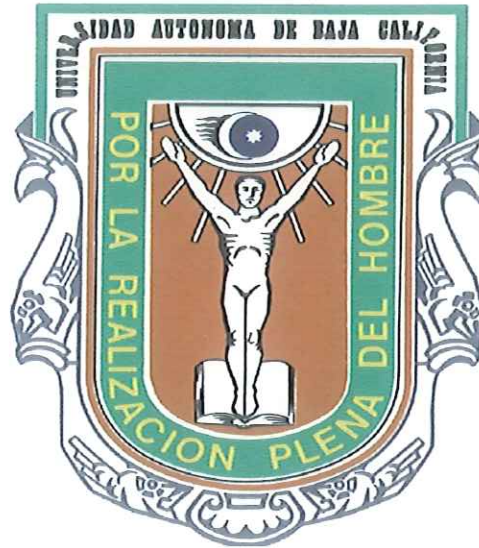


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



"ECOLOGÍA MICROBIANA EN CULTIVOS ESTÁTICOS DE LAS
MICROALGAS: *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y
Rhodomonas sp."



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
O C E A N O L O G O
P R E S E N T A
AÍDA DE LOURDES SIMENTAL OCEGUERA.

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA., DICIEMBRE DEL 2001.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"ECOLOGÍA MICROBIANA EN SISTEMAS ESTÁTICOS DE
MICROALGAS: *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y
Rhodomonas sp."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
O C E A N O L O G O
P R E S E N T A
AÍDA DE LOURDES SIMENTAL OCEGUERA.

ESENADA, B. C., DICIEMBRE DEL 2001.

ECOLOGÍA MICROBIANA EN CULTIVOS ESTÁTICOS DE LAS
MICROALGAS: *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y
Rhodomonas sp.

T E S I S

QUE PRESENTA:

AÍDA DE LOURDES SIMENTAL OCEGUERA

APROBADA POR:



Presidente del Jurado


M. C. María Victoria Orozco Borbón.



Sinodal Propietario
Dr. Ramon Cajal Medrano.



Sinodal Propietario
M. C. Enrique Valenzuela Espinoza.



Sinodal Propietario
C. Dr. Antonio Trujillo Ortiz.

RESUMEN

Durante mayo - junio del 2001 se estudió bacterias, nutrientes y fitoplancton en dos cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso). Para la determinación de bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. se utilizó la técnica cuenta en placa (UFC:ml⁻¹) en los medios Zobell y TCBS, respectivamente; mientras que para bacterias nitrificantes se utilizó el método del NMP con los medios amonio-calcio-carbonatado y nitrito-calcio-carbonatado. Se analizaron NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄³⁻ mediante un autoanalizador de flujo segmentado SKALAR. Los cultivos de las microalgas se realizaron empleando el medio f/2, pero para el caso de *Rhodomonas* sp., el medio fue al 150% (Guillard, 1975). El estudio se realizó en los tres niveles de cultivo Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón, los cuales tuvieron una duración de 5, 6 y 11 días, respectivamente. Los resultados obtenidos en los tres niveles muestran que existe una relación entre las bacterias heterótrofas y fitoplancton. Esta relación se encontró tanto en la concentración celular, como en las tasas de crecimiento, lo que demuestra una dependencia de ambas poblaciones. En general, los resultados de nitrato y fosfato para los tres niveles disminuyen con respecto al tiempo mientras que el de nitrito presentó una mayor variabilidad, lo que sugiere que existe tanto un consumo como mineralización por bacterias y microalgas. Con respecto a las bacterias nitrificantes en los tres niveles se dió una sucesión de especies debido a que cuando disminuye la concentración de *Nitrosomonas* sp. se incrementa la de *Nitrobacter* sp., ya que se relacionan con los nutrientes, particularmente con el nitrato y nitrito. Mediante los resultados obtenidos, se concluye que existe un equilibrio ecológico entre la población microalgal y la bacteriana en ambos cultivos estáticos.

DEDICATORIA

A

Oscar y Aída

Por ser el pilar de mi vida.

Karla, Héctor y Sergio

Por ser como son.

Chebetó

“ Lo logramos...!!! ”

“El hombre sin el mar estaría perdido;
no tendría una respuesta a su evolución ”

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis Ma. Victoria Orozco Borbón por su gran dedicación y apoyo para realizar este trabajo; por su gran ejemplo, amistad y sabios consejos.

A mis sinodales Dr. Ramón Cajal Medrano, M. C. Enrique Valenzuela Espinoza y en especial al C. Dr. Antonio Trujillo Ortíz por todo sus comentarios y sugerencias acertadas para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitir la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California por la formación que me brindó en esta etapa de mi vida.

A mis maestros predilectos: M.C. Raúl Aguilar, M.C. Enrique Valenzuela, M.C. Ramón Lizárraga, M.C. Consuelo Valle, Oc. Alfredo Chee, M.V.Z. Joel Nuñez, M.C. Ballesteros, (ambos), C. Dr. Antonio Trujillo, M.C. Victoria Orozco, M.C. Michel Dreyfus, M.C. Manuel López, Dr. Reginaldo Durazo, M.C. Rubén Castro, Dr. Asdrubal Martínez, M.C. Raúl Yepiz, Dr. Vinicio Macías, M.C. Julio Villaescuza M.C. Armando Rodríguez Pinal, Ing. Cesar Obregón, M.C. Graciela Guerra, M.C. Raúl Canino, M.C. Irma Soria, M.C. Antonio Apango, Dra. Roxana Rico, M.C. Gustavo Gascón, en especial a Dr. Francisco Aranda, M.C. Héctor Bustos, M.C. Manuel Moreno y M.C. Antonio Segovia por su ayuda incondicional en muchos aspectos de mi estancia en esta universidad

A todo el equipo del laboratorio de Microbiología: Dra. Roxana Rico, Oc. Arturo Ornelas, M.C. Rogelio Seañez, Oc. Alejandrina Jiménez y en especial a Paulina Valenzuela Wood que con su ayuda, compañerismo y además su sincera amistad hicieron de este trabajo algo bellissimo.

Al equipo del laboratorio de microalgas Oc. Filiberto Nuñez y M.C. Fabiola Lafarga por llevar acabo los cultivos con su mejor disposición.

A M.C. Héctor Atilano por prestarme los reactivos que me hicieron falta para realizar este trabajo.

A M.C. Víctor Macías Carranza y al equipo de Geoquímica por su apoyo en las lecturas de nutrientes

A todos los investigadores del I. I. O que con su saludo matutino alegraban mi día de trabajo: Dr. Mascarenhas, Biol. Mario Siri, Dr. Víctor Camacho, Dr. Carriquiry, M.C. Julio Villaescuza, M.C. Pedro Castro alias "manguito", Dr. Martín Hernández, Dra. Lorena Ríos, M.C. Román Lizárraga, M.C. Sergio Larios "Chato",

M.C Albino Muñoz, Dr. Francisco Delgadillo, M.C. Antonio Segovia, Oc. Alfredo Chee, Oc. Arturo Siqueiros.

A Miguel Arsuaga Migueltoarena por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por mis extrañas visitas a su casa y por sus sabios consejos, te quiero Miguel, gracias!!!.

A mis todos mis tíos y primos que estuvieron al pendiente de mi formación como oceanóloga: Jorge y familia, David y familia, Carlos y familia, Rafael, Oscar, Fernando Ocegüera y Raquel Simental.

A los que ya no están conmigo y que me han hecho mucha falta: mi Abuela Trini, mis tíos Roberto, Lourdes y Chato que se rehusan a dejarme sin iluminarme el caminito.

A mis tíos de esta zona que estuvieron al pendiente de mi Emma Ocegüera, Rafael Ocegüera y la familia Choza-Loperena.

A Miriam González y a la familia Carmona-García T., por su amistad y ayuda incondicional en este trabajo.

A la familia Valenzuela Wood por permitir entrar en su casa y darme a mi hermoso ahijado Roberto, los quiero mucho!!!!!!.

A la familia de la Maestra Vicky por ser casi una de ellos.

A mis amigas del alma Rosy Gutiérrez y Libia Zaragoza quienes han estado presentes en gran parte de mi vida y las quiero muchísimo!. Todas para una y una para todas!!!!.

A las familias Delforge y Delille por todo su cariño demostrado durante todo el tiempo que he pasado lejos de ellos.

A quienes de alguna manera han ido aumentando mi familia y que han formado parte de todo esto a Juan Carlos, Mily y Olivia.

A mi hermana Mary y a su hijo tan hermoso Andrés por estar al pendiente los amo!!.

A Pablo Saénz Aguilar por su ayuda incondicional de cortar tubos, de tomar muestras, de acompañarme en el laboratorio a altas horas de la madrugada, de sus correcciones a la hora de escribir y especialmente por su cariño.....

A la familia Saéñz-Aguilar por abrirme las puertas de su casa y permitirme convivir con ellos y pasar momentos tan gratos.

A mi gran amiga Elia Kim, que me tendió la mano cuando le necesite y que para todo estuvimos juntas.

A mi grupo de amigas que al final de este proceso marcaron una linda amistad y compañerismo: Estefanía Medina, Claudia Moreno, Mónica Montiel y Denisse Sánchez.

A mi muy reciente amiga y compañera Alejandrina Jiménez que su aliento fue muy marcado para la etapa final de este proceso, eres genial!!!!.

A mis dos grandes amigos: Juan Pablo Cantú y Luis Enriquez, que son los mejores! Por siempre!!!.

A la gente que a través del deporte me dieron muchas satisfacciones: Pedro Sida, Lijia y Chón; CIMARRONA DE CORAZÓN!!!.

A los que simplemente por su amistad estuvieron conmigo en las buenas y en las malas: Ruth Varela, Fernanda García, Eli Iris, Rodrigo Gómez, Julito Hernández, Titino Munch, Benjas López, Etel Serrano, Ross Nava, Israel López, Tania Gómez, Zaida Garivay, Maira Juárez, Angel Carrillo, Edgar Escalante, Daniel, Pollo, Julio "el clavado", Nallely Estavillo, Jorge Fonseca, Pedro Medina, Sinhué, Fabian, Carlos, Charly Cruz, Marianita, Hiram Rivera, MariCa Ruiz, Miguel Angel Lozano, Jorge Arturo Simental alias "Tatanka", Ricardo Hernández alias "Ambriz", Miguel Angel, Sergio Papas, Eduardo Topete, Roy Villavicencio, Juan, Oscar Molina, Benjamín Rico, Nallely Krauss, Jorge López, Andrés el hormiga, Diego Raciél, Erick el Tucán, Horacio, el Chino, Meño, Luis, Javier "orejón" y a todos a los que estuvieron de algún modo relacionados con mi camino y que por falta de memoria no estuvieron palmados en este escrito.

A Dios por darme la oportunidad de estudiar, ser alguien en la vida y por darme a la familia más maravillosa del planeta!!.

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE	I.
LISTA DE TABLAS	II.
LISTA DE FIGURAS	III.
1. INTRODUCCIÓN.....	1.
1.1 Antecedentes.....	4.
1.2 Objetivos	6.
1.3 Hipótesis.....	7.
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8.
2.1 Microalgas.....	8.
2.2 Bacterias.....	9.
2.3 Nutrientes.....	11.
2.4 Parámetros poblacionales.....	11.
2.5 Análisis de datos.....	12.
3. RESULTADOS.....	13.
4. DISCUSIÓN.....	41.
5. CONCLUSIÓN.....	49.
6. LITERATURA CITADA.....	50.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.- Concentración promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) (cél·ml⁻¹)..... 14.
- Tabla 2.- Concentración promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) en el cultivo de *Rhodomonas* sp. (cél·ml⁻¹)..... 14.
- Tabla 3.- Concentraciones promedio de *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp. (NMP·100ml⁻¹) y nutrientes residuales (μM) en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso).....16.
- Tabla 4.- Concentraciones promedio de *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp. (NMP·100ml⁻¹) y nutrientes residuales (μM) en el cultivo de *Rhodomonas* sp. (cél·ml⁻¹).....16.
- Tabla 5.- Concentración de bacterias heterótrofas y de *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) en el agua de mar utilizada para el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp.....17.
- Tabla 6.- Parámetros poblacionales del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso). 19.
- Tabla 7.- Parámetros poblacionales de bacterias heterótrofas del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso).....20.
- Tabla 8.- Parámetros poblacionales del cultivo de *Rhodomonas* sp.....21.
- Tabla 9.- Parámetros poblacionales de bacterias heterótrofas del cultivo de *Rhodomonas* sp..... 22.
- Tabla 10.- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Erlenmeyer..... 24.
- Tabla 11.- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Fernbach..... 24.
- Tabla 12.- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Garrafón..... 25.

Tabla 13.- Análisis de correlación del cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp. a nivel Erlenmeyer.....	25.
Tabla 14.- Análisis de correlación del cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp. a nivel Fernbach.....	26.
Tabla 15.- Análisis de correlación del cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp. a nivel Garrafón.....	26.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) y NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} (μM) del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 28.
- Figura 2.- Concentración de *Nitrosomonas* sp. (Ns), *Nitrobacter* sp. (Nb) (NMP/100ml) y NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} (μM) en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 30.
- Figura 3.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) (cél/ml) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 32.
- Figura 4.- Tasa de crecimiento de bacterias heterótrofas (μB) y de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso)(μI) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 33.
- Figura 5.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) y NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} (μM) del cultivo de *Rhodomonas* sp. en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 35.
- Figura 6.- Concentración de *Nitrosomonas* sp. (Ns), *Nitrobacter* sp. (Nb) (NMP/100ml) y NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} (μM) en el cultivo de *Rhodomonas* sp. en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 37.
- Figura 7.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* (V) (UFC/ml) en el cultivo de *Rhodomonas* sp.(cél/ml) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.....39.
- Figura 8.- Tasa de crecimiento de bacterias heterótrofas (μB) y de *Rhodomonas* sp. (μR) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón..... 40.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la acuicultura puede contribuir de manera significativa a la economía del país mediante el cultivo de peces, crustáceos y moluscos. No obstante, el éxito de esta actividad depende, en gran parte, de la calidad y cantidad del alimento proporcionado.

El alimento que regularmente se usa en acuicultura son las microalgas. Estas constituyen una fuente de carbono y energía las cuales son necesarias para los organismos durante su cultivo (González-Del Valle, 1997; Rico-Mora, 1995; Camiro-Vargas, 2001). Existe evidencia que las microalgas son el eslabón más importante en acuicultura, principalmente en cultivos larvarios de moluscos, crustáceos y peces, así como también, para algunas especies intermedias como son copépodos, rotíferos y artemias. Además son la base de la cadena alimenticia, por lo cual, es la importancia de producir y mantener poblaciones fitoplanctónicas saludables (González-Del Valle, 1997).

Tradicionalmente, en los laboratorios de producción de microalgas se utilizan cultivos discontinuos o estáticos los cuales consisten en la inoculación de células en un recipiente con agua de mar enriquecida para promover su crecimiento (Valenzuela-Espinoza, 1997). En este tipo de cultivos la razón de crecimiento y productividad dependen de la de la fisiología de la especie, no obstante el tiempo del cultivo es un factor que se debe considerar para su uso como alimento, ya que puede constituir un riesgo debido a la acumulación de metabolitos de las propias microalgas o de las bacterias asociadas (González-Medina, 1991). De manera adicional, al cultivo de microalgas se les provee de factores físico-químicos esenciales como son la adición de nutrientes, temperatura, características del recipiente, aireación y provisión de CO₂ para el control de pH (Sánchez-Saavedra, 1989; Lafarga-De la Cruz, 2000).

De manera natural los cultivos estáticos tienen un tiempo de vida limitado, pasando a través de una serie de fases que van desde la inoculación hasta la muerte del cultivo (González-Medina, 1991).

Es de destacar que a pesar de los esfuerzos que se han hecho para desarrollar alimentos alternos, los cuales garantizan niveles aceptables de sobrevivencia y de crecimiento en los organismos cultivados (Droop, 1975; Becker, 1986 y Laing *et al.*, 1987), en la actualidad las prácticas acuiculturales siguen dependiendo de la producción de microalgas. En forma adicional se ha encontrado que la sobrevivencia y crecimiento de organismos marinos en sistemas de cultivo dependen de la cantidad y calidad del alimento proporcionado (Douillet y Langdon, 1993).

Se tiene conocimiento que en los cultivos de microalgas se presentan concentraciones significativas de bacterias marinas y su efecto puede ser inofensivo y en ocasiones hasta positivo, ya que las bacterias contribuyen a la mineralización de sustratos orgánicos. Sirven además como fuente de alimento adicional para organismos filtradores cultivados. Por el contrario cantidades elevadas de bacterias pueden crear problemas de patogenicidad y condiciones perjudiciales debido a sus productos metabólicos (Rico-Mora, 1995). Tanto la presencia elevada y la ausencia absoluta de bacterias hace que el cultivo tienda a colapsarse (Suminto y Hirayama, 1997), por tanto las bacterias marinas en los cultivos de microalgas tienen un doble papel ya que pueden llegar a ser agentes benéficos o bien por el contrario ser patógenas.

Las bacterias marinas en el ambiente marino son benéficas porque regeneran los nutrientes esenciales para el crecimiento del fitoplancton como son NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , etc., a partir de sustratos orgánicos liberados por el fitoplancton, tales como vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y antibióticos, efectuándose

una retroalimentación metabólica (Larsson y Hagstrom, 1979; Nalewajko *et al.*, 1980; Iturriaga y Zsolnay, 1981; Kogure *et al.*, 1982; Moller, 1983; Nalewajko, 1987; Riquelme, 1989).

Se conoce que las bacterias heterótrofas son capaces de aprovechar la materia orgánica disuelta principalmente, y también en estado coloidal. Así, mediante la actividad exoproteolítica producen compuestos monoméricos libres tales como C, N, P y S, los cuales se incorporan de nuevo en el medio, por lo que se puede decir que las bacterias controlan la distribución espacial y temporal de estos bioelementos (Zobell, 1961; Castellví, 1972; Azam *et al.*, 1983; Hopkinson y Vallino, 1994). Se tienen antecedentes que el nitrógeno es el nutriente clave que controla el crecimiento del fitoplancton en sistemas de cultivo, en donde se pueden llevar a cabo diversos procesos biológicos como: a) amonificación; b) asimilación de nitrógeno y c) nitrificación. De estos tres procesos, el que tiene una mayor importancia en los cultivos de microalgas es la nitrificación.

La nitrificación es un proceso mediante el cual el amonio se convierte a nitrito y el nitrito a nitrato, mediante la acción consecutiva de las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Hay que destacar que las bacterias nitrificantes (autotróficas) tienen tiempos de generación largos en comparación con las heterótrofas, teniendo relación con la disponibilidad de los de bioelementos necesarios para su crecimiento ya que las heterótrofas dependen de cualquier tipo de sustrato, mientras que las autotróficas requieren compuestos químicos específicos (Wheaton, 1977).

Por otra parte, se conoce que las bacterias marinas desempeñan un papel como agentes patógenos en los sistemas de acuicultura, esto ha sido reconocido ampliamente en la literatura. Algunos autores, mencionan que la presencia de bacterias patógenas en los cultivos de microalgas, puede ser dañina para algunas especies cultivables que se alimentan de ellas como moluscos, crustáceos y peces;

así como para el consumidor final (hombre). Además, pueden colapsar los cultivos de microalgas (González-Del Valle, 1997). Entre las bacterias patógenas que mayormente se encuentran en cultivos de microalgas se pueden mencionar a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*.

Estos dos géneros de bacterias comúnmente provocan problemas en diversos sistemas de cultivo. Por ejemplo, se asocian con problemas en el crecimiento de microalgas ya que se ha documentado que ocasionan en la población un crecimiento irregular, la mayoría de las veces inestable, con fases de retraso muy largas y estacionarias muy cortas (Okauchi, 1991).

1.1.- ANTECEDENTES

Investigaciones realizadas en cultivos de fitoplancton a nivel mundial han encontrado de manera sistemática bacterias heterótrofas ya que es difícil mantener a los cultivos completamente axénicos; un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Lodeiros-Seijo (1988) el cual efectuó un análisis en tres diferentes cultivos microalgales utilizados como alimento en larvas de moluscos y llegó a la conclusión que la proliferación bacteriana (1×10^7) en los cultivos algales se debe a la adición de nutrientes los cuales son generados por las propias microalgas, puesto que algunos productos de éstas pueden favorecer al crecimiento de las bacterias marinas.

Investigaciones realizadas a nivel local en el Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, indican que, no obstante que se toman medidas preventivas para mantener la población de microalgas lo más axénicamente posible, se pueden presentar concentraciones de bacterias heterótrofas y de *Vibrio*, las cuales son transferidas a los organismos cultivados.

Por ejemplo, Lizárraga-Partida (1987) encontró concentraciones de 1×10^5 ml^{-1} de bacterias heterótrofas en nueve cultivos de microalgas del mismo laboratorio, destacando el hecho de que podían ser transferidas al cultivo de larvas de *Crassostrea gigas*. Por otra parte, Santiago-Serrano (1996) encontró en la microalga *Rhodomonas* sp. del mismo laboratorio de acuicultura, concentraciones de 2.35×10^6 bacterias heterótrofas. Esta microalga comúnmente se da como alimento a diversos organismos cultivados entre los cuales se encuentran el erizo y mejillón, por lo que se encontraron concentraciones importantes de estas bacterias en los estanques del cultivo del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*.

En el aspecto ecológico un trabajo interesante que ilustra la relación microalgas-bacterias es el de González-Del Valle (1997), el cual estudió el crecimiento de seis especies de microalgas y de las poblaciones bacterianas asociadas, a partir de los datos obtenidos comparó las tasas de crecimiento en la fase exponencial, el rendimiento total y óptimo del cultivo así como la densidad final de células microalgales y de bacterias. Una de sus conclusiones fue que existe un claro paralelismo entre las curvas de crecimiento de las poblaciones de microalgas y la de sus poblaciones bacterianas, lo que llevó a considerar que existe una relación de dependencia entre ambas. También efectuó un seguimiento de la evolución de nutrientes del cultivo para poder determinar los efectos de las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono de que disponen las algas y las bacterias, encontrando que existe una gran variabilidad de ellos, particularmente del nitrógeno.

Por otra parte Valenzuela-Espinoza (1988; 1997), Lafarga-De la Cruz (2000) y Camiro-Vargas (2001) encontraron en cultivos de microalgas, que las tasas de crecimiento específico, tiempos de duplicación, producción diaria y las diversas etapas de su curva de crecimiento, dependen de las concentraciones de nitratos, fosfato, nitritos y amonio presentes en el medio. Por ejemplo, Camiro-Vargas (2001) encontró que el consumo de nutrientes en *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis*

galbana (CLONE T-Iso) fue similar, reportando que los fosfatos y nitratos disminuyeron en su concentración en el medio, en tanto que el nitrito y el amonio aumentaron conforme transcurrió el tiempo de cultivo, lo que sugiere que deben existir otros procesos acoplados al crecimiento microalgal, los cuales deben ser investigados para tratar de explicar el papel de las bacterias en el balance de nutrientes en los sistemas de cultivos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), así como su posible relación ecológica o fisiológica. La presente investigación pretende aportar información concerniente al estudio sobre la interacción microalga-bacteria ya que en la actualidad los estudios son escasos y pocos consideran muestreos sistemáticos.

1.2.- OBJETIVOS

- Estudiar que relación existe entre las microalgas. *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), *Rhodomonas* sp. y bacterias en los sistemas de cultivo
- Cuantificar bacterias heterótrofas totales, *Vibrio* sp. y bacterias nitrificantes en de cultivos estáticos de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp.
- Cuantificar bacterias heterótrofas totales y *Vibrio* sp. en el agua de mar utilizada en el cultivo
- Comparar la tasa de crecimiento de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) respecto a la población bacteriana
- Encontrar la relación entre nutrientes y bacterias nitrificantes

1.3.- HIPÓTESIS

La población bacteriana influye en la concentración de nutrientes en los cultivos de las microalgas *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. debido a su consumo y remineralización. Se espera una sucesión de especies nitrificantes, presentándose primero *Nitrosomonas* y posteriormente *Nitrobacter*, las cuales cambian el nivel de oxidación del nitrógeno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Microalgas

Las diferentes especies de microalgas empleadas en el presente trabajo se escogieron debido a su importancia comercial como alimento y por su tamaño. *Isochrysis aff galbana* (Clone T-Iso) mide entre 5 a 7 micras y *Rhodomonas* sp. entre 8 y 12 micras. El tamaño es importante porque la razón superficie volumen está asociada con el consumo de nutrientes (Camiro-Vargas, 2001).

Las cepas de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. empleada para este estudio fue adquirida de la colección de cultivos unialgales que se encuentra en el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Se utilizaron de manera consecutiva tres niveles de cultivo: Erlenmeyer (200 ml), Fernbach (2 L) y Garrafón (18 L).

La elaboración de los medios de cultivo se basó en la formulación del medio f/2 propuesto por Guillard (1975). Las vitaminas que se utilizaron fueron tiamina hidroclorehídrica, vitamina B₁₂ y d-biotina. Estas vitaminas se mezclaron en proporciones iguales y se esterilizaron en autoclave durante 5 minutos a 121 °C y 1.05 kg cm⁻².

Sólo para el cultivo de *Rhodomonas* sp., la concentración de nitrato y fosfato se incrementó en un 50% de su concentración original especificada en el medio f/2, ya que esta concentración da mejores resultados el cultivo (Valenzuela-Espinoza com. Per.).

El agua de mar que se utilizó para la preparación de los medios se filtró mediante filtros tipo kunno de 1 y 0.65 μm y se irradió con luz UV. Para Erlenmeyer y Fernbach, el medio de cultivo se esterilizó durante 15 minutos a 121 $^{\circ}\text{C}$ y 1.05 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. En el nivel Garrafón, el agua de mar se trató con hipoclorito de sodio y neutralizada con tiosulfato de sodio (Pruder y Bolton, 1978)

El nivel Erlenmeyer se usó como inóculo para el Fernbach y el Fernbach para Garrafón.

Los cultivos se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada de 20 ± 1 $^{\circ}\text{C}$. La iluminación fue continua suministrada por lámparas day-light General Electric de 75 W.

Los cultivos Erlenmeyer y Fernbach se agitaron diariamente para evitar el asentamiento de células y favorecer el intercambio gaseoso entre el medio y la atmósfera circundante. Para el nivel Garrafón se suministró un flujo de aire de 4.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (flujómetro Gildmont) mediante un soplador.

En todos los niveles de cultivo se realizó la cuantificación diaria de células previamente preservadas con lugol mediante conteos directos al microscopio compuesto con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

2.2. Bacterias

Diariamente se tomaron muestras con jeringas estériles y se depositaron en bolsas de plástico esterilizadas. Las muestras microbiológicas se analizaron en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

Para la cuantificación de bacterias heterótrofas se usó el medio Zobell, mientras que, para bacterias patógenas del género *Vibrio* se utilizó el medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS); ambos medios se inocularon mediante el método de veteado en placa con 0.1 ml de muestra, incubándose entre 22 a 25°C durante 48 horas.

El conteo de las colonias se hizo mediante un contador tipo Quebec, mismas que se multiplicaron por el factor de dilución empleado. El resultado se registró como unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC·ml⁻¹).

Las bacterias nitrificantes se determinaron según la metodología número más probable propuesta por U.S. Geological Survey (1997); sólo cambiando la metodología de la preparación de medios con agua de mar al 75 %. Se utilizaron los medios amonio calcio carbonatado para *Nitrosomonas* sp. y el medio nitrito calcio carbonatado para *Nitrobacter* sp. Se prepararon 3 series de tubos con 3 ml de medio y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos y a 15 libras de presión. Las muestras inoculadas se incubaron a 28°C por 21 días.

Las lecturas de las bacterias nitrificantes se realizaron con el reactivo Griess-Ilosvay (U.S. Geological Survey, 1997). A las muestras se les agregó una gota del reactivo esperando cinco minutos la reacción; sí los tubos se tornaron de un color rojo púrpura para *Nitrosomonas* sp. el resultado fue positivo y lo contrario para *Nitrobacter* sp. si tornaban rojo púrpura eran negativos teniendo como opción de que los tubos para *Nitrosomonas* sp. que daban resultado negativo se les añadió una pizca de una mezcla de dióxido de zinc, cobre y manganeso (U.S. Geological Survey, 1997), que habiendo un cambio de coloración a tornarse a púrpura, este se consideró positivo, para obtener los datos para calcular el número más probable (NMP·100 ml⁻¹).

2.3. Nutrientes

Las muestras para medir nutrientes se llevaron acabo simultáneamente con las bacterianas y microalgales.

Se tomó una alícuota de 25 ml con una jeringa de las muestras de microalgas. Posteriormente, se filtró mediante un sistema de filtración utilizando filtros de fibra de vidrio de 25 mm. El agua del filtrado se analizó con un autoanalizador de nutrientes de flujo segmentado marca SKALAR, con cuatro canales para análisis simultáneos de nitrato + nitrito, amonio y fosfatos. Además, cuenta con un manejo automatizado del registro y procesamiento de los datos por medio de una computadora.

2.4 Parámetros poblacionales

De los resultados obtenidos de los conteos de microalgas y de bacterias heterótrofas se determinó la tasa de crecimiento específica (μ), divisiones por día (D), tiempo de duplicación (TD) y producción diaria (PD) de acuerdo a las metodología propuesta por Guillard (1973).

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

μ = Tasa de crecimiento específica en días

N_1 = Número de células al tiempo t_1

N_2 = Número de células al tiempo t_2

t_1 y t_2 = tiempo inicial y final en días.

$$D = \frac{\mu}{\ln 2}$$

D= Número de divisiones por día

μ = Tasa de crecimiento específica

$$TD = \frac{1}{D}$$

TD= tiempo de duplicación en días

D= Divisiones por día

PD= Es la diferencia del número de células producidas entre el tiempo t_1 y el tiempo t_2 .

2.4. Análisis de Datos

Debido a la naturaleza de este trabajo el diseño experimental solo contempla un tratamiento sin replicas para cada una de las especies en cultivo debido a que implicaría un mayor esfuerzo en reactivos, materiales y horas de trabajo en el laboratorio, por lo que la estadística a utilizar no será comparativa, si no sólo será una herramienta para poder justificar las relaciones que existen entre cada variable de los cultivos por separado.

De los datos obtenidos en los tres niveles de sistema de cultivo de las microalgas, a cada variable se les calculó el promedio y adicionalmente, para determinar la relación entre ellas, se hicieron análisis de correlación de las variables para cada nivel de cultivo, auxiliándose con una representación gráfica de la información. Los análisis se hicieron con el paquete STATISTICS para Windows.

3. RESULTADOS

De manera adicional al análisis de nitrato, nitrito y fosfato se estimó la concentración de amonio en los cultivos de microalgas. Los resultados obtenidos fueron en general un orden de magnitud mayor a los reportados en otros trabajos. Por tanto, se sospechó que las muestras se contaminaron ya que existe antecedentes de que las concentraciones de amonio pueden incrementarse por fumar, comer pescado, tomar café, etc. Debido al alto sesgo en las muestras de microalgas se decidió eliminar los resultados de este parámetro.

En la tabla 1 se muestra la concentración promedio de las bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) del sistema de cultivo de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), los valores obtenidos de bacterias heterótrofas en los tres niveles fueron de 2.23X10⁶, 2.44X10⁶ y 3.72X10⁶ ocurriendo el máximo (18.55 X10⁶) a nivel Garrafón y el mínimo (0.003X10⁶) en Erlenmeyer. Para las bacterias del género *Vibrio* la máxima concentración promedio fue de 720 a nivel Fernbach, mientras que la mínima fue de 13 en Erlenmeyer. La concentración promedio de las células microalgales en los tres niveles fue de 3.3X10⁶, 3.6X10⁶ y 5.82X10⁶ (cel·ml⁻¹).

La concentración promedio de las bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) del sistema de cultivo de la microalga *Rhodomonas* sp. (Tabla 2), muestra que la mayor concentración promedio de bacterias heterótrofas (2.56X10⁶) fue a nivel Garrafón, mientras que la concentración promedio mínima fue de 0.53X10⁶ en Erlenmeyer; el valor máximo fue de 20.25X10⁶ en Garrafón y el mínimo de 0.00289X10⁶ en Erlenmeyer. La mayor concentración promedio de *Vibrio* sp. fue de 50 y se encontró en Fernbach, mientras que la concentración promedio mínima fue de 20 en Erlenmeyer; por otra parte, las bacterias *Vibrio* fluctuaron entre las 0 y 240. La concentración promedio de las células microalgales fue de 0.5X10⁶, 0.51X10⁶ y de 0.56X10⁶ (cel·ml⁻¹).

Tabla 1.- Concentración promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC:ml⁻¹) en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) (cél:ml⁻¹).

Nivel	n	Heterótrofas UFC:ml ⁻¹ X 10 ⁶			<i>Vibrio</i> sp. UFC:ml ⁻¹			<i>Iso</i> cél:ml ⁻¹ X 10 ⁶
		\bar{X}	max-min	Intervalo	\bar{X}	Max-min	intervalo	
Erlenmeyer	6	2.23	5.7 0.003	5.7	13	80 0	80	3.3
Fernbach	5	2.44	5.15 0.087	5.06	720	3,000 0	3,000	3.63
Garrafón	11	3.72	18.55 0.1	18.45	33	200 0	200	5.82

Tabla 2.- Concentración promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio* sp. (UFC:ml⁻¹) en el sistema de cultivo de *Rhodomonas* sp. (cél:ml⁻¹).

Niveles	n	Heterótrofas UFC:ml ⁻¹ X10 ⁶			<i>Vibrio</i> sp. UFC:ml ⁻¹			<i>Rho</i> cél:ml ⁻¹ X 10 ⁶
		\bar{X}	max-min	Intervalo	\bar{X}	max-min	intervalo	
Erlenmeyer	6	0.53	1.4 0.00289	1.4	20	10 0	10	0.5
Fernfach	5	2.35	8.7 0.1	8.6	50	240 0	240	0.51
Garrafón	11	2.56	20.25 0.1	20.25	25	70 0	70	5.6

\bar{X} = media, n= número de muestras, max= máximo, min= mínimo,

La concentración promedio de las bacterias nitrificantes ($\text{NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) y de nutrientes residuales (μM) en el sistema de cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) se muestran en la tabla 3, las concentraciones de *Nitrosomonas* sp. en los tres niveles fueron de 842, 422 y 263 ocurriendo el máximo (1,258) en Erlenmeyer. Las concentraciones promedio de *Nitrobacter* sp. en los tres niveles fueron de 187, 379 y 315. La mayor concentración residual de nitrito (125.5) y nitrato (80.75) se presentó en Fernbach. Con respecto al fosfato la concentración máxima residual 31.5 ocurrió en Erlenmeyer.

En la tabla 4 se observa las concentraciones promedio de bacterias nitrificantes ($\text{NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) y de nutrientes residuales (μM) en el sistema de cultivo de *Rhodomonas* sp. Las concentraciones promedio de *Nitrosomonas* en los tres niveles fueron de 187, 35 y 210 y los máximos se encontraron en Erlenmeyer y Garrafón (948). La concentración promedio máxima de *Nitrobacter* fue de 344 en Garrafón y la mínima de 12 ocurrió en Fernbach. La mayor concentración residual de nitrito 213 se presentó en Fernbach. Las concentraciones máximas residuales de nitrato y fosfato fueron de 315.75 y 11.25, respectivamente, y se presentaron a nivel Fernbach y Erlenmeyer.

La concentración de bacterias heterótrofas y del género *Vibrio* ($\text{UFC}\cdot \text{ml}^{-1}$) en el agua de mar utilizada para el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. se muestra en la tabla 5. La mayor concentración de bacterias heterótrofas y de *Vibrio* sp. en la pila de abastecimiento ocurrió en el primer día de muestreo con $0.00212\cdot 10^6$ y 610, respectivamente. La mayor concentración de bacterias heterótrofas en el agua filtrada $0.003\cdot 10^6$ se presentó en los días 1 y 10, mientras que el máximo de *Vibrio* sp. 530 se presentó en el día 6. Con respecto al agua pasada por UV la mayor concentración de bacterias heterótrofas se presentó el día 10 con $0.000745\cdot 10^6$. En general la concentración de *Vibrio* sp. fue menor con respecto a los otros tratamientos siendo el valor máximo de 5.

Tabla 3.- Concentraciones promedio de *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp. (NMP·100 ml⁻¹) y nutrientes residuales (μM) en el sistema de cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso).

Niveles	<i>Nitrosomonas</i> sp. (NMP 100 ml ⁻¹)			<i>Nitrobacter</i> sp. (NMP 100 ml ⁻¹)			Nutrientes (μM)			
	n	\bar{X}	max	min	\bar{X}	max	min	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
Erlenmeyer	6	842	1258	948	187	948	0	41.75	39.25	31.5
Fernbach	5	422	948	20	379	948	0	125.5	80.75	5.25
Garrafón	11	263	948	0	315	948	0	4.25	39.63	2.94

Tabla 4.- Concentraciones promedio de *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp. (NMP·100⁻¹) y nutrientes residuales (μM) en el sistema de cultivo de *Rhodomonas* sp.

Niveles	<i>Nitrosomonas</i> sp. (NMP 100 ml ⁻¹)			<i>Nitrobacter</i> sp. (NMP 100 ml ⁻¹)			Nutrientes (μM)			
	n	\bar{X}	max	min	\bar{X}	max	min	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
Erlenmeyer	6	187	948	0	316	948	0	126.75	126	11.25
Fernbach	5	35	173	0	12	40	0	213	315.75	7.5
Garrafón	11	210	948	0	344	1664	0	207.12	116.45	3.97

\bar{X} = media, n= número de muestras, max= máximo, min= mínimo, NO₂⁻=nitrito, NO₃⁻=nitrato, PO₄³⁻=fosfato

Tabla 5.- Concentración de bacterias heterótrofas y de *Vibrio* sp. (UFC·ml⁻¹) en el agua de mar utilizada para el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), y *Rhodomonas* sp.

Lugar de muestreo	Día*	Heterotrofas UFC ml ⁻¹ X10 ⁶	<i>Vibrio</i> spp. UFC ml ⁻¹
Pila de abastecimiento	1	0.00212	610
	6	0.001025	95
	10	0.00105	220
Filtrada	1	0.003	495
	6	0.00266	530
	10	0.003	60
U.V.	1	0.000155	5
	6	0.000175	0
	10	0.000745	0
Agua Clorinada Iso	10	0.00028	10
Agua Clorinada Rho	10	0.00017	30

* El número de los días representan: día 1 es en nivel Erlenmeyer, día 6 es en Fernbach y el día 10 es en Garrafón.

En la tabla 6 se observan los parámetros poblacionales del cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso). A nivel Erlenmeyer el promedio de la tasa de crecimiento, división celular y tiempo de duplicación (día^{-1}) fueron 0.651, 0.940 y 0.896, respectivamente. A nivel Fernbach el promedio de la tasa de crecimiento división celular y tiempo de duplicación fueron de 0.390, 0.563 y 1.497, respectivamente; mientras que a nivel Garrafón los resultados fueron 0.416, 0.601 y 4.682, respectivamente.

Los parámetros poblacionales de las bacterias heterótrofas en el cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso) se observan en la tabla 7, los promedios de la tasa de crecimiento, división celular y tiempo de duplicación (día^{-1}) a nivel Erlenmeyer fueron de 1.199, 1.730 y 0.052, respectivamente. A nivel Fernbach fueron de 0.680, 0.981 y 0.884, respectivamente; mientras que a nivel Garrafón fueron de -0.270, -0.389 y -0.461, respectivamente.

En la tabla 8 se observan los parámetros poblacionales del cultivo de *Rhodomonas* sp. A nivel Erlenmeyer los promedios de la tasa de crecimiento, división celular y tiempo de duplicación (día^{-1}) fueron 0.610, 0.881 y 1.113, respectivamente. A nivel Fernbach los promedios de la tasa de crecimiento división celular y tiempo de duplicación fueron de 0.404, 0.583 y 1.259, respectivamente; mientras que a nivel Garrafón los resultados fueron 0.426, 0.615 y 1.592, respectivamente.

En la tabla 9 se proporcionan los parámetros poblacionales de las bacterias heterótrofas en el cultivo de *Rhodomonas* sp. El promedio de la tasa de crecimiento, división celular y tiempo de duplicación (día^{-1}) a nivel Erlenmeyer fue de 1.030, 1.486 y 0.855, respectivamente. En nivel Fernbach el promedio fue de 0.742, 1.071 y 1.003, respectivamente. Por último, a nivel Garrafón los promedios fueron de 0.464, 0.670 y -0.223, respectivamente.

Tabla 6.- Parámetros poblacionales del cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso).

Erlenmeyer					
día	Concentración cél·ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél·ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.1727	0	0	0	0
1	0.3475	0.699	1.008	0.991	1.748
2	1.2091	1.246	1.798	0.555	0.8616
3	3.4433	1.046	1.509	0.662	2.2342
4	6.0166	0.558	0.805	1.241	2.5733
5	8.6166	0.359	0.518	1.929	2.6
\bar{X}		0.651	0.940	0.896	
Fernbach					
día	Concentración cél·ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél·ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.6475	0	0	0	0
1	1.4866	0.831	1.199	0.833	0.8391
2	3.2266	0.774	1.117	0.894	1.74
3	6.0333	0.625	0.902	1.107	2.8067
4	6.7533	0.112	0.162	6.148	0.72
\bar{X}		0.390	0.563	1.497	
Garrafón					
día	Concentración cél·ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél·ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.603	0	0	0	0
1	1.437	0.868	1.252	0.798	0.8342
2	3.18	0.793	1.145	0.873	1.7425
3	5.503	0.548	0.791	1.263	2.3233
4	7.133	0.259	0.374	2.671	1.63
5	7.356	0.030	0.044	22.487	0.2233
6	7.746	0.051	0.074	13.418	0.39
7	8.306	0.069	0.100	9.930	0.56
8	8.793	0.056	0.082	12.173	0.4867
9	7.033	-0.223	-0.322	-3.103	---
10	6.9	-0.019	-0.027	-36.224	---
\bar{X}		0.416	0.601	4.682	

μ = tasa de crecimiento, D= divisiones celulares, TD= tiempo de duplicación y PD= producción diaria (día⁻¹), \bar{X} = media

Tabla 7.- Parámetros poblacionales de bacterias heterótrofas del cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso).

Erlenmeyer					
Día	Concentración célml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) célml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.003	0	0	0	0
1	0.127	3.745	5.403	0.185	0.124
2	0.425	1.207	1.742	0.573	0.298
3	3.150	2.003	2.889	0.346	2.725
4	5.7	0.593	0.855	1.168	2.550
5	4	-0.354	-0.510	-1.957	---
\bar{X}		1.199	1.730	0.052	
Fernbach					
Día	Concentración célml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) célml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.087	0	0	0	0
1	0.300	1.237	1.785	0.559	0.213
2	2.65	2.178	3.142	0.318	2.35
3	4	0.411	0.594	1.683	1.35
4	5.15	0.252	0.364	2.742	1.15
\bar{X}		0.680	0.981	0.884	
Garrafón					
Día	Concentración célml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) célml ⁻¹ X10 ⁶
0	18.55	0	0	0	0
1	0.3	-4.124	-5.950	-0.168	---
2	2.7	2.197	3.169	0.315	2.4
3	5.5	0.711	1.026	0.974	2.8
4	2.05	-0.986	-1.423	-0.702	---
5	4.95	0.881	1.271	0.786	2.9
6	0.1	-3.901	-5.629	-0.177	---
7	0.3	1.098	1.584	0.630	0.2
8	2.9	2.268	3.273	0.305	2.6
9	2.6	-0.109	-0.157	-6.347	---
10	0.95	-1.006	-1.452	-0.688	---
\bar{X}		-0.270	-0.389	-0.461	

μ = tasa de crecimiento, D= divisiones celulares, TD= tiempo de duplicación y PD= producción diaria (día⁻¹), \bar{X} = media.

Tabla 8.- Parámetros poblacionales del cultivo de *Rhodomonas* sp.

Erlenmeyer					
Día	Concentración cél/ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél/ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.037	0	0	0	0
1	0.048	0.247	0.357	2.797	0.010
2	0.090	0.631	0.910	1.098	0.042
3	0.371	1.409	2.032	0.491	0.280
4	0.94	0.928	1.338	0.746	0.568
5	1.472	0.448	0.647	1.544	0.532
\bar{X}		0.610	0.881	1.113	
Fernbach					
0	0.084	0	0	0	0
1	0.254	1.105	1.595	0.626	0.170
2	0.443	0.556	0.802	1.245	0.189
3	0.818	0.613	0.885	1.129	0.375
4	0.953	0.152	0.219	4.557	0.134
\bar{X}		0.404	0.583	1.259	
Garrafón					
0	0.051	0	0	0	0
1	0.184	1.271	1.835	0.544	0.132
2	0.270	0.385	0.556	1.796	0.086
3	0.396	0.381	0.550	1.815	0.125
4	0.531	0.292	0.422	2.367	0.134
5	0.668	0.228	0.330	3.028	0.136
6	0.790	0.167	0.241	4.143	0.121
7	0.822	0.040	0.058	17.193	0.032
8	0.866	0.052	0.075	13.271	0.044
9	0.846	-0.023	-0.033	-29.686	---
10	0.759	-0.109	-0.157	-6.353	---
\bar{X}		0.426	0.615	1.592	

μ = tasa de crecimiento, D= divisiones celulares, TD= tiempo de duplicación y PD= producción diaria (día⁻¹), \bar{X} = media.

Tabla 9 .- Parámetros poblacionales de bacterias heterótrofas en el cultivo de *Rhodomonas* sp.

Erlenmeyer					
Día	Concentración cél/ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél/ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.002	0	0	0	0
1	0.127	3.782	5.457	0.183	0.124
2	0.025	-1.625	-2.344	-0.426	---
3	0.4	2.772	4	0.25	0.375
4	1.2	1.098	1.584	0.630	0.800
5	1.4	0.154	0.222	4.496	0.200
\bar{X}		1.030	1.486	0.855	---

Fembach					
Día	Concentración cél/ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél/ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.101	0	0	0	0
1	0.300	1.088	1.570	0.636	0.199
2	0.350	0.154	0.222	4.496	0.05
3	2.300	1.882	2.716	0.368	1.95
4	8.700	1.330	1.919	0.521	6.4
\bar{X}		0.742	1.071	1.003	

Garrafón					
Día	Concentración cél/ml ⁻¹ X10 ⁶	μ (día ⁻¹)	D (día ⁻¹)	TD (día ⁻¹)	PD (día ⁻¹) cél/ml ⁻¹ X10 ⁶
0	0.122	0	0	0	0
1	0.09	-0.298	-0.430	-2.320	---
2	3.45	3.640	5.252	0.190	3.359
3	0.5	-1.931	-2.786	-0.358	---
4	0.05	-2.302	-3.321	-0.301	---
5	0.25	1.609	2.321	0.430	0.2
6	0.1	-0.916	-1.321	-0.756	---
7	0.000001	-11.512	-16.609	-0.060	---
8	0.3	12.611	18.194	0.054	0.299
9	3.05	2.319	3.345	0.298	2.75
10	20.25	1.893	2.731	0.366	17.2
\bar{X}		0.464	0.670	-0.223	

μ = tasa de crecimiento, D= divisiones celulares, TD= tiempo de duplicación y PD= producción diaria (día⁻¹), \bar{X} = media.

En las tablas 10 a la 12 se observan los coeficientes de correlación obtenidos en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), a una significancia de 0.05. A nivel Erlenmeyer (Tabla 10) existió una correlación significativa negativa del nitrato con las bacterias heterótrofas y la concentración celular microalgal; además se encontró una correlación positiva entre las bacterias heterótrofas y la concentración de células microalgales.

A nivel Fernbach (Tabla 11) se obtuvo una correlación negativa entre el NO_2^- y *Nitrobacter*. El NO_3^- se correlacionó de manera negativa con las bacterias heterótrofas y células microalgales; finalmente se encontró una correlación positiva entre las bacterias heterótrofas y concentración de células microalgales.

A nivel Garrafón (Tabla 12) se obtuvieron las siguientes correlaciones: la tasa de crecimiento microalgal se correlacionó positivamente con el NO_3^- . El NO_3^- se correlacionó con el PO_4^{3-} , *Nitrosomonas* y negativamente con la concentración de células microalgales. El PO_4^{3-} se correlacionó con las bacterias heterótrofas, *Vibrio* sp., *Nitrosomonas* y negativamente con la concentración de células microalgales. Las bacterias heterótrofas se correlacionaron positivamente con *Vibrio* sp. y *Nitrosomonas*. Finalmente, *Nitrosomonas* se correlacionó negativamente con la concentración de células microalgales.

En las tablas 13 a la 15 se observan las correlaciones en el cultivo de *Rhodomonas* sp., a una significancia de 0.05. A nivel Erlenmeyer (Tabla 13) se encontraron las siguientes correlaciones: el NO_3^- se correlacionó de manera positiva con el PO_4^{3-} y negativamente con las bacterias heterótrofas, *Nitrobacter* y concentración de células microalgales; el PO_4^{3-} se correlacionó negativamente con las bacterias heterótrofas y *Nitrobacter*, mientras que lo hizo positivamente con la concentración de las células microalgales. Las bacterias heterótrofas se correlacionaron positivamente con *Nitrobacter* y concentración de células

Tabla 10.- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Erlenmeyer.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	-.48	1.00								
NO ₃ ⁻	-.04	.58	1.00							
PO ₄ ³⁻	-.52	.63	.79	1.00						
H	-.04	-.37	-.97	-.75	1.00					
V	-.70	.65	.54	.69	-.46	1.00				
Ns	.41	.55	.43	.04	-.27	.12	1.00			
Nb	-.16	.01	-.68	-.65	.79	-.24	-.05	1.00		
CCM	-.14	-.62	-.95	-.61	.88	-.45	-.68	.54	1.00	
TCB	.51	.28	.44	.21	-.38	-.39	.53	-.30	-.53	1.00

Tabla 11.- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Fernbach.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	-.12	1.00								
NO ₃ ⁻	.13	.21	1.00							
PO ₄ ³⁻	-.47	-.02	.76	1.00						
H	-.10	-.35	-.99	-.73	1.00					
V	-.49	.21	-.85	-.54	.78	1.00				
Ns	-.21	.71	.79	.65	-.87	-.39	1.00			
Nb	.55	-.88	-.23	-.29	.36	-.29	-.76	1.00		
CCM	-.06	-.28	-.99	-.75	.98	.77	-.82	.34	1.00	
TCB	.79	-.23	.17	-.35	-.11	-.42	-.26	.49	-.18	1.00

TCM: Tasa de crecimiento microalgal, NO₂⁻: Nitrito, NO₃⁻: Nitrato, PO₄³⁻: Fosfato, H: Bacterias heterótrofas, V: *Vibrio*, Ns: *Nitrosomonas*, Nb: *Nitrobacter*, CCM: Concentración de células microalgales, TCB: Tasa de crecimiento bacterial. Los valores significativos ($p \leq 0.05$) se indican en rojo.

Tabla 12 .- Análisis de correlación del cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Garrafón.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	.23	1.00								
NO ₃ ⁻	.62	.42	1.00							
PO ₄ ³⁻	.15	.40	.85	1.00						
H	-.18	.34	.60	.89	1.00					
V	-.16	.23	.58	.85	.84	1.00				
Ns	.43	.21	.68	.61	.63	.38	1.00			
Nb	-.26	.23	-.34	-.28	-.25	.01	-.49	1.00		
CCM	-.55	-.27	-.94	-.83	-.56	-.52	-.64	.52	1.00	
TCB	-.13	.00	-.12	-.05	.24	.01	.35	-.13	.21	1.00

Tabla 13 .- Análisis de correlación del cultivo de *Rhodomonas* sp. a nivel Erlenmeyer.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	.46	1.00								
NO ₃ ⁻	-.46	-.39	1.00							
PO ₄ ³⁻	-.58	-.45	.99	1.00						
H	.27	.34	-.97	-.94	1.00					
V	.31	.57	-.56	-.59	.53	1.00				
Ns	.80	.07	.03	-.11	-.18	-.24	1.00			
Nb	.12	.30	-.92	-.87	.97	.63	-.38	1.00		
CCM	.21	.19	-.95	.90	.98	.37	-.17	.94	1.00	
TCB	.23	.66	.08	-.01	-.03	.02	.32	-.16	-.12	1.00

TCM: Tasa de crecimiento microalgal, NO₂⁻: Nitrito, NO₃⁻: Nitrato, PO₄³⁻: Fosfato, H: Bacterias heterótrofas, V: *Vibrio*, Ns: *Nitrosomonas*, Nb: *Nitrobacter*, CCM: Concentración de Células Microalgales, TCB: Tasa de Crecimiento Bacterial. Los valores significativos ($p \leq 0.05$) se indican en rojo.

Tabla 14 .- Análisis de correlación del cultivo de *Rhodomonas* sp. a nivel Fernbach.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	.52	1.00								
NO ₃ ⁻	.02	-.68	1.00							
PO ₄ ³⁻	.23	-.49	.97	1.00						
H	-.38	.57	-.83	-.85	1.00					
V	.15	.19	-.42	-.41	0.3	1.00				
Ns	.16	.17	-.39	-.37	-.01	1.00	1.00			
Nb	.60	.43	-.23	-.10	-.18	.84	.85	1.00		
CCM	-.10	.60	-.99	-.99	.82	.50	.47	.25	1.00	
TCB	.35	.81	-.75	-.63	.50	.71	.69	.76	.75	1.00

Tabla 15 .- Análisis de correlación del cultivo de *Rhodomonas* sp. a nivel Garrafón.

	T.C.M	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	H	V	Ns	Nb	CCM	TCB
TCM	1.00									
NO ₂ ⁻	.44	1.00								
NO ₃ ⁻	.49	.53	1.00							
PO ₄ ³⁻	.56	.65	.85	1.00						
H	-.33	.30	-.22	-.30	1.00					
V	.03	.47	.44	.39	.47	1.00				
Ns	.71	.40	.49	.45	.15	.37	1.00			
Nb	-.06	-.06	-.25	-.13	-.29	-.55	-.37	1.00		
CCM	-.54	-.58	-.98	-.92	.22	-.43	-.54	.23	1.00	
TCB	-.07	.03	-.05	-.02	.14	.29	.12	-.05	.08	1.00

TCM: Tasa de crecimiento microalgal, NO₂: Nitrito, NO₃: Nitrato, PO₄³⁻: Fosfato, H: Bacterias heterótrofas, V: *Vibrio*, Ns: *Nitrosomonas*, Nb: *Nitrobacter*, CCM: Concentración de Células Microalgales, TCB: Tasa de Crecimiento Bacterial. Los valores significativos (p≤ 0.05) se indican en rojo.

microalgales. Finalmente, *Nitrobacter* se correlacionó positivamente con la concentración de células microalgales.

A nivel Fernbach (Tabla 14) se encontraron las siguientes correlaciones: el NO_3^- se correlacionó de manera positiva con el PO_4^{3-} y negativamente con la concentración de células microalgales y el PO_4^{3-} se correlacionó de manera negativa con la concentración de células microalgales.

Los coeficientes de correlación a nivel Garrafón se observan en la tabla 15. La tasa de crecimiento de la microalga se correlacionó con *Nitrosomonas*, el NO_2^- lo hizo positivamente con el PO_4^{3-} , el NO_3^- se correlacionó positivamente con el PO_4^{3-} y en forma negativa con la concentración de células microalgales. Finalmente el fosfato lo hizo negativamente con la concentración de células microalgales.

En la figura 1 se observa la concentración temporal de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y nutrientes en la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) en diferentes niveles de cultivo. A nivel Erlenmeyer (Fig. 1a) las bacterias heterótrofas presentaron un máximo al quinto día de muestreo ($5.7 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$), el cual coincide con un mínimo en nitrato. Las concentraciones mínimas de bacterias heterótrofas se presentaron en los primeros tres días de muestreo, lo cual coincide con el máximo en nitrato.

En el nivel Fernbach (Fig. 1b) existió un crecimiento gradual de las bacterias heterótrofas desde el primer día de muestreo ($0.087 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) al quinto ($5.15 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) coincidiendo con el mínimo en nitrato con el valor aproximado de $80 \mu\text{M}$. La concentración mínima de bacterias heterótrofas ocurrió en el primer día de muestreo, el cual coincidió con un máximo nitrato ($684.75 \mu\text{M}$).

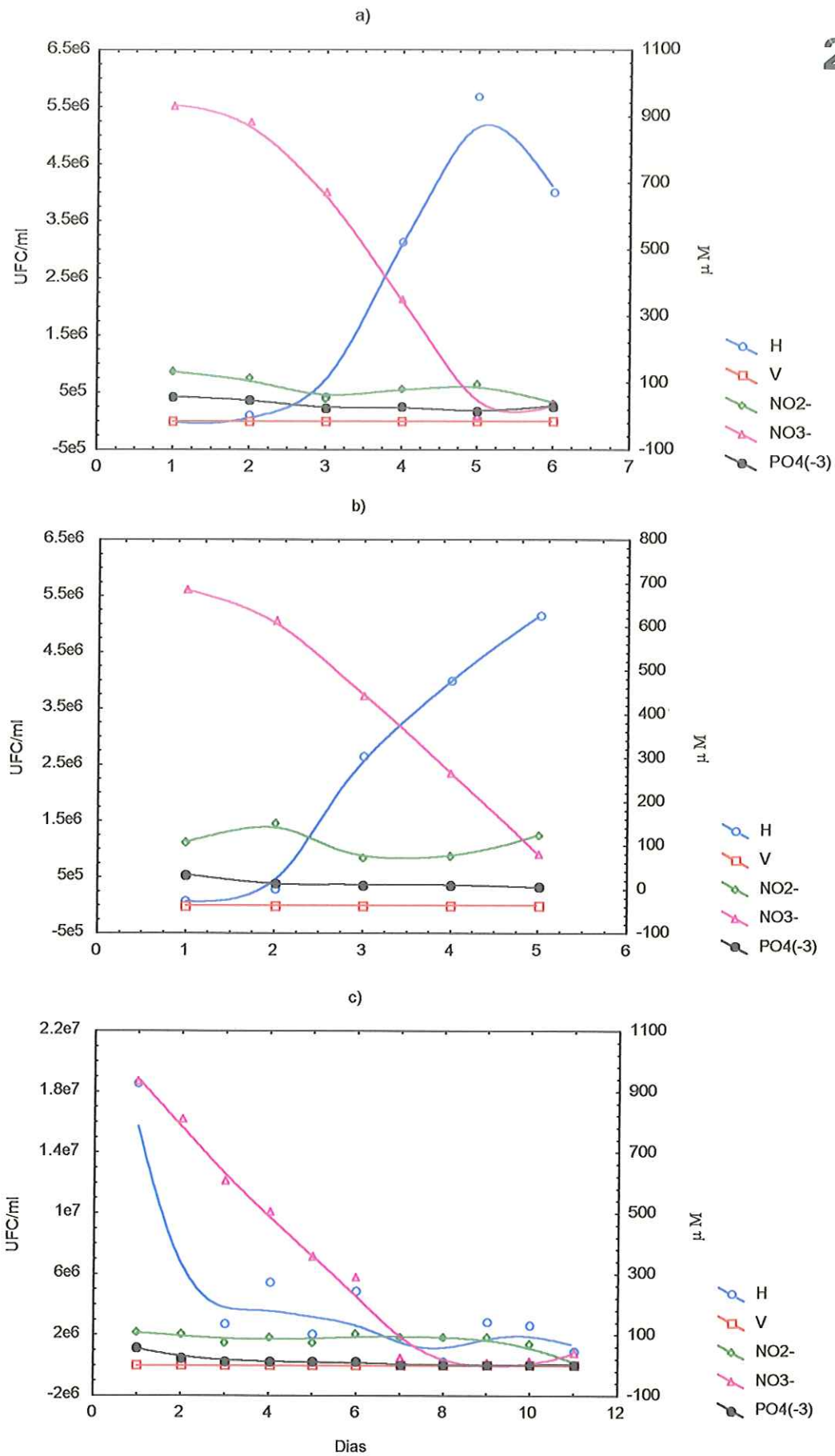


Figura 1.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) y NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁽⁻³⁾ (µM) del cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

En la figura 1c se puede observar que la tendencia de las bacterias heterótrofas es diferente a la de los otros niveles ya que existió una disminución de las mismas desde el primer día de muestreo hasta el onceavo.

la concentración temporal de *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* y nutrientes en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a diferentes niveles se observa en la figura 2. A nivel Erlenmeyer (figura 2a) la concentración máxima de *Nitrosomonas* ($1,258 \text{ NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) se presentó en el cuarto día de muestreo; mientras que el máximo de *Nitrobacter* se presentó hasta el quinto día de ($948 \text{ NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$). La concentración de nitrato fue máxima en el primer día de muestreo ($932.25 \mu\text{M}$) disminuyendo gradualmente hasta sexto día de muestreo.

A nivel Fernbach (figura 2b) se presentó una relación inversa entre *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. En los dos primeros días de muestreo se encontró un máximo en *Nitrobacter* y un mínimo de *Nitrosomonas*; en contraste en el cuarto día de muestreo, se presentó un máximo de *Nitrobacter* y un mínimo de *Nitrosomonas*. El máximo de *Nitrosomonas* en el primer día de muestreo coincidió con el máximo de nitratos ($684.75 \mu\text{M}$), presentándose un decremento gradual de los mismos hasta el último día de muestreo.

A nivel Garrafón las *Nitrosomonas* tuvieron un máximo ($948 \text{ NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) el primer día de muestreo, presentando fluctuaciones hasta el cuarto día de muestreo, a partir del cual disminuyó gradualmente hasta el onceavo día de muestreo. Con respecto a *Nitrobacter*, el máximo de concentración ($948 \text{ NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) ocurrió el sexto día de muestreo coincidiendo con los mínimos de *Nitrosomonas*.

Con respecto al nitrato, su máxima concentración ($934.25 \mu\text{M}$) se presentó el primer día de muestreo, a partir del cual decrece gradualmente hasta el noveno

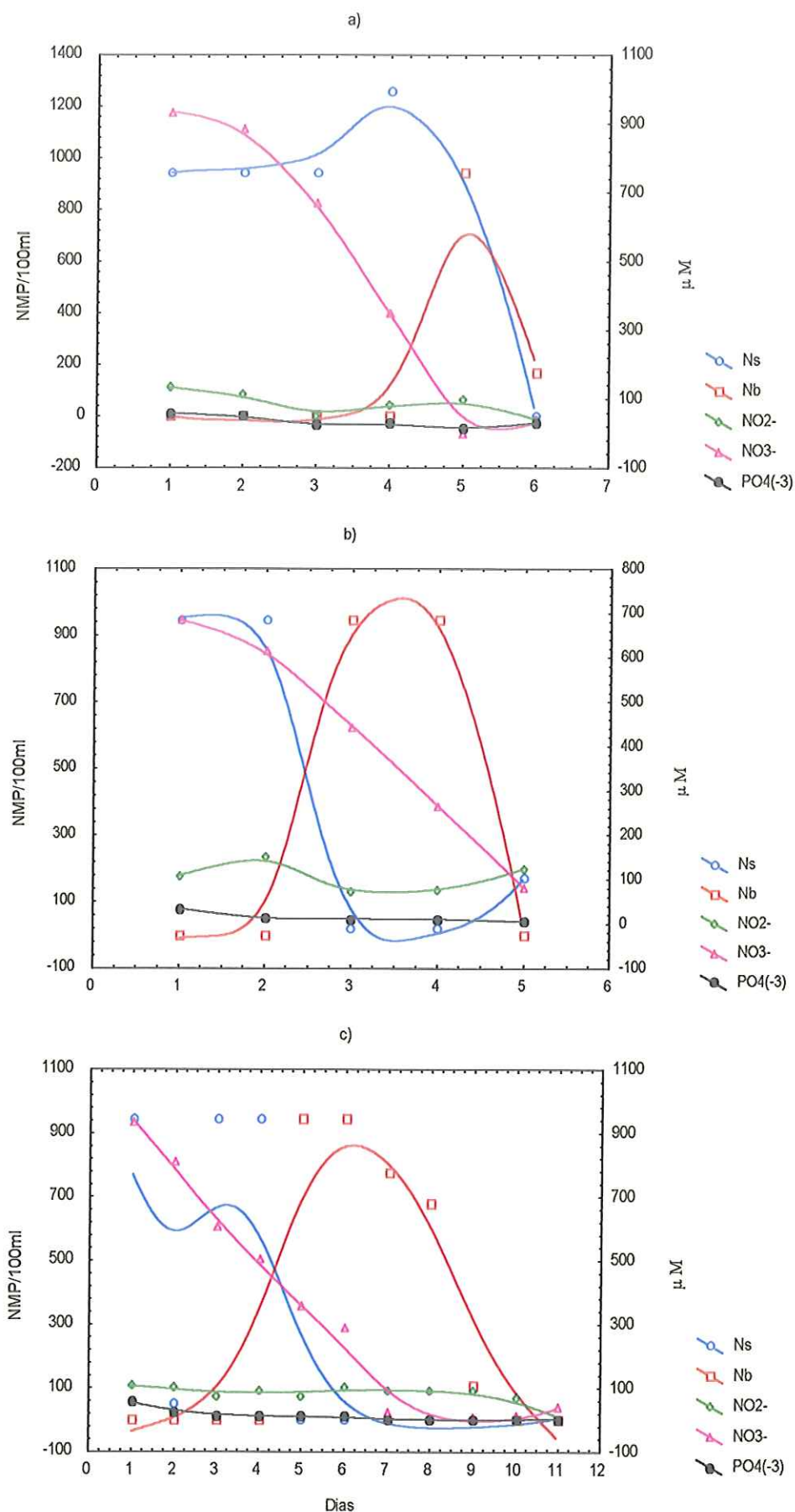


Figura 2.-Concentración de *Nitrosomonas* sp. (Ns), *Nitrobacter* sp. (Nb) (NMP/100ml) y NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁽⁻³⁾ (μM) en cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

día (7.91 μM); presentando un pequeño aumento (39.63 μM) en el onceavo día. Los nitrito y fosfato se mantuvieron casi estables con pequeñas fluctuaciones.

En la figura 3 se observa la concentración temporal de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y células de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso). A nivel Erlenmeyer (figura 3a) y nivel Fernbach (figura 3b) los mínimos de las células microalgales y de bacterias heterótrofas se encontraron en los primeros días de muestreo. En general, a partir del día segundo se dió un incremento significativo en ambas poblaciones, dando como consecuencia a nivel Erlenmeyer un máximo para las bacterias heterótrofas en el quinto día y uno para *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) en el sexto día, mientras que a nivel Fernbach las dos poblaciones tuvieron el máximo en el quinto día.

A nivel Garrafón (figura 3c) la concentración máxima de bacterias heterótrofas se presentó en el primer día de muestreo ($18.55 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$), dando una disminución muy marcada para el segundo y el tercer día, presentando fluctuaciones durante el resto del período de muestreo. Con respecto a *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), presentaron un mínimo en el primer día y el máximo en el noveno ($9 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$), posteriormente se observó que disminuye a ($7 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$) el onceavo día.

En general, las bacterias del género *Vibrio* en los tres niveles (figuras 3a, 3b y 3c) se presentan en bajas concentraciones y se mantienen constantes.

La figura 4 muestra la tasa de crecimiento de bacterias heterótrofas y de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso). En general, la tasa de crecimiento de bacterias es mayor a la de las microalgas a nivel Erlenmeyer y Fernbach (Figuras 4a y 4b); sin embargo, la tasa de crecimiento microalgal, a nivel Garrafón (Figura 4c) fue mayor que la bacteriana en algunos días de muestreo.

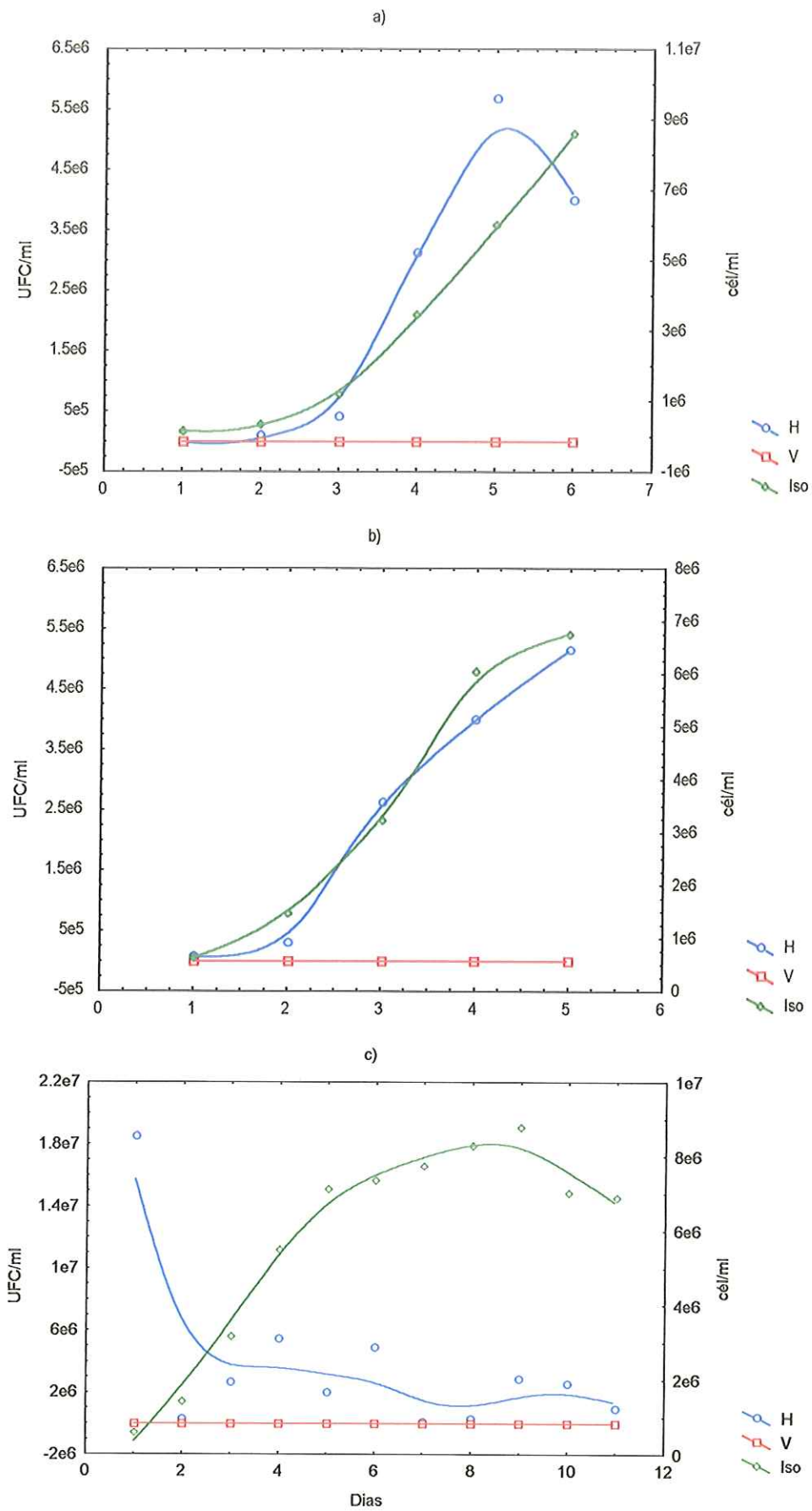
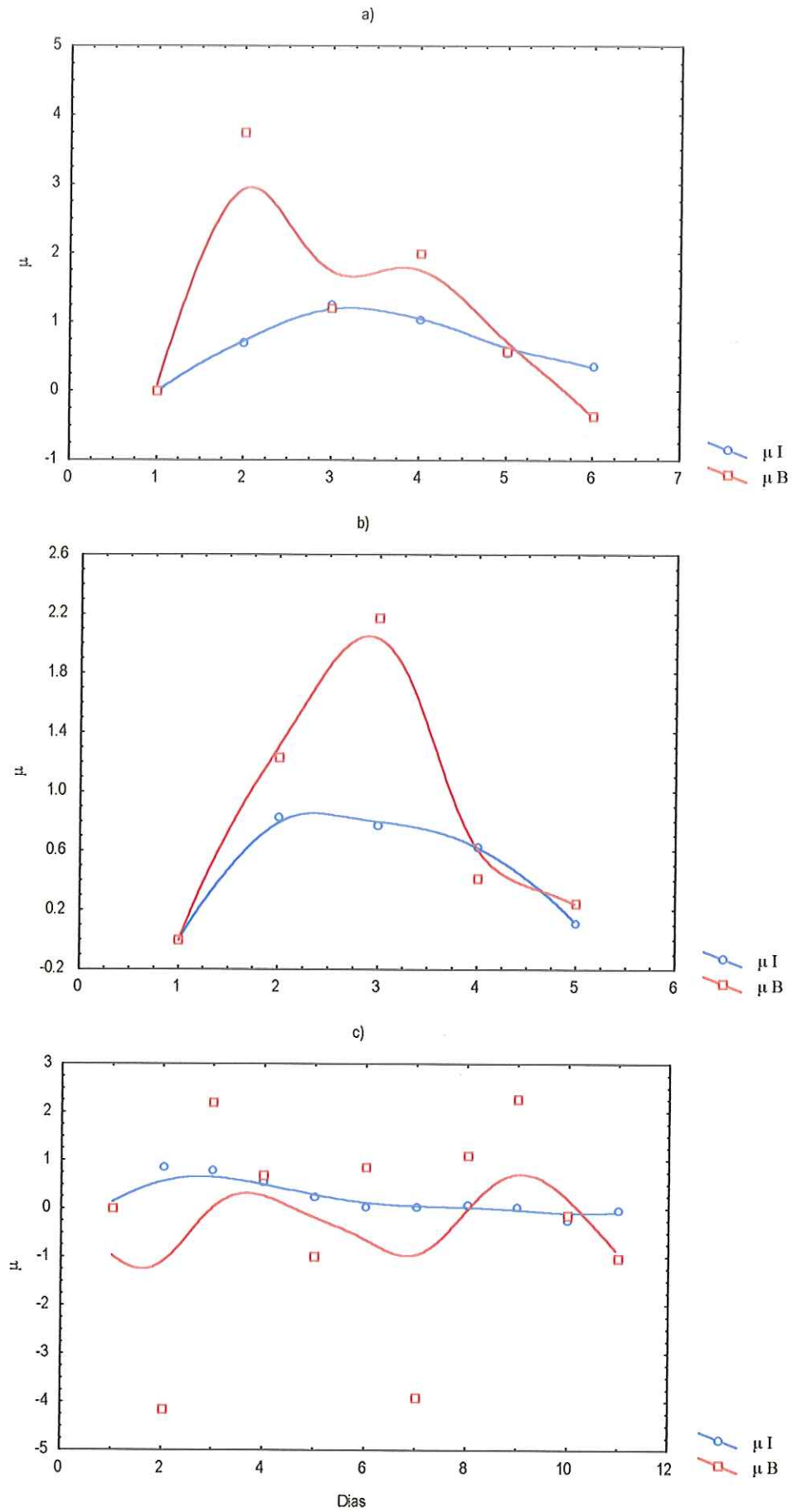


Figura 3.- Concentración de bacterias heterótrofas (H), *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) (cél/ml) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.



En la figura 5 se observa la concentración temporal de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y nutrientes. A nivel Erlenmeyer (Fig. 5a) y en el primer día de muestreo se encontró un mínimo de bacterias heterótrofas de $2,890 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$, a partir del tercer día se incrementó la concentración hasta llegar a un máximo de $1.4 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el sexto día de muestreo. Con relación a los nitratos, la concentración fluctuó desde $1,578 \mu\text{M}$ en el primer día de muestreo a $126 \mu\text{M}$ en el sexto día.

En la figura 5b se pueden observar las concentraciones de bacterias heterótrofas, así como su comportamiento que fue muy similar al del nivel Erlenmeyer, aunque las concentraciones son aproximadamente ocho veces mayores ya que las concentraciones se incrementaron hasta los $8.7 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$. Al igual que las bacterias heterótrofas, el nitrato presentó un comportamiento muy similar al del nivel Erlenmeyer.

En nivel Garrafón (Fig. 5c) se observa que la concentración de nitrato disminuyó de $1,527.75 \mu\text{M}$ en el primer día de muestreo hasta $31.75 \mu\text{M}$ en el séptimo día; sin embargo, se observó un ligero aumento en los 4 días restantes. En general, la concentración de bacterias heterótrofas se mantuvo casi constante con un orden de magnitud de $1 \times 10^5 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta el octavo día, a partir del cual la concentración se incrementó hasta un máximo de $20.25 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el onceavo día.

En general, las bacterias *Vibrio*, nitrito y fosfato se mantienen casi constantes con pocas fluctuaciones.

En la figura 6 se muestra la concentración temporal de *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* y nutrientes en el cultivo de *Rhodomonas* sp. A nivel Erlenmeyer (Figura 6a), la máxima concentración de *Nitrosomonas* ($948 \text{ NMP}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) se presentó en el cuarto día de muestreo, coincidiendo con un mínimo en *Nitrobacter*.

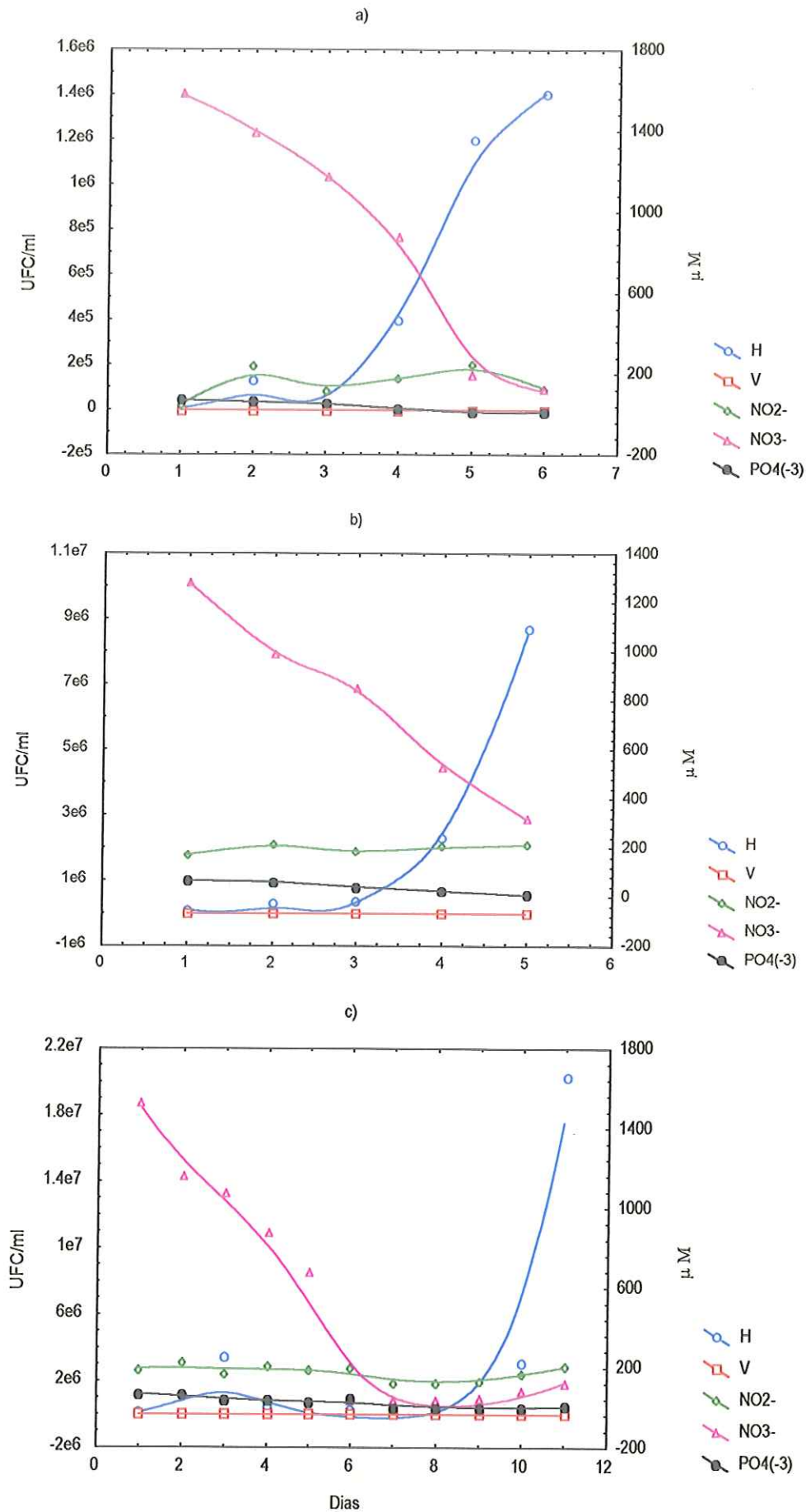


Figura 5.- Concentración de bacterias heterótrofas (H) , *Vibrio* sp. (V) (UFC/ml) y NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁻³ (µM) del cultivo de *Rhodomonas* sp. en a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

Es de hacer notar que cuando *Nitrosomonas* empieza a incrementarse las concentraciones de nitrato empiezan a disminuir.

En el nivel Fernbach (Figura 6b) el máximo de *Nitrosomonas* fue de 173 NMP·100ml⁻¹ en el cuarto día de muestreo, sin embargo disminuye rápidamente de tal manera que en el quinto día no hay presencia de estas bacterias. La concentración de *Nitrobacter* se mantuvo en bajas concentraciones durante el periodo de muestreo presentando pequeñas fluctuaciones. La concentración de nitrato disminuye gradualmente llegando a un mínimo el último día de muestreo mientras que nitrito y el fosfato casi no presentaron variaciones.

En el nivel Garrafón (Figura 6c) se observan las concentraciones de *Nitrosomonas* las cuales son menores que las encontradas en nivel Erlenmeyer y Fernbach y por tanto que las de *Nitrobacter* cuyo máximo (1,664 NMP·100ml⁻¹) ocurrió en el quinto día de muestreo. El resto de los parámetros se comportan de manera similar a los niveles Erlenmeyer y Fernbach.

En la figura 7 se observa la concentración temporal de bacterias heterótrofas, *Vibrio* y células de *Rhodomonas* sp. A nivel Erlenmeyer (Figura 7a) y nivel Fernbach (Figura 7b), las bacterias heterotróficas y las microalgales tuvieron el mismo comportamiento con concentraciones menores o mínimas en los primeros días de muestreo y concentraciones máximas en los últimos días.

A nivel Garrafón (Figura 7c), las concentraciones de células microalgales fueron consistentemente mayores que las concentraciones bacterianas. Las bacterianas se incrementaron substancialmente a partir del noveno día para llegar a una concentración máxima de 20.25X10⁶ UFC·ml⁻¹

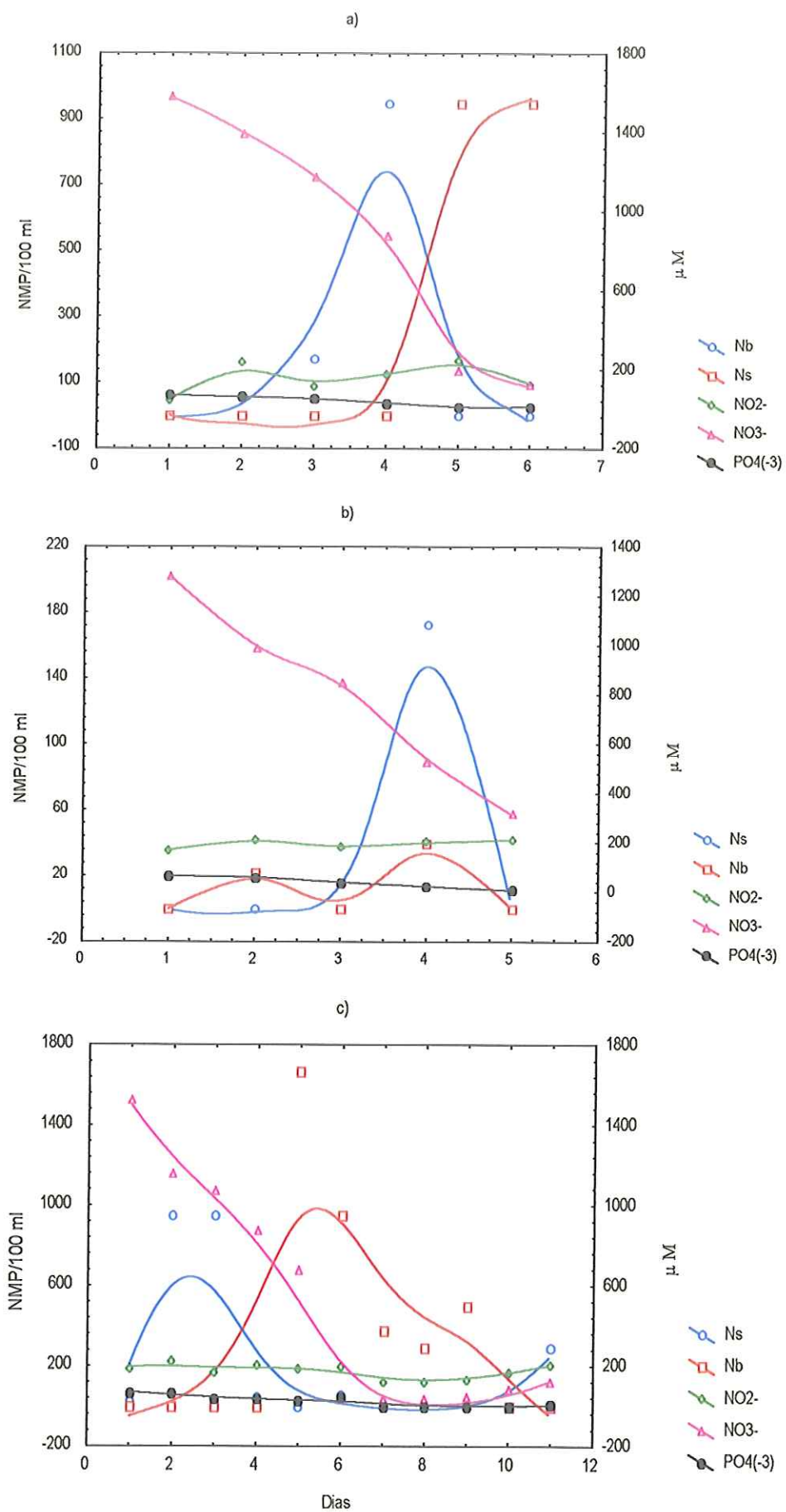


Figura 6.- Concentración de *Nitrosomonas* sp. (Ns), *Nitrobacter* sp. (Nb) (NMP/100 ml) y NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} (μM) en el cultivo *Rhodomonas* sp. en: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

En general, las bacterias del género *Vibrio* en los tres niveles (Figuras 7a,7b y 7c) se presentan en bajas concentraciones y se mantienen constantes.

La figura 8 muestra la tasa de crecimiento de bacterias heterótrofas y de *Rhodomonas* sp. En general, la tasa de crecimiento de bacterias fue mayor a la de las microalgas a nivel Erlenmeyer y Fernbach (Figuras 8a y 8b) con excepción del día tres, donde las tasas de crecimiento microalgal fue mayor que la bacterial. Con respecto al nivel Garrafón (Figura 8c) la tasa de crecimiento microalgal fue casi constante, mientras que la bacteriana tuvo mayores fluctuaciones.

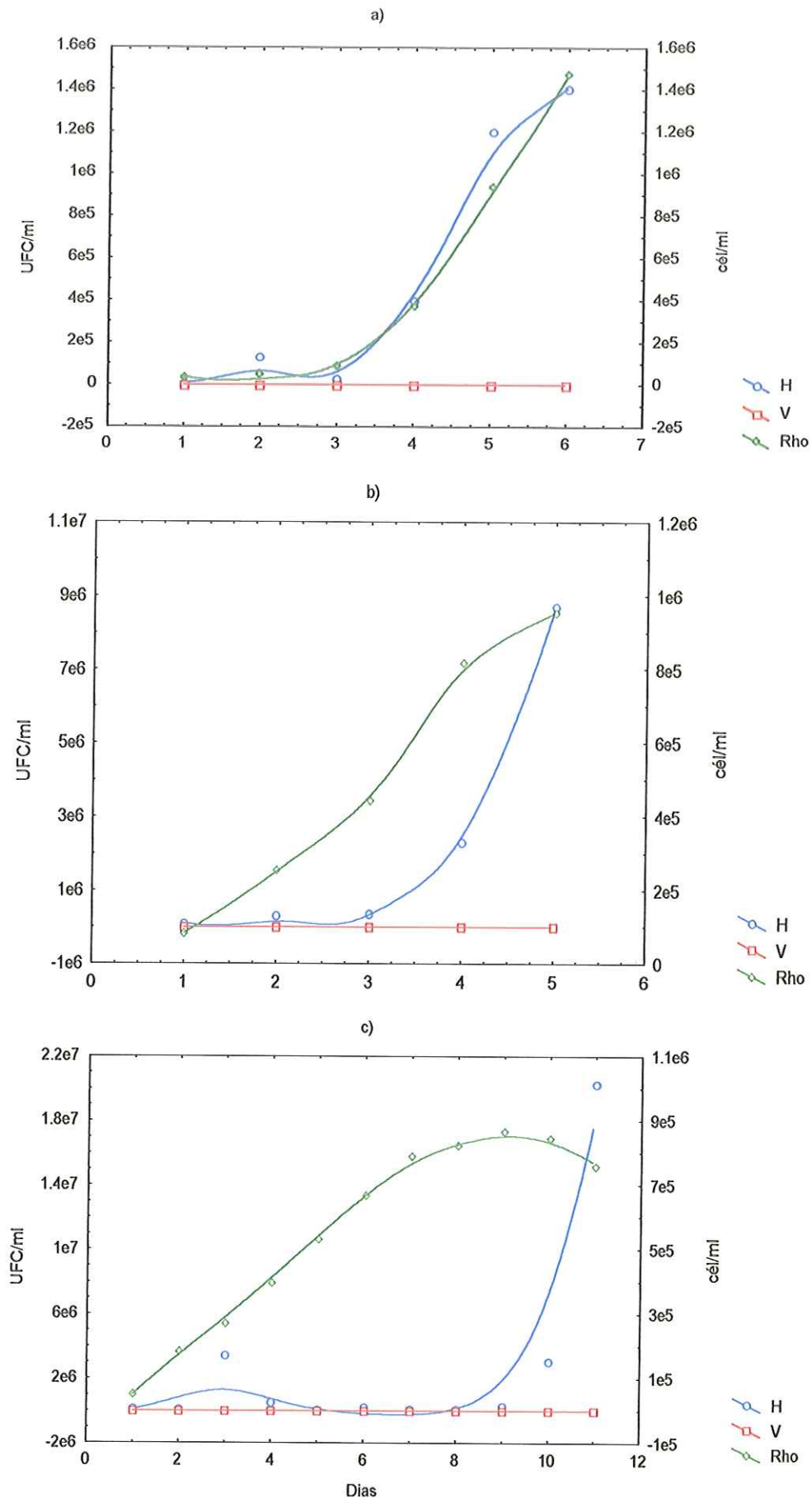


Figura 7.- Concentración de bacterias heterótrofas (H) *Vibrio* sp. (V) (UFCml⁻¹) en *Rhodomonas* sp. (cél/ml) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

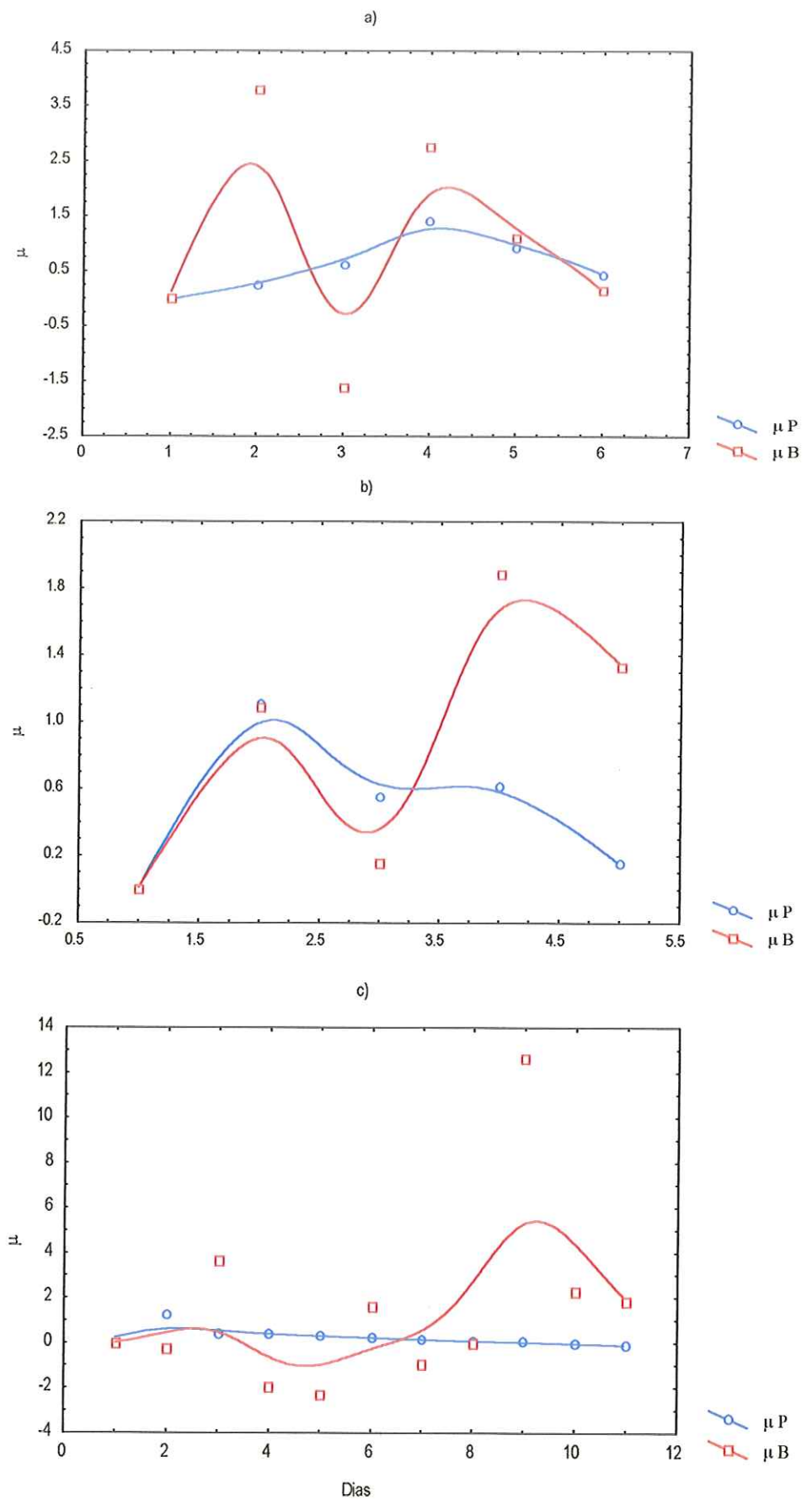


Figura 8.- Tasa de crecimiento de bacterias heterótrofas (μ_B) y de *Rhodomonas* sp. (μ_R) a nivel: a) Erlenmeyer, b) Fernbach y c) Garrafón.

4. DISCUSIÓN

La concentración de bacterias presentes en los cultivos de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp., tienen su origen en las mismas microalgas, ya que, a pesar de que su inoculación en el medio f/2 se realiza de manera aséptica, es prácticamente imposible tener un cultivo axénico; por tanto siempre se encontrarán bacterias asociadas a los sistemas de cultivos de las microalgas. González-Del Valle (1997) encontró que las bacterias solas son incapaces de crecer en agua de mar con medio f/2 de Guillard, por tanto, supuso que debe de existir algún tipo de dependencia de las bacterias con las microalgas. Por otra parte, Rico-Mora (1995) mencionó que los cultivos de microalgas, sobre todo en los masivos, es difícil mantener la axenicidad debido a la presencia de altas concentraciones de nutrientes y de productos extracelulares algales, existiendo las condiciones apropiadas para el establecimiento de una población y más frecuentemente de una comunidad de bacterias heterotróficas.

La relación fitoplancton-bacterias heterótrofas encontrada en ambas especies microalgales a nivel Erlenmeyer y Fernbach, sugiere que existe una interacción y dependencia en ambas poblaciones debido, posiblemente, a la exudación de materia orgánica disuelta por las microalgas y a la mineralización de bacterias heterótrofas. Entre los compuestos orgánicos disueltos liberados por el fitoplancton se encuentran las vitaminas, carbohidratos, agentes quelantes, aminoácidos, ácidos, lípidos, entre otros (Santiago-Serrano, 1997). El estudio realizado por Ching-Piao y Liang-Ping (2001) en *Isochrysis* sp. encontraron que tiene la habilidad de producir aminoácidos poliinsaturados (DHA). Por otra parte, Haines y Guillard (1974), así como González-Del Valle (1997) indicaron que los requerimientos de vitaminas B₁₂ y agentes quelantes de varias diatomeas en cultivo pueden ser cubiertos por bacterias marinas heterotróficas.

El paralelismo entre las poblaciones de microalgas y de bacterias se puso de manifiesto por la alta correlación obtenida. Sin embargo, la relación entre ambas fue mayor en la fase de crecimiento exponencial.

El incremento de bacterias en los primeros días de muestreo en los cultivos de microalgas a nivel Erlenmeyer y Fernbach se debe, posiblemente, a la utilización de nitrógeno inorgánico proporcionado en el medio f/2. Se conoce ampliamente que las bacterias heterótrofas asimilan preferentemente nitrógeno orgánico, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, puede cambiar su ruta metabólica para asimilar nitrógeno inorgánico y competir con la microalga por los nutrientes aunque lo asimila en más bajas concentraciones, posiblemente porque poseen sistemas de transporte más eficientes para asimilar nutrientes. Kirchman (2000) menciona que las bacterias heterótrofas son capaces de asimilar N y P inorgánico en forma de NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} y liberar NH_4^+ ; esto se debe a que las bacterias requieren de la asimilación o la regeneración de los elementos para mantener su composición elemental en estado constante.

La máxima concentración de bacterias heterótrofas (18.55×10^6 UFC.ml⁻¹) en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) encontradas a nivel Garrafón en el primer día de muestreo, se debe su escalamiento ya que se inoculó el Garrafón con una concentración alta de bacterias provenientes de la fase estacionaria del nivel Fernbach; sin embargo, estas altas concentraciones de bacterias no se pudieron sostener porque se encontraban las células microalgales en menor proporción y en su fase de retardo; por tanto no se encontraban los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Posterior a su decaimiento la población microbiana ya no pudo alcanzar la fase exponencial porque posiblemente existió un menor porcentaje de células fisiológicamente activas para lograr un crecimiento óptimo; sin embargo, presentó variabilidad con máximos y mínimos durante el cultivo, esto se debe probablemente a que en

este nivel de cultivo se suministra aireación la cual resuspende material orgánico con bacterias. Jiménez-Mercado (1991) en un cultivo masivo de *Isochrysis* var. *galbana* aff. *thaitiana* green (CLONE T-Iso) encontró en los últimos día de su experimento una alta sedimentación derivada de una excesiva precipitación de células muertas.

El comportamiento de *Rhodomonas* sp. en los niveles Erlenmeyer y Fernbach fue muy similar al de *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso), sin embargo, a nivel Garrafón, las bacterias heterótrofas mostraron una fase de retardo muy larga, debido a que se inoculó del nivel Fernbach el cual tenía bajas concentraciones bacterianas (1×10^6 UFC.ml⁻¹) y al hecho de que las bacterias en esta fase de crecimiento se estaban preparando fisiológicamente para su crecimiento. El máximo de bacterias se presentó el último día de muestreo cuando las células microalgales estaban en la fase de muerte y por tanto existe una mayor cantidad de material detrital el cual es propicio para el desarrollo bacteriano.

En *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. se presentaron bajas concentraciones de bacterias del género *Vibrio*, manteniéndose casi constantes. Estas provienen del agua de mar utilizada en los cultivos, ya que a pesar de pasarse a través de filtros kunno de 1 y 0.65 micras e irradiada con UV algunas sobreviven. Montoya-Rodríguez (1991) y Santiago-Serrano (1996) realizaron estudios en el sistema de abastecimiento de agua de mar del Laboratorio de Acuicultura del IIO, encontrando, consistentemente, bacterias del género *Vibrio* sp. por tanto, concluyeron que los sistemas de filtración y radiación ultravioleta empleados reducen la poblaciones bacterianas pero no la eliminan totalmente. Es de destacar que las bacterias *Vibrio* sp. detectadas en los cultivos de microalgas no ocasionaron problemas de patogenicidad en las poblaciones microalgales.

En los tres niveles de los cultivos de *Isocrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp. se encontró una clara sucesión de especies bacterianas, la primera que tuvo un incremento significativo fue *Nitrosomonas* sp. seguida por *Nitrobacter* sp.; por tanto, se puede decir que siguieron el patrón de comportamiento típico de un sistema en equilibrio, ya que la oxidación del amonio a nitrato requiere de acciones combinadas y secuenciales de ambas bacterias nitrificantes. Es de destacar que *Nitrosomonas* sp. oxida el amonio a nitrito y *Nitrobacter* sp. oxida el nitrito a nitrato; no obstante, se sabe que las bacterias heterótrofas generan amonio a partir del nitrógeno orgánico disuelto, por lo que desempeña un papel relevante en la mineralización de la materia orgánica en el mar (Kirchman, 2000).

Estudios realizados por Sánchez-Saavedra (1989) y Gieseke *et al.*, (2001) en sistemas de microalgas y biopelículas, encontraron que las bacterias nitrificantes regeneran nutrientes de manera secuencial, presentándose, primeramente *Nitrosomonas* sp. y posteriormente *Nitrobacter* sp.

Como la oxidación del amonio por las bacterias nitrificantes produce nitrato, era de esperarse que se encontraran concentraciones más elevadas de nitrato en los últimos días de muestreo; sin embargo, las concentraciones fueron bajas debido posiblemente a su asimilación por las microalgas y bacterias heterótrofas, no obstante y a pesar de este consumo se logró observar a nivel Erlenmeyer y Garrafón, en ambas especies de microalgas un ligero incremento de nitrato en los últimos días de muestreo. Se conoce que las microalgas consumen nitrato y mediante el sistema enzimático nitrato-reductasa, lo reducen a nitrito hasta su transformación total a amonio, el cual es transportado hacia el interior de la célula por difusión activa (Conn *et al.*, 1996) siendo la forma preferencial de consumo por las microalgas.

Trabajos sobre consumo de amonio y nitrato realizados por Thomson *et al.*, (1989) y Dortch *et al.*, (1991) demuestran que cuando ambas fuentes de nitrógeno están presentes en el mismo medio de cultivo, el amonio es preferentemente consumido debido al menor costo energético que implica su consumo, mientras que Camiro-Vargas (2001) y Lafarga-De la Cruz (1997) en sus investigaciones con *Rhodomonas* sp., encontraron un consumo de nitrato hasta el último día de cultivo, aún cuando la concentración de amonio se incrementó o se mantuvo por arriba de 1 μ M.

Debido a la complejidad de las reacciones químicas y por lo tanto de transformaciones que llevan a cabo las poblaciones bacterianas y microalgales en los sistemas de cultivo (asimilación y remineralización), los procesos relacionados con el ciclo de nitrógeno, en particular, la generación de nitrito y nitrato no se detectan. Por tanto, si se desea encontrar la relación bacterias nitrificantes nutrientes se deben de diseñar experimentos que contemplen únicamente a las bacterias.

Las tasas de crecimiento y divisiones celulares por día de bacterias heterótrofas y de microalgas en ambas especies, disminuyeron conforme evolucionaron los cultivos, teniendo una relación directa con la remoción de nitrato; por ejemplo *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) removió a nivel Erlenmeyer el 100% del nitrato, 88% a nivel Fernbach y 61% a nivel Garrafón; el mismo comportamiento se encontró en *Rhodomonas* sp. en donde el consumo a nivel Erlenmeyer fue del 87%, 75% en Fernbach y 55% en Garrafón. Por tanto, se puede decir que la tasa de crecimiento de ambas poblaciones en las diferentes especies de microalgas se relacionó con las concentraciones de nitrato utilizado en cada nivel para su crecimiento. Estos cálculos se hicieron de manera sistemática (5to día de muestreo) para poder comparar entre los niveles.

Se conoce que las tasas de crecimiento y tiempo de duplicación de las bacterias y microalgas en cultivo dependen de la velocidad de la captación de los nutrientes, la cual está relacionada con la constante de transporte específica. Entre los microorganismos puede ocurrir además una interacción competitiva por los nutrientes disponibles, sin embargo en ocasiones en lugar de competir por los nutrientes algunos microorganismos cooperan para llevar a cabo una transformación en particular que ningún organismo podría realizar solo. Estas relaciones requieren por lo general de dos o más organismos que participen en el proceso y que compartan el mismo microambiente, debido a que el producto del metabolismo de uno de los organismos, puede ser fácilmente accesible para el segundo (Brock y Madigan, 1993)

Otro factor que pudo contribuir a obtener mayores tasas de crecimiento microalgales a nivel Erlenmeyer es el diseño del recipiente, ya que este favorece a la captación de la luz, por tanto la microalga en este nivel tiene una mayor oportunidad de ser irradiada en comparación del nivel Garrafón en donde existe un autosombreado. Camiro-Vargas (2001) en su estudio con ambas especies microalgales menciona que a nivel Garrafón existe un efecto de autosombreado debido al aumento de la densidad celular, la cual ocasiona una disminución de la disponibilidad de luz en general por las microalgas; sólo las microalgas que se encuentran en contacto directo con la luz fotosintetizan. Por otra parte, Lafarga-De la Cruz (1997) menciona que cambios en la irradiancia está acompañada de cambios en la tasa de crecimiento y composición bioquímica del fitoplancton en cultivo.

Las mayores tasas de crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-Iso) a nivel Erlenmeyer se debe a que su razón superficie:volúmen (0.88) es mayor que la de *Rhodomonas* sp. (0.63), por tanto, posee un intercambio más eficiente con su entorno. No obstante este comportamiento, no se detectó a nivel Fernbach y Garrafón.

La tasa de crecimiento más alta obtenidas por las bacterias heterótrofas, se debe a que son organismos más pequeños que las microalgas y por tanto tienen más ventajas fisiológicas, ya que la velocidad con que los nutrientes y los productos de deshecho entran o salen de la célula, generalmente está en proporción inversa al tamaño de la misma; las velocidades de transporte, a su vez, afectan a las velocidades metabólicas de un organismo. Así, cuanto más pequeña es la célula más rápida es su velocidad potencial de crecimiento (Brock y Madigan, 1993). González-Del Valle (1997) en su investigación sobre la relación fitoplancton-bacterias encontró en general mayores tasas de crecimiento bacterial que microalgales.

El comportamiento bimodal de la tasa de crecimiento bacteriano en el cultivo de *Rhodomonas* sp. a nivel Erlenmeyer y Fernbach se debe a que se encontraron diferencias mínimas de bacterias entre el 2do y 3er día de muestreo, ya que se encontraban en la fase de retardo. (González-Del Valle, 1997) en su estudio con distintas especies microalgales encontró que durante la fase de crecimiento de retardo o estacionaria, la pendiente de la relación población bacteriana - población algal disminuye e incluso es negativa, debido a la naturaleza de las distintas poblaciones bacterianas asociadas a cada especie algal, o por la presencia de metabolitos algales que afectan negativamente al crecimiento bacteriano.

La diferencia que existe entre los niveles de cultivo posiblemente se deben a los cambios en el volumen total, geometría del recipiente, tipo de aireación, así como calidad y cantidad del inóculo, es por eso que los niveles de Erlenmeyer y Fernbach presentan similitud debido a las condiciones del cultivo. Valenzuela-Espinoza (1997) y Lafarga-De la Cruz (2000) encontraron también tasas de crecimiento mayores en Erlenmeyer para *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) y *Rhodomonas* sp., respectivamente.

Cabe destacar que entre los cultivos hubo un mayor número de células tanto bacteriana como microalgal en *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso) que en *Rhodomonas* sp. debido a que son especies muy diferentes, tienen tamaños y metabolismos distintos y por lo tanto se reitera la relación que existe entre bacteria-fitoplacton: a mayor número de microalgas, mayor número de bacterias heterótrofas.

5. CONCLUSIONES

- 1.- En ambos cultivos se encontró una relación directa microalga-bacteria, lo que sugiere que existe una interacción y dependencia en ambas poblaciones debido a la exudación de materia orgánica disuelta por las microalgas y a la remineralización de bacterias heterótrofas.
- 2.- Las tasas de crecimiento y divisiones celulares por día de bacterias y fitoplancton decrecieron gradualmente de Erlenmeyer a Garrafón, teniendo una relación directa con la remoción de nitratos.
- 3.- Las tasas de crecimiento bacterianas fueron mayores a las fitoplanctónicas a nivel Erlenmeyer y Fernbach en ambas especies debido a su tamaño más pequeño, lo que les confiere ventajas fisiológicas.
- 4.- Se encontró una sucesión de especies de bacterias nitrificantes en ambas especies de microalgas. *Nitrosomonas* oxidó el amonio a nitrito y *Nitrobacter* oxidó el nitrito a nitrato

6. LITERATURA CITADA

Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L:A., and Thingstad, F. 1983. The ecological role of Water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10,257-263.

Becker, E. W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. En: Richmond, A. (ed). *Handbook of Microalgal Mass Cultures*. C.R.C Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.

Brock, T. D. y Madigan, M. 1993. *Microbiología*. Sexta edición. Hall Hispanoamericana S.A. México-Englewood Cliffs, México, D. F.

Camiro-Vargas T. K. 2001. Cuantificación potenciométrica de carbono inorgánico total en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (CLONE T-Iso). Universidad Autónoma de Baja California, F. C. M. Tesis de licenciatura; Ensenada B. C.; México. 61 pp.

Castellví, J., 1972. Bacteriología marina, en "Ecología marina", Cap.7, ed. Fundación Lasalle. P. 201-229.

Ching-Piao L. and Liang-Ping L.(2001) Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot. Bull. Acad.Sin.*(2001) 42:207-214.

Dortch *et al.* 1991. Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*: effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. *Marine Biology*, 110: 183-193.

Douillet P. and Langdon C. J. 1993. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *Biol. Bull.* **184**: 36-51.

Droop, M.R. 1975. The nutrient status of algal cell in batch culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 55: 541-555.

Gieseke Armin, Purkhold U., Wagner M., Amann. R and Schramm A. 2001. Community Structure and Activity Dynamics of Nitrifying Bacteria in Phosphate-Removing Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2001, p. 1351-1362.

González-Del Valle M. A. 1997. Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. Universidad de Sevilla, Facultad de Biología, Tesis doctoral; Sevilla, España.

González-Medina S. 1991. Determinación de la tasa de dilución óptima y del contenido proteico de tres especies de microalgas cultivadas en un sistema semicontinuo. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada B. C; México. 128 Pp.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. 29-60. Culture of Marine Invertebrates Animals. Smith, W. L. and M. H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338.

Haines, K.C. and R.R.L. Guillard. 1974. Growth of vitamin B₁₂ requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B₁₂ producing marine bacteria. J. Phycol. 10:245-252.

Iturriaga, R. and A. Zsolnay. 1981. Transformation of some dissolved organic compounds by a natural heterotrophic population. Mar. Biol. 62: 125-129.

Hopkinson, Jr., C.S. and Vallino, J.J. 1994. Toward the development of generally applicable models of the microbial loop in aquatic ecosystems. Microb. Ecol., 28,321-326.

Jiménez-Mercado A. 1991. Evaluación de mezclas de fertilizantes agrícolas inorgánicos para el cultivo masivo de *Isochrysis* var *galbana* aff. *thaitiana* Green, (clon T-Iso). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura. Ensenada B. C; México. 105 Pp

Kirchman D. L. 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. Microbial Ecology of the Oceans. Wiley-Liss (Eds). New York. 11

Kogure, K., U. Simidu y N. Taga. 1982. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. J. exp. Mar. Biol. Ecol. 56: 197-204.

Lafarga-De la Cruz F. 1997. Relación entre el consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura. Ensenada B. C; México. 56 Pp.

Lafarga-De la Cruz F. 2000. Interacción entre la luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Maestría. Ensenada B. C; México. 128 Pp.

Laing, I., S.D. Utting y R.W.S. Kiloda 1987. Interactive effect of diet and temperature on the growth of juvenile clams. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 13: 23-38.

Larsson, U. and A. Hagstrom. 1979. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.* 52:199-206.

Lizárraga-Partida, L. 1987. Aspectos bacteriológicos en granjas de acuicultura. Informe de actividades. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Año sabático 1986-1987.

Lodeiros-Seijo C. J. 1988. Análisis cuantitativo y cualitativo de la flora bacteriana en "hatchery" de *Ostrea edulis* y su posible relación con la patogenidad a nivel larvario. *Acta científica Venezolana* 39:249-256.

Moller, J.L. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 39-48.

Montoya-Rodríguez L. 1992. Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura en Ensenada B. C. mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Nalewajko, C., K. Lee and P. Fay. 1980. Significance of algal extracellular products to bacteria in lakes and in cultures. *Microb. Ecol.* 6: 199-207.

Okauchi, M., 1991. The status of phytoplankton production as food organisms in Japan. In W. Fulks & K. L. Main (eds), *Proceedings of a U.S. Asia Workshop. Rotifer and Microalgae Culture Systems*. The Oceanic Institute. Honolulu: 247-256.

Ralph, L.A. 1967. *Physiology and Biochemistry of algae*. 3^{er} ed. Academic Press. New York and London. 929 pp.

Rico-Mora R. 1995. Control biológico de la contaminación por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, División Oceanología; Departamento de Acuicultura. Tesis Doctoral. Ensenada Baja California, México.

Riquelme, C. E., K. Fukami and Y. Ishida. 1989. Growth response of bacteria to extracellular products of bloom algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 349-355.

Sánchez-Saavedra M. P. 1989. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, División Oceanología; Ecología Marina. Tesis de Maestría. Ensenada B. C. México.

Santiago-Serrano M. E. 1996. Calidad bacteriológica en un sistema de cultivo durante los estadios larvario y postlarvario del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*). Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de licenciatura. Ensenada, Baja California; México.

Suminto & Kazutsugu Hirayama. 1997. Application of growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia* 358: 223-230

Thomson et al., 1989. Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.*, 34(6): 1014-1024.

U. S. Geological Survey. 1997. Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples; Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey, Book 5 Chapter A4.

Valenzuela-Espinoza, E. 1988. Producción masiva de *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH. (*Prasinophyceae*) bajo diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones controladas. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura 44 pp.

Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (Clone T-Iso). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Licenciatura. 51pp.

Wheaton, F. W. 1977. Acuicultura: diseño y construcción de sistemas. AGT editor. México. 704 pp.

Zobell, C.E., 1961, Low Temper. Microbiol. Sympos, Camden N. J., p 107-132.

ANEXO

Isochrysis aff. galbana (CLONE T-Iso)

Día	cell/ml	Heterótrofos	Vibrio	Nitrosomonas	Nitrobacter	NO3	NO2	NH4	PO4
1	172,700	3,000	80	948	0	932.25	134	542.5	58.75
2	347,500	127,000	0	948	0	883.75	115	400	51.25
3	1,209,100	425,000	0	948	0	673	54.5	108.75	24
4	3,443,300	3,150,000	0	1,258	0	349	82.5	273	29.5
5	6,016,600	5,700,000	0	948	948	0	96.75	290.75	13
6a	8,616,600	4,000,000	0	0	173	39.25	41.75	104.25	31.5
6b	647,500	87,000	0	948	0	684.75	109	175	35
7	1,486,600	300,000	0	948	0	614.5	153	545	12.5
8	3,226,600	2,650,000	0	20	948	444.25	72.5	201.75	12
9	6,033,300	4,000,000	600	22	948	264.5	78	102.5	11
10a	6,753,300	5,150,000	3,000	173	0	80.75	125.5	87.25	5.25
10b	603,300	18,550,000	200	948	0	934.25	107	141.25	60
11	1,437,500	300,000	10	51	0	811	104	175	22.5
12	3,180,000	2,700,000	10	948	0	607.5	76.5	164.25	13.5
13	5,503,300	5,500,000	0	948	0	506.25	91.5	124.5	13.5
14	7,133,300	2,050,000	100	0	948	356.25	76.25	109	10.5
15	7,356,600	4,950,000	20	0	948	289.75	102.75	121	13
16	7,746,600	100,000	0	0	780	24.25	91.98	43.06	1.37
17	8,306,600	300,000	0	0	679	9.84	91.93	45.39	1.78
18	8,793,300	2,900,000	10	0	109	7.91	91.28	43.17	1.25
19	7,033,300	2,600,000	0	0	0	10.49	70.7	46	2.06
20	6,900,000	950,000	10	0	0	39.63	4.25	44.2	2.94

ANEXO

Rhodomonas sp.

Día	cell/ml	Heterótrofas	Vibrio	Nitrosomonas	Nitrobacter	NO3	NO2	NH4	PO4
1	37,000	2,890	0	0	0	1,578	42.5	637	68.25
2	48,300	127,000	0	0	0	1,390	234	656.25	59.5
3	90,800	25,000	0	173	0	1,173.75	115	170	52.5
4	371,600	400,000	0	948	0	872.5	175.5	292	30
5	940,000	1,200,000	10	0	948	195	247.5	275.25	7.5
6a	1,472,500	1,400,000	0	0	948	126	126.75	218.25	11.25
6b	84,100	101,000	0	0	0	1,279	171.21	283.5	64.75
7	254,160	300,000	0	0	22	985.75	213	287	61.25
8	443,330	350,000	0	0	0	849.5	183	235	40
9	818,830	2,300,000	240	173	40	530	202	207	23
10a	953,330	8,700,000	10	0	0	315.75	213	152.25	7.5
10b	51,600	122,000	70	22	0	1,527.75	189	182	68.25
11	184,100	90,500	50	948	0	1,162	220.5	311.5	61.25
12	270,800	3,450,000	30	948	0	1,076.75	172	170	40
13	396,660	500,000	0	44	0	873	202	230	37.5
14	531,600	50,000	0	0	1664	674.25	189.75	175	22
15	668,300	250,000	10	59	948	37.5	196.5	410	44
16	790,000	100,000	0	0	380	31.83	117.31	42.68	1.44
17	822,500	100,000	0	0	286	35.75	124.22	44.63	1.25
18	866,600	300,000	20	0	502	41.21	131.65	46.41	1.94
19	846,600	3,050,000	40	0	0	79.53	171.68	46.56	1.9
20	759,100	20,250,000	60	286	0	116.45	207.12	43.96	3.97