se observó que los tapetes con 80 y 120 gramos de inóculo, empezaron a desintegrarse y a destruirse con el manipuleo. Esto podría ocasionar que tapetes contruidos con más de 80 gramos de inóculo, se deterioren más fácil al momento de ser colocados en algún efluente a tratar, debido al grosor presentado y a la dinámica presentada por los efluentes de origen acuicultural. En tiempos recientes se han utilizado en el tratamiento de efluentes contaminados. cultivos de microalgas para la eliminación de nitrógeno y

fosfatos (Richmond, 1986), el uso de macroalgas y moluscos, en la remoción de compuestos nitrogenados y sólidos en suspensión ( Ennander y Hasselstrom, 1994), Sin embargo, la sola presencia de organismos aerobios limita su eficiencia, debido a que un efluente contaminado contiene una gran heterogeneidad de elementos, difíciles de ser eliminados por tratamientos tan específicos y a la variabilidad de las condiciones ambientales. De modo, que un tapete microbiano que contiene esa heterogeneidad de características ecológicas, incrementaría las posibilidades de reducir con más facilidad la carga en un efluente contaminado, y con la posibilidad de no generar residuos secundarios.

Además del tiempo tan corto( 18 días) utilizado para la construcción y activación, comparado con la metodología aplicada por Garcia ( 1996), donde utiliza islas en su construcción, requirieren de mucho más tiempo para cubrir la superficie total del tapete ( meses).

## 6. CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrollo una metodología sencilla y práctica para la construcción de tapetes microbianos, a partir de homogeneizado de tapetes microbianos colectados de una laguna costera.
  
- 2.- En base a la caracterización pigmentaria se determinó que un inóculo de 40 gramos es el más adecuado en la construcción de tapetes microbianos.
  
- 3.- El uso de homogeneizado de tapetes naturales, puede reducir el tiempo de fabricación y activación en tapetes microbianos construidos.

## 7. LITERATURA CITADA

- Allen, M.B. y D.I. Arnon. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. *Lemn Pl. Physiol.* 30: 362-372.
- APHA, 1992. Standard Methods for examination of water and Wastewater. 18th ed. American Public Health. Washington. D.C.
- Bender, J., Gould, J.P., Y. Varcharapijam y G. Saha. 1991. Uptake, transformation and fixation of Se (VI) by a mixed selenium-tolerant ecosystem. *Wat. Air Soil Poll.* 59: 359-367.
- Bender, J., Gould, J.P., Y. Vatcharapijarn, J.S. Young, P. Phillips. 1994. Removal of zinc and manganese from contaminated water with cyanobacteria mats. *Water Enviroment Research.* 66. (5): 679-683.
- Bender, J., Lee, F.R., y Phillips P. 1995. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology.* 14: 113-118.
- Bender, J. y Phillips P. 1996. Biotratamiento de desagües de mina. *Mining Magazine.* Abril pp. 31-33.
- Beverly K. P. y J. M. Olson. 1989. Evolution of photosynthesis in Anoxygenic photosynthesis procaryotes. In: *Microbial mats.* (Cohen, Y. y E. Rosemberg, (eds) . *American Society for Microbiology.* Washington. DC. 326-341.
- Boyd, E. C. y Clay, W. J. 1998. Shrimp aquaculture and the enviroment. *Scientific American.* Junio. 58-65.

- Clayton, R.K. 1963. Toward the isolation of a photochemical reaction center in *seudomonas spheroides*. *Biochim. Biophys. Acta* 75, 312-323.
- D'Antonin D. E., Cohen Y. y Des Marais J.D. 1989. Comparative functional ultrastructure of two hypersaline submerged cyanobacterial mats: Guerrero Negro Baja California Sur, México, and Solar Lake, Sinai, Egypt. p 97-107. In Y. Cohen, y E. Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- De la Noüe, J., Laliberté, G. y Proulx, D. 1992. Algae and Wastewater. *J. Appl. Phycology* . 4: 247-254.
- Des Marais, D. J., Y. Cohen, H. Nguyen, M. Cheatham, T. Cheatham, and E. Muñoz. 1989. Carbon isotopic trends in the hypersaline ponds and microbial mats at Guerrero Negro, Baja California Sur, México: Implications for precambrian stromatolites. In: Cohen, Y. y E. Rosenberg (eds.). *Microbial mats, Physiological ecology of benthic microbial communities*. American society fir microbiology. Washington D.C. 191-213.
- Eichler, B. y Pfennig, N. 1986. Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pedioformis* sp. nov. *Archives of Microbiology* 146 : 295-300
- Eichler, B. y Pfennig, N. 1988. A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes. *Amoebobacter ouroureus* sp. nov. *Archives of Microbiology* 149: 395-400.
- Ennander, M. y M. Hasselstrom 1994. "An experimental wastewater treatment system for a shrimp farm" *INFOFISH International* 6/92, 38-42.

- Fischer, C., Wiggli, M., Schanz, F., Hanselmann, K.W. y Bachofen, R. 1996. Light environment and synthesis of bacteriochlorophyll by populations of *Chromatium okenii* under natural environmental conditions. *Microbiology Ecology*. **21** : 1-9.
- Fossing, H., V.A. Gallardo, B.B. Jorgensen, M. Huttel, L.P. Nielsen, H. Schulz, D.E. Canfield, S. Forster, R. N. Glud, J. K. Gundersen, J. Kuver, N. B. Ramsing, A. Teske, B. Thamdrup y O. Ulloa. 1995. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulfur bacterium *Thioploca*. *Nature*. **374**: 713-715.
- García, O. G. D. 1996. Bio-remediación *ex-situ* de un efluente de cultivo de camarón mediante tapetes microbianos construidos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 73.
- Goldman, J.C., Tenore K.R., Ryther J.H. y Corwin N. 1974. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment-marine aquaculture system. I. Removal efficiencies. *Water Res.* **8** : 45-54
- Goodroad, L., Bender, J., Phillips, P., Gould J., Hater, G., and Burrow B. 1995. Use of constructed mixed microbial mats for landfill leachate treatment. Eighteenth International Madison Waste Conference, September 20-21 1995.
- Guerrero, R., Pedrós-Alió, C., Esteve, I. y Mas, J. 1987. Communities of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. *Acta Academiae Aboensis*. **47**: 125-151
- Guerrero R. and J. Mas. 1989. Multilayered microbial communities in aquatic ecosystems: Growth and loss factors. In: *Microbial Mats* (Cohen, Y. and E. Rosenberg, eds). 37-51

- Javor, B.J. y R.W. Castenholz. 1984. Productivity studies of microbial mats, Laguna Guerrero Negro México. In : Cohen, Y. y R.W. Castenholz, (eds). *Microbial Mats: Stromatolites Vol 3*. Jaluorson, New York. 149-170
- Jorgensen, B.B. 1989. Light penetration, absorption, and action spectra in cyanobacterial mats. In: Cohen, Y.: Rosemberg, E. (eds). *Microbiol. mats: Physiological Ecology of Benthic microbial communities*. Washington D.C. 123-137.
- Jorgensen, B.B. y Des Marais, D.J. 1986. Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiology- Ecology* **38**: 179-186.
- Loeblich, L.A. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* ( Chlorophyta ). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **62**: 493-508.
- Nicholson, J.A.M., Stolz, J.F., y Piersen, BK. 1987. Structure of a microbial mat at Great Sippewisset Marsh, Cape Cod, Massachusetts. *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 343-364.
- Oren, A. y Padan E. 1978. Induction of anaerobic, photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Jornal of Bacteriology*. vol. 133, No. 2 p 558-563.
- Oswald, W.J. (1988 ). Micro-algae waste-water treatment. In "Borowitzka MA, Borowitzka ( eds), *micro-algal biotechnology*. Cambridge U.P. Canbridge, 305-394.
- Palmisano, A.C., S.E. Cronin, E. D. D`Amelio, E. Muñoz, y D.J. Des Marais. 1989. Distribution and survival of lipophilic pigments in a laminated microbial mat

- community near Guerrero Negro. In: Cohen and E. Rosenberg ( eds.), *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities. American Society for Microbiology*, Washington, DC.138-152
- Pentecost, A. 1984. Effects of sedimentation and light intensity on mat-forming Oscillatoriaceae with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* Gomont. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 983-990.
- Pearl, H.W., B.M. Bebout y L.E. Prufert. 1989. Naturally occurring patterns of oxygenic photosynthesis and N<sub>2</sub> fixation in a marine microbial mat:Physiological and ecological ramifications. In: Cohen, Y. and E. Rosenberg, (eds). *Microbial mats* American Society for Microbiology. Washington, DC. 326-341.
- Pfennig N. 1989. Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria.In: Hypersaline environments. ( Barbara Javor). Brock/Springer series in contemporary bioscience. pp. 125-133.
- Phillips, P., J.Bender, S. Rodríguez-Eaton, J. Gould, y V. Shea-Albin, 1996. Environmental issues and waste management in energy and mineral production. Proceeding Swemp'96 Cagliari, Italy, October 7-11. **1**: 474-482.
- Phillips, M.J.; C.Kwei Lin y M.C. Beveridge. 1993. Shrimp culture and environment: Lessons form the world's most rapidly expanding warmwater aquaculture sector. In: Pullin, R.S.V. et al. ( eds). *Environment and aquaculture in developing countries ICLARM Conf. Proc.* **31**. 171-197.

- Phillips, P., Russell A., Bender J., y Muñoz R. 1994. Management plan for utilization of a floating microbial mat with its associate detrital gelatinous layer as a complete *Tilapia Oreochromis niloticus* feed system. *Bioresource Technology* 47: 239-245.
- Pierson, B.K., Sands, V.M. y Frederick, J.L. 1990. Spectral irradiance and distribution of pigments in a highly layered marine microbial mat. *Appl. environ. Microbiol.* 56 (8): 2327-2340.
- Rabinowitch, E. y Govindjee. 1969. *Photosynthesis*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 273.
- Rai, L.C., Gaur J.P., Kumar H.D. 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.* 56: 99-151.
- Reddy, K.R. y De Busk T.A. 1987. State-of-the-art utilization of aquatic plants in water pollution control. *Water Sci. Technol.* 19: 61-79
- Richmond, A Ed. 1986. *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Boca Ratón, 528 pp.
- Rosenthal, H. 1994. Aquaculture and environment. *World Aquaculture* 25(2):4-11
- Schramm, W. 1991. Seaweeds for waste water treatment and recycling of nutrients. *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*, Edited by M.D. Guiry and G. Blunden @ 1991 John Wiley y Sons Ltd. pp. 350.
- Seafdec. 1995. *Aquafarms News*. Vol ( XIII) No. 2. p. 15
- Stal, L.J.; H. van Gernerden y W.E. Krumbein 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 2: 295-306.

- Stal, L., H. Van Gernerden, y W. Krumbein. 1985. Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 111-125
- Sterman, N.T. 1988. Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. In: *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. C.S. Lobban, D.J. Chapman y B.P. Kremer (eds). Cambridge University Press, New York. 35-40..
- Stewart, W.D.P. 1974. *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical monographs. Vol 10. Blackwell Scientific Publications.
- Stolz, J.F. 1990. Distribution of phototrophic microbes in the flat laminated microbial mar at Laguna Figueroa, Baja California, México. *BioSystems*, **23**: 345-357.
- Strickland, J. D.H. y T.R. Pearson. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. 2da ed. Bull. Fish. Res. Bd. Canada. 167 pp.
- Thompson, A.S., J.C. Rhodes y I. Pettman. 1988. Culture collection of algae and protozoa. *Natural Environment Research Council*. 164 pp.
- Villanueva, J., Joan Grimalt, Rutger De Wit, Brendan J. Keely y James R. Maxwell. 1994. Chlorophyll and carotenoid pigments in solar saltern microbial mats. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **58**(21): 4703-4715.
- Ward, M. David; Roland Weller, Jentaie Shiea, Richard W. Castenholt, and Yehuda Coben. 1989. Hot Spring Microbial Mats: Anoxygenic and Oxygenic Mats of Possible Evolutionary Significance. In: Cohen, Y. and E. Rosemberg, (eds). *Microbial Mats. American Society for Microbiology*. Washington, DC.326-341
- Weber, I.C. 1971. *A guide to the common diatoms at water pollution surveillance systems stations*. U.S. Environmental Protection agency. 100 pp.

Zar, H.J. 1984. Biostatistical analysis. 2da. edición. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey 07632. 718 pp.