



Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Departamento de Desarrollo de Tecnologías



**Estudio de la interacción de *Tetraselmis* spp. y las bacterias
asociadas a su cultivo**

Tesis:

**Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias con
especialidad en Manejo de Recursos Marinos**

Presenta:

Biól. Andrea Medellín Rubio

La Paz, Baja California Sur, Junio del 2003



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:30 horas del día 27 del mes de Mayo del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE *Tetraselmis spp.* Y LAS BACTERIAS ASOCIADAS A SU CULTIVO"

Presentada por el alumno:

MEDELLÍN
Apellido paterno

RUBIO
materno

ANDREA
nombre(s)

Con registro:

A	9	9	0	0	4	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DR. FRANCISCO LÓPEZ GUTIÉRREZ

PRESIDENTE

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO

SEGUNDO VOCAL

MC. NANCY ROMERO IBARRA

SECRETARIO

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

TERCER VOCAL

DRA. MAURILIA ROJAS CONTRERAS

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ



I. P. N.
CICIMAR
DIRECCION

DEDICATORIA

A Alfonso y Marta del Carmen

Gracias por su gran apoyo y su firme decisión de seguir luchando hasta el último momento de la vida a pesar de las adversidades. Dedico esta tesis a esos seres que son los pilares principales en mi vida.

A Jahir

Con su existencia y presencia me dio fuerzas para concluir algo que había empezado. Demostrándome que la vida es tan generosa y te da oportunidades para levantarme y no dejar que las adversidades te abatan. Con cariño a ese pedacito de mi vida y que es la obra maestra más grande y maravillosa que Dios me ha obsequiado.

A Jorge

Por su asistencia y apoyo en el trabajo de laboratorio, además por sus comentarios acertados en el desarrollo del escrito y sobre todo por su compañía, comprensión y amor. Gracias por permanecer siempre en momentos difíciles en mi vida estudiantil y personal, así como buenos momentos, en el cual estoy pasando por un momento único en mi vida. Gracias con todo mi corazón Mac.

A Alejandra y Elizabeth

Gracias por su apoyo incondicional y por darme esas fuerzas únicas que se dan entre hermanas y finalizar este compromiso. Así como a Manuel Alfonso y Itxayana Noemi, a esas personitas importantes en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco López Gutiérrez por la dirección de esta tesis, por sus consejos sabios académicos y sobre todo por brindarme una verdadera amistad y apoyo en todo momento de mi estancia en La Paz. Agradezco a esa persona por transmitirme su buena vibra con tan solo mirarle y esas pocas charlas pero sustanciosas que tuvimos. Gracias Francisco.

Al M. en C. José Luis Ortiz Galindo por su participación en la Co-dirección de esta tesis, por su apoyo y guía durante la escritura de la tesis. Agradezco por hacer un buen papel como mi representante ante Colegio, además quiero agradecerle su confianza y su amistad que me ha brindado.

A la comisión revisora de esta tesis por las sugerencias y comentarios oportunos hechas en su momento, Dra. Maurilia , Dr. Sergio Hernández Trujillo por su intervención y revisión acertada del escrito. Especialmente a la M. en C. Nancy Romero Ibarra por su apoyo incondicional y ético, y que siempre estuvo cuando yo la necesitaba. Por sus consejos la vida estudiantil y laboral. Además quiero agradecer esa amistad que siempre me ha brindado independiente de las condiciones que se presenten y que no se encuentran en cualquier esquina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otórgame un beca durante dos años del posgrado en Maestría en Ciencias con el No. registro: 138053.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (PIFI-IPN) por el apoyo económico que me otorgaron.

A los compañeros del CICIMAR Tanos Grayeb del Alamo, M. en C. Martín Oscar Rosales y a Antonio Ocampo, Tere Barriga (Biblioteca), Susi (Computo), Sra. Martha (Almacen), Martina y Juan (de la Biblioteca), al M. en C. Ricardo Saldierna (por proporcionarme un espacio físico durante una parte del desarrollo de la tesis) , Dr. Ludwing Neagel por sus recomendaciones, a Sonia Estudillo y a la maestra Barbára González Acosta por su amistad y por esos ratos agradables durante mi estancia en La Paz y en el instituto.

A Gladis López y Manuel Zetina por esos momentos pasamos juntos en La Paz.

TABLA DE CONTENIDO

	Pags.
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
TABLA DE CONTENIDO	III
GLOSARIO	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
3 JUSTIFICACIÓN	7
4 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo General	8
2.2 Objetivos Particulares	8
5 MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1 Microalgas y bacterias asociadas y establecimiento de sus cultivos	9
Condiciones de cultivo	9
5.2 Aislamiento e identificación de bacterias	10
5.3 Obtención de cepas de microalgas axénicas del género <i>Tetraselmis</i>	11

5.4	Efecto de las microalgas del género <i>Tetraselmis</i> sobre el crecimiento de las bacterias asociadas	12
5.5	Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas del género <i>Tetraselmis</i>	13
5.6	Análisis estadísticos	16
6	RESULTADOS	19
6.1	Aislamiento e identificación de bacterias	19
6.2	Cepas axénicas de microalgas	24
6.3	Efecto de las microalgas sobre el crecimiento de las bacterias asociadas	25
6.4	Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas	27
7	DISCUSIÓN	39
7.1	Asociación y establecimiento de bacterias en los cultivos de microalgas	39
7.2	Cepas axénicas de microalgas marinas del género <i>Tetraselmis</i>	41
7.3	Efecto de las microalgas sobre el crecimiento de las bacterias asociadas	42
7.4	Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas	44
8	CONCLUSIONES	49
9	RECOMENDACIONES	50
10	BIBLIOGRAFÍA	51
11	ANEXOS	60

GLOSARIO

Aislamiento.- Este método involucra la separación física de los microorganismos en un medio sólido, en células individuales a las cuales al ser cultivadas forman una colonia, que es el cultivo puro derivado de una sola célula ó unidad microbiana (Atlas, 1990; Prescott *et al.*, 1993).

Antagonismo (Amensalismo).- Cuando una población produce una sustancia inhibidora de otra población. La primera población logra ventaja competitiva gracias a su capacidad para inhibir el crecimiento de poblaciones competitivas. (Atlas y Bartha, 1993).

Axénico.- Cultivo puro, que sólo contiene microorganismos de una determinada cepa (Atlas,1990).

Actividad Antimicrobiana ó Bacteriostático.- La actividad antimicrobiana es medida por la determinación de pequeñas cantidades de agente, necesario para inhibir el crecimiento de un organismo (Atlas, 1990; Prescott *et al.*, 1993).

Agente Antimicrobiano ó Bactericida.- Es un compuesto que mata (agente “cida”, bactericida, fungicida, algicida) o inhibe (agente “estático”, bacterioestático, fungiestático, algiestático) el crecimiento de microorganismos, tales sustancias pueden ser compuestos sintéticos o productos naturales (Atlas, 1990; Prescott *et al.*, 1993).

Bacterias gramnegativas.- Bacterias que quedan decoloradas y se tiñen ligeramente por el contraste (generalmente etanol al 95%), rosa en el caso de la safranina (Freeman, 1989; Prescott *et al.*, 1993).

Bacterias grampositivas.- Bacterias que retienen la tinción primaria (colorante de trifenilmetano como cristal violeta) y aparecen de color violeta oscuro (Freeman, 1989; Prescott *et al.*, 1993).

Bacteriovoría.- Cuando los microorganismos como las microalgas tienen alta ingestión por bacterias para obtener Fósforo (P), en ambientes donde el Fosfato (PO_4^-) es escaso. Considerando que las bacterias son una fuente importante de fósforo (F) y son más eficientes en capturar el F en dichos ambientes (Rothhaupt y Güde, 1992; Nygaard, 1993).

Bioensayo.- Es la prueba en la que se usan organismos vivos para determinar la concentración de una sustancia con base a la magnitud del desarrollo o de la actividad del organismo conocido bajo condiciones controladas (Atlas, 1990).

Biomasa.- El peso seco, volumen u otra estimación cuantitativa de organismos; la masa total de organismos vivos en un ecosistema (Atlas, 1990).

Cepa.- Población celular descendiente de una sola célula viva.

Comensalismo.- Una población se beneficia, mientras que la otra permanece sin ser afectada. Es una relación unidireccional entre dos poblaciones, la población no afectada no se beneficia o es negativamente afectada por las acciones de la segunda población. Sin embargo, la distinción entre comensalismo y parasitismo es transitorio y el comensalismo bacteriano puede resultar parasitismo cuando se estresan los organismos fitoplanctónicos. (Atlas, 1990; Atlas y Bartha, 1993; Prescott *et al.*, 1993; Grossart, 1999).

Competencia.- Dos poblaciones utilizan el mismo recurso, tanto en el espacio como de nutrientes, representando una relación negativa entre dos poblaciones en la que ambas poblaciones son adversamente afectadas con respecto a su supervivencia y crecimiento. Las poblaciones pueden lograr bajas densidades máximas o bajas tasas de crecimiento, tanto que ellas podrían tener la ausencia de competencia (Atlas y Bartha, 1993).

Condiciones asépticas.- Tomar todas las precauciones necesarias para prevenir la contaminación del cultivo. Estas condiciones mantienen a los cultivos puros, medios y superficies estériles (Atlas, 1990; Prescott *et al.*, 1993).

Crecimiento bacteriano.- Se considera desde dos puntos de vista. El primero es el ensanchamiento o alargamiento de la célula individual, acompañado de la síntesis de nuevos constituyentes citoplásmicos y celulares. El segundo es el aumento del número de células o un incremento en la masa microbiana que se produce cuando la célula madre se divide para dar origen a dos células hijas (fisión binaria) (Freeman, 1989; Prescott *et al.*, 1993).

Cultivo.- Cepa particular o tipo de organismo que crece en un medio en el laboratorio (Atlas, 1990).

Depredación.- Modo de vida en el cual el alimento se obtiene principalmente matando e ingiriendo animales; interacción entre organismos en la cual un organismo se beneficia y el otro es destruido debido a la ingestión del organismo de menor tamaño llamado “presa”, por el otro organismo de mayor tamaño, denominado depredador (Atlas, 1990).

Ecosistema.- Comunidad de organismos y su entorno natural (Krebs, 1985).

Fases del crecimiento microbiano.- Generalmente consta de 4 fases, (1) fase de latencia o adaptación, es cuando los microorganismos son inoculados en un medio fresco, su crecimiento no comienza inmediatamente solo después de un período de tiempo. (2) Fase exponencial, es cuando una célula se divide para formar dos, cada una de ellas también se divide para formar dos o más células y así sucesivamente. (3) Fase estacionaria, cuando cesa el crecimiento de la población y el número de células muertas es igual al número de células vivas. (4) Fase de muerte celular, cuando los organismos de la población muere (Mantell, 1985).

Hábitat.- Lugar de residencia de un organismo en la naturaleza, incluyendo todos los factores vivos y no vivos que rodean e influyen al organismo (Krebs, 1985).

Interacciones ecológicas.- Tanto interacciones positivas como negativas que ocurren entre individuos dentro de una sola población microbiana y entre las diversas poblaciones microbianas de una comunidad. La totalidad de las interacciones entre poblaciones mantienen el balance ecológico de la comunidad (Atlas y Bartha, 1993).

Interacciones negativas.- Son aquellas que se dan entre poblaciones que actúan como mecanismos de regulación que limitan la densidad de las poblaciones. En algunos casos, esas interacciones eliminan poblaciones no aptas para existir en la comunidad de un hábitat determinado (Atlas y Bartha, 1993).

Interacciones positivas.- Son aquellas que se dan entre poblaciones biológicas que incrementan las posibilidades de supervivencia dentro de la comunidad de un hábitat particular, usan más eficientemente el recurso disponible y en las cuales las poblaciones por sí solas no podrían subsistir (Atlas y Bartha, 1993).

Medio de cultivo.- Solución acuosa con varios nutrientes adecuados para el crecimiento de microorganismos.

Microorganismos.- Son unicelulares o multicelulares, no están compuestos de tejido diferenciado. Estos organismos caen dentro de cinco grupos mayores: bacterias, virus, hongos, algas y protozoarios. (Glazer y Nikaido, 1995).

Morfología colonial.- Contornos físicos de las colonias bacterianas donde muestran forma, elevación y margen de las bacterias (Atlas, 1990). De igual forma, las colonias bacterianas, compuestas por masas de células individuales, tienen características de tamaño, consistencia, textura y color, que posee un valor sistemático, pero no tienen la importancia fundamental de la morfología celular (Freeman, 1989).

Mutualismo.- Difiere del sinergismo, ya que esta es una relación obligatoria entre dos poblaciones donde se benefician ambas poblaciones. La bacteria se beneficia de los productos fitoplanctónicos tales como exudados, mientras que el fitoplancton se beneficia de los productos bacterianos denominados factores de crecimiento, como nutrientes remineralizados, vitaminas entre otros. Requiere de un acercamiento físico, siendo altamente específico y un miembro no puede ser reemplazado por otra especie relacionada (Atlas y Bartha, 1993; Prescott *et al.*, 1993; Grossart, 1999).

Neutralismo.- Representa la falta de interacción entre dos poblaciones. Es raro esta interacción pero puede presentarse entre poblaciones que son removidas físicamente una de la otra. La falta de interacción es más probable en bajas densidades de población en las que los organismos parecen no tener contacto físico unos con otros, como ocurre con densidades elevadas (Atlas, 1990; Atlas y Bartha, 1993).

Parasitismo.- La población parásita se beneficia y la hospedera es dañada. Como regla, las relaciones de parasitismo se caracterizan por un período relativamente prolongado de contacto, y el parásito es más pequeño que el huésped. El parásito normalmente extrae sus requerimientos nutricionales de la célula huésped y, en este proceso, la célula huésped es dañada (Atlas, 1990; Prescott *et al.*, 1993; Grossart, 1999).

Parasitismo indirecto. Una de las poblaciones que interactúa excreta sustancias en el medio que da como resultado la lisis del organismo de la segunda población y así obtiene su requerimiento nutricional (Baker y Herson, 1978).

Producción Primaria.- Cantidad de materia orgánica producida por las plantas y microorganismos fotosintéticos en un ecosistema (Krebs, 1985).

Sinergismo (Protocooperación).- Entre dos poblaciones indica que ambas poblaciones se benefician de la relación. Permite a las poblaciones microbianas realizar actividades tales como la síntesis de un producto que ninguna de las poblaciones lo podría hacer sola (Atlas y Bartha, 1993).

Tasa específica de crecimiento.- Tasa de crecimiento por unidad de cantidad de biomasa (Krebs, 1985).

Tiempo de generación.- Es el intervalo de tiempo para la formación de dos células originadas de una, es decir, es el tiempo requerido para que el número celular se duplique (Krebs, 1985).

Unidades Formadoras de Colonias (UFC).- Es una unidad celular viable capaz de dividirse y formar una colonia (Atlas, 1990).

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pags.
Figura 1. Esquema del proceso del método modificado de Doble Capa en placa (Dopazo <i>et al.</i> , 1988) para demostrar el efecto de inhibición de bacterias por parte de las microalgas.....	12
Figura 2. Esquematzación del efecto de las bacterias sobre el crecimiento de microalgas por el método modificado de discos en placa (DeLucca y McCracken, (1977)	14
Figura 3. Correlación entre el crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp. y el crecimiento de las cepas bacterianas C7A y C7B asociadas al cultivo en la columna 7 durante 16 días de muestreo. La línea representa el mínimo cuadrado lineal en relación a los datos.....	20
Figura 4. Correlación entre el crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp. y el crecimiento de la cepa bacteriana C8Q asociada al cultivo en la columna 8 durante 16 días de muestreo. La línea representa el mínimo cuadrado lineal en relación a los datos.....	21
Figura 5. Microalgas marinas axénicas del género <i>Tetraselmis</i> , observadas con un microscopio de contraste de fases a 100x con aceite de inmersión. A) <i>T. apiculata</i> 2562; B) <i>T. suecica</i> 2262; C) <i>T. chuii</i> 232; D) <i>T. gracilis</i> 2563; E) <i>T. striata</i> 2565; G) <i>T. tetrathele</i> 557; F) <i>Tetraselmis</i> sp.....	24
Figura 6. Inhibición del crecimiento de la cepa <i>Aeromonas johnsonii</i> (C8T6) por la microalga <i>Tetraselmis chuii</i> (T.ch), a través de la formación de halos de (zona clara alrededor del crecimiento microalgal) de un diámetro de 17 mm, en <i>T. suecica</i> (T.sue) de 12 mm y en <i>T. striata</i> (T.st) un diámetro de 4 mm.....	26
Figura 7. Discos en placa (DeLucca y McCracken, 1977). Discos de color verde con excesivo crecimiento microalgal de <i>T. apiculata</i> debido a la impregnación con suspensión bacteriana y sobrenadante (CEL y SOB, respectivamente) de la cepa bacteriana Tc8. En las fracciones MC (medio de cultivo estéril), BCO (solución salina 2.5% NaCl), ΔT (discos impregnados con sobrenadante bacteriano a 180°C) no influyeron en el crecimiento de la microalga.....	29
Figura 8. Agrupamiento de las siete microalgas marinas axénicas del género <i>Tetraselmis</i> , de acuerdo a su producción celular (cel ml ⁻¹). Grupo I, formado por <i>T. apiculata</i> y <i>T. tetrathele</i> ; grupo II, formado por <i>Tetraselmis</i> sp., <i>T. gracilis</i> y <i>T. striata</i> , y grupo III, formado por <i>T. suecica</i> y <i>T. chuii</i>	31
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp. MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>Idiomarina abyssalis</i> (C8J1 —□—), MA/ <i>Marinobacter aquaeolei</i> (Tsue1 —△—), MA/ <i>I. abyssalis</i> (Tt4 —◇—).....	32

Figura 10. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis striata</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>I. abyssalis</i> (C7G6 —◇—), MA/Tt5 (—□—), MA/C8M2 (—△—).....	33
Figura 11. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis suecica</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>Halomonas variabiis</i> (Tc7 —△—), MA/Tt4 (—◇—), MA/Tt5 (—□—).....	34
Figura 12. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis gracilis</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>Halomonas nitritophilus</i> (C7H8 —◇—), MA/ <i>Pseudomonas stutzeri</i> (C7B1 —□—), MA/ <i>Marinobacte aquaeolei</i> (Tsue1 —△—).....	35
Figura 13. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis chuii</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>Halomonas variabiis</i> (Tc1 —□—), MA/C8M2 (—△—), MA/ <i>Pseudomonas stutzeri</i> (Tc5 —◇—).....	36
Figura 14. Curvas de crecimiento de <i>T. tetrathele</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ <i>Halomonas variabiis</i> (Tc7 —△—), MA/ <i>Alteromonas macleodii</i> (Tt1 —□—), MA/Tt5 (—◇—).....	37
Figura 15. Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis apiculata</i> , MA (—●—) durante la interacción con las cepas de bacterias: MA/ <i>Halomonas variabiis</i> (Tc7 —◇—), MA/ <i>Idiomarina abyssalis</i> (C7G6 —△—), MA/ <i>Alteromonas macleodi</i> (Tt1 —□—).....	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Pags.
Tabla 1. Origen de las especies de microalgas marinas del género <i>Tetraselmis</i> de la familia <i>Prasinophyceae</i>	9
Tabla 2. Lista de cepas bacterianas aisladas de los cultivos de las microalgas marinas del género <i>Tetraselmis</i>	19
Tabla 3. Correlación del crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp. con respecto al crecimiento bacteriano asociado al cultivo en la columna 7 durante 16 días de muestreo.....	20
Tabla 4. Correlación del crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp. con respecto al crecimiento bacteriano asociado al cultivo en la columna 8 durante 16 días de muestreo.....	21
Tabla 5. Caracterización morfológica e identificación bioquímica de las cepas de bacterias aisladas de los siete tipos de microalgas marinas del género <i>Tetraselmis</i>	22
Tabla 6. Lista de cepas bacterianas identificadas molecularmente amplificando y secuenciando el gen 16S rDNA.....	24
Tabla 7. Actividad antibacteriana de microalgas del género <i>Tetraselmis</i> sobre el crecimiento de bacterias marinas, formando halos de inhibición.....	26
Tabla 8. Inhibición significativa del crecimiento de las bacterias por diferentes especies de microalgas marinas.....	25
Tabla 9. Descripción cualitativa del efecto de bacterias (en discos impregnados de suspensión celular y sobrenadante) sobre el crecimiento de las siete microalgas del género <i>Tetraselmis</i>	28
Tabla 10. Tasa de crecimiento, tiempo de generación y número de generaciones por día en un cultivo estático de microalgas axénicas del género <i>Tetraselmis</i>	30
Tabla 11. Análisis de variancia de una vía de la biomasa celular de microalgas axénicas.....	30
Tabla 12. Análisis de variancia de una vía en combinación de 7 tipos de microalgas del género <i>Tetraselmis</i> con 17 bacterias.....	32

RESUMEN

En estudios recientes se ha demostrado que ciertas bacterias asociadas a los cultivos de microalgas promueven o inhiben su crecimiento y ciertas microalgas producen sustancias antibacterianas y fungicidas; sin embargo, se desconoce las interacciones entre las poblaciones microbianas presentes en los cultivos. El objetivo del presente trabajo es explorar bajo condiciones controladas las posibles interacciones entre las microalgas marinas del género *Tetraselmis* y las bacterias asociadas a su cultivo. Para ello se utilizaron 6 cepas de referencia de la colección UTEX y una cepa de la colección de microalgas del CICIMAR. En un cultivo rutinario (cultivos en la UPIMA) de *Tetraselmis* sp. en dos columnas se aislaron un total de 20 cepas bacterianas con diferente morfología asociadas al cultivo durante 16 días de muestreo. En ambas columnas el crecimiento de la microalga no se correlaciono significativamente ($p < 0.05$) con el crecimiento bacteriano, pero las cepas A, B y Q mostraron una tendencia positiva (r^2 de 0.275245, 0.27726 y 0.226232 respectivamente). 42 cepas bacterianas (bacilos gram negativos, catalasa y oxidasa positivas) fueron aisladas de los cultivos de las microalgas y fueron identificadas 8 cepas por el sistema BIOLOG[®] y 16 cepas por el Dr. Bowman por la técnica de “Bacterial identification by 16S rDNA sequencing”. El efecto de la presencia de las microalgas sobre el crecimiento de las bacterias se evaluó por el método modificado de Doble capa (Dopazo *et al.*, 1988) en placas con medio f2- β modificado y se incubaron a 24°C a iluminación continúa de 15-20 días. Las microalgas inhibieron el crecimiento de 13 cepas de bacterias formando halos de inhibición. El efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas marinas del género *Tetraselmis* fue evaluado por el método modificado de discos en placa (DeLucca y McCracken, 1977), impregnados con 5 μ l de una suspensión bacteriana (10^8 - 10^9 bacterias ml^{-1}) se colocaron en placas inoculadas previamente con microalgas. Las placas se mantuvieron a 24°C a iluminación continúa de 15-20 días. Las bacterias estimularon el crecimiento de las microalgas reflejándose sobre y en la periferia de los discos. Este efecto positivo se corroboró en cultivos estáticos con medio f2- β modificado. Por triplicado se inocularon 17 bacterias (10^8 - 10^9 bacterias ml^{-1}) en combinación con cada una de las microalgas, adicionalmente se tuvieron controles de microalgas axénicas y bacterias, incubándose a 24°C a iluminación continúa de 15 días. El crecimiento se evaluó mediante lecturas en un fotómetro a 660 nm. Se concluye que hay bacterias que son sensibles a la presencia de las microalgas del género *Tetraselmis* y otras promueven el crecimiento de las microalgas. Por lo que se infiere que dentro de los cultivos existen interacciones de Neutralismo, Sinergismo, Antagonismo, Comensalismo y/o Parasitismo.

ABSTRACT

It has been demonstrated in recent studies that certain bacteria associated to the microalgae cultures promote or inhibit their growth. And, also, certain microalgae in culture produce antibacterial and fungicide substances; however, the interactions among these microbial populations and microalgae cultures are not well known. The aim of this study was to explore the possible interactions among the marine microalgae *Tetraselmis spp.* and the bacteria associated to its culture. They were used 6 strains of reference from UTEX Collection and a strain from the microalgae collection of CICIMAR. In a two columns culture of *Tetraselmis sp.*, 20 bacterial strains were isolated with different morphology during 16 days of sampling. In both columns the growth of the microalgae do not correlate significantly ($p < 0.05$) with bacterial growth, however the strains A, B and Q showed a positive growth correlation. Forty two bacterial strains (Gram negative bacillus, positive catalasa and oxidasa) were isolated of the microalgae culture. Of these, 8 strains were identified by the BIOLOG[®] system and 16 strains were sent to Dr. John P. Bowman at University of Tasmania, Australia for their molecular identification (16S gen sequences). The effect of microalgae on the bacterial growth was determined according to the double-layer modified method (Dopazo et al., 1998) using plates of solid f2- β modified medium. The cultures were incubated during 15-20 days under continuous illumination at 24°C. It was found that microalgae inhibited the growth of 13 strains. On the other hand, the effect of the bacteria on the growth of marine microalgae was evaluated by the modified method of disk in plates (De Lucca and McCracken, 1977). The bacteria stimulated the growth of microalgae. This positive effect was corroborated in static cultures with f2- β modified medium. The growth was evaluated by absorbance using a photometer at 660 nm in all cases. It is concluded that there are sensitive bacterial strains to *Tetraselmis sp.* and others play the role of growth promoters of the marine microalgae. Therefore, interactions of neutralism, synergism, antagonism, comensalism or/and parasitism could be found in these microalgae cultures.

1 INTRODUCCION

La acuicultura ha crecido en el campo de la producción de componentes alimenticios. Dentro de esos componentes se encuentran las microalgas, que son microorganismos fototróficos (De Pauw *et al.*, 1984; Hai *et al.*, 2000) y son el punto inicial en el flujo de energía de cadenas alimenticias acuáticas mediante la fotosíntesis (Abe *et al.*, 1999), fijando carbono inorgánico e incorporando carbono orgánico, por lo que el manejo de la producción algal es una parte integral de muchas operaciones acuícolas. En este sentido, al cultivar las microalgas bajo condiciones semi-controladas o controladas se obtiene tal biomasa, que permita su uso como fuente directa de alimento (Otero y Fábregas, 1997) para diferentes estados larvales de moluscos (almejas, ostras y mejillones), de algunos gasterópodos (abulón), y de organismos comercialmente importantes, rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y braquiopodos (*Artemia* sp.); de copépodos, cladóceros; fuente indirecta de alimento para larvas de peces marinos (bacalao, lenguado) y crustáceos (camarones del género *Penaeus*); así como también, su uso en larvicultivo de peces en agua verde (Volkman *et al.*, 1989; Benemann, 1992; Olsen *et al.*, 2000). A pesar del amplio uso de este alimento vivo, se han introducido dietas microparticuladas para larvas de peces marinos reduciendo la dependencia de este alimento (Tsavalos y Day, 1994; Borowitzka, 1992; Su *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1999; D'Souza y Kelly, 2000; Cahu y Zambonino Infante, 2001; Takeuchi, 2001).

Las microalgas no solamente juegan un papel importante como alimento modificando y estabilizando el valor nutricional del alimento vivo (Reitan *et al.*, 1997) sino también en las interacciones con bacterias (Grossart, 1999) y en la cadena trófica (Nicolas *et al.*, 1989; Flynn, 1990; Stoderegger y Herndl, 1998), permitiendo una amplia gama de interacciones en ambientes marinos. En ambientes naturales, donde se observan interacciones múltiples de comunidades heterogéneas de bacterias y fitoplancton existen relaciones simultáneas las que pueden ser variables en tiempo y espacio (Grossart, 1999). Bajo condiciones controladas se presentan interacciones bacteria-fitoplancton, creando un sistema biológico eficiente en la utilización de nutrientes (Rhothaupt y Güde, 1992; Rhothaupt, 1992; González *et al.*, 2000; Lopes-Thompson *et al.*, 2002) porque en ambos organismos existe una interacción directa (Ietswaart *et al.*, 1994; Mayo y Noike, 1994).

La importancia de las comunidades microbianas en los sistemas de producción de alimento vivo juegan un papel benéfico promoviendo el crecimiento de dichos organismos (Goldman y Dennett, 1991; Douillet y Langdon, 1994; Fukami *et al.*, 1997; Rico-Mora *et al.*, 1998; Rombaut *et al.*, 1999;), o porque tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos; conocidas actualmente como “probióticos” (Green *et al.*, 1999; Reid, 1999), así como también presentan diversas interacciones como antagonismo, competencia o promotores de la salud (Olafsen, 2001).

Las comunidades microbianas, de bacterias patógenas oportunistas es que comúnmente habitan el agua de mar y son así introducidas a las granjas o a los tanques de cultivo, causando mortalidades masivas principalmente de larvas de peces (Skejermo y Vadstein, 1999; Phatarpekar *et al.*, 2002) y de bivalvos (Nottage y Birkbeck, 1986). La microflora del plancton, específicamente de microalgas, es dominada por cepas del género *Vibrio* algunas son oportunistas o potencialmente patógenas en cierta época del año. Dichas bacterias se adhieren a superficies favorables para asegurar un suministro de nutrientes (Nakano, 1996; Olafsen, 2001) dependiendo del medio en que se encuentren (Jensen y Fenical, 1994).

El amplio uso de las microalgas en acuicultura se debe a sus características que poseen, tales como tamaño, contenido proteico, lipídico, vitamínico y de pigmentos (Roeck-Holtzhauer *et al.*, 1991; Borowitzka, 1992; Borowitzka, 1997). *Tetraselmis suecica*, es un alga verde flagelada, unicelular, que ha sido ampliamente usada como alimento para bivalvos, larvas de camarón, rotíferos y *Artemia* (Benemann, 1992; Fenwick y Day, 1992; Tsavalos y Day, 1994; Qin *et al.*, 1999). Actualmente, a *Tetraselmis suecica*, se le ha inferido actividad antibiótica (Austin y Day, 1990; Austin *et al.*, 1992), así mismo se ha reportado que estimulan la actividad bacteriana (Bell *et al.*, 1974; Wang y Priscu, 1994 a y b). En contraste, *T. chuii* y dos bacterias asociadas a su cultivo es reportada con una interacción sinergista (Cañizares-Villanueva y Arredondo, 1993).

Las investigaciones sobre interacciones microbianas han sido enfocadas principalmente a competencia por el recurso (Dopazo *et al.*, 1988; Rico-Mora y Voltolina, 1995), de sinergismo (Cañizares-Villanueva y Arredondo, 1993) y escasamente de propiedades antimicrobianas (Austin y Day, 1990; Austin *et al.*, 1992). Sin embargo, uno de los tópicos que más ha recibido atención es la producción de metabolitos secundarios de

algas marinas (Clorofitas, Feofitas y Rodofitas) en ambientes naturales, obteniendo una gran variedad de metabolitos bioactivos (Robles-Centeno y Ballantine, 1999; Smith y Doan, 1999). Escasamente se ha abordado las interacciones que existen entre las microalgas de uso acuícola y las bacterias asociadas a ellas, ya que se cree que este tipo de estudios podrían ser utilizados *a posteriori* en beneficio al crecimiento de microalgas o un control microbiano en los sistemas de cultivo de larvas de peces, afectando indirectamente las altas mortalidades de larvas de peces (Makridis *et al.*, 2000) y como agua verde (microalgas) favoreciendo la crianza de larvas de peces (Olsen *et al.*, 2000).

De ahí se desprendió el presente trabajo, en el cual se evaluaron las interacciones presentes entre los cultivos de siete especies de la microalga marina *Tetraselmis* y de aislamientos específicos de bacterias asociadas a sus cultivos bajo condiciones controladas. Se estudió la capacidad de las microalgas de inhibir o favorecer el crecimiento de las bacterias, así mismo la capacidad de bacterias aisladas de dichos cultivos para incrementar o inhibir el crecimiento de las microalgas y poder determinar si las interacciones fueron de tipo sinergista, antagonismo, competencia, o algún otro tipo.

2 ANTECEDENTES

Las microalgas no solamente juegan un papel importante como alimento, sino que, junto con bacterias, crean un sistema biológico eficiente en la utilización de nutrientes (González *et al.*, 2000; Lopes-Thompson *et al.*, 2002) porque en ambos organismos existe una interacción directa (Ietswaart *et al.*, 1994; Mayo y Noike, 1994). Además, las bacterias tienen la capacidad de actuar en él como probióticos (Fukami *et al.*, 1997), presentando diversas interacciones microbianas como antagonismo y competencia, debido a la producción de bacteriocinas actuando como promotores de salud de su hospedero (Olafsen, 2001). Las microalgas captan la luz produciendo oxígeno y compuestos orgánicos para el metabolismo aerobio heterotrófico de las bacterias y estas a su vez promueven el crecimiento de las microalgas proporcionándoles CO₂ y vitaminas, además de otros metabolitos (Rico-Mora y Voltolina, 1995). Bajo condiciones limitantes (v.gr. luz, CO₂ y nutrientes) las bacterias compiten por nutrientes con las microalgas (Guerrini *et al.*, 1998).

Estos microorganismos, se encuentran asociados formando poblaciones dentro de comunidades. Dentro de esas comunidades, existen interacciones que resultan en cierto beneficio para una población en particular, en cambio otras causan algún daño a la población, por lo que se habla de interacciones positivas y negativas. Dichas interacciones se encuentran reguladas genéticamente y por sistemas químicos como agentes quelantes (Smith y Doan, 1999).

Dentro de las interacciones positivas, se encuentra la interacción que existe entre la microalga *Tetraselmis chuii* y dos bacterias (no identificadas) sugerida por Cañizares-Villanueva y Arredondo (1993). Dicha interacción es de tipo *sinérgico o sinérgico*. En extractos de *Tetraselmis suecica* cultivada heterotróficamente, (Austin y Day, 1990; Austin *et al.*, 1992) encontraron actividad antibacteriana (interacción *antagónica*) (Gupta y Shrivastava, 1965; Duff *et al.*, 1966; Viso *et al.*, 1987), inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas de peces: *Aeromonas salmonicida*, *Lactobacillus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus* sp., *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida* y *Yersinia ruckeri*.

Los compuestos activos han sido identificados en algas superiores, incluyendo toxinas algales (neurotoxinas y hepatotoxinas), compuestos antimicrobianos y enzimas

inhibitorias. Sin embargo, se tiene pocas publicaciones acerca de la producción de compuestos activos en microalgas marinas, donde los extractos y el sobrenadante de las microalgas *Tetraselmis suecica* y *T. gracilis* presentaron compuestos activos (principalmente tóxicos) (Lincoln *et al.*, 1990).

Existen interacciones microalga-bacteria o interacciones bacteria-bacteria. Generalmente, a las algas diatomeas se les ha conferido actividad biológica (Duff *et al.*, 1966; Cooper *et al.*, 1983; Viso *et al.*, 1987; Rico-Mora y Voltolina 1995; Naviner *et al.*, 1999), estando en asociación con bacterias presentan un buen crecimiento, las cuales usan los productos extracelulares excretados por las microalgas y estas al mismo tiempo proveen de vitaminas y otros factores de crecimiento. Los responsables directos de dicha actividad antibacteriana son los ácidos grasos (Duff *et al.*, 1966; Cooper *et al.*, 1983; Viso *et al.*, 1987; Naviner *et al.*, 1999).

Autores como Munro *et al.* (1995) demostraron que existen bacterias (*Flavobacterium*) aisladas de larvas de lenguado (*Scophthalmus maximus*) que inhibieron el crecimiento de la microalga *Pavlova lutheri*, con un inóculo de 10^3 UFC ml⁻¹, esa inhibición se debió a factores termolabiles excretados por la bacteria en el medio de cultivo. Así mismo, estas bacterias producen bactericina (s) que inhiben el crecimiento *Vibrio* spp. Sin embargo, existen bacterias que selectivamente promueven el crecimiento de las algas (Maruyama *et al.*, 1989); así como también, las especies de *Pseudoalteromonas* (subdivisión gama de la clase Proteobacteria) mostraron un efecto alguicida en “blooms” algales como especies de gimnodinoides (incluyendo *Gymnodinium catenatum*) y radiofitas (*Chattonella marina* y *Heterosigma akashiwo*) y podrían jugar un papel importante en la regulación del desarrollo de algas no deseadas (Lovejoy *et al.*, 1998). El efecto de antibiosis y bacterioestático fueron demostrados en cultivos de *Skeletonema costatum*, dos cepas de bacterias identificadas como SK02, SK03 presentaron dichos efectos, respectivamente (Rico-Mora y Voltolina, 1995).

Así como existen interacciones microalga-bacteria, también existen interacciones bacteria-bacteria, y con el objetivo del uso de bacterias como control de epizootias en acuicultura, evaluaron interacciones bacteria-bacteria (interacciones de tipo antagónico), mostrando a bacterias con actividad antibiótica contra bacterias patógenas de peces (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Edwardsiella*, *Yersinia* y *Pseudomonas*), excepto *Edwardsiella*

yarda y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron resistente a la antibiosis de las cepas bacterianas (Dopazo *et al.*, 1988). Sugita *et al.* (1998) reportaron a *Bacillus* sp. NM12 aislada del contenido intestinal de un pez costero, con una sustancia antibacteriana (siderofooro termolabil); con un amplio espectro antibacterial contra bacterias intestinales de peces costeros, principalmente *Vibrio vulnificus*. La producción de antibióticos por bacterias marinas y de sustancias inhibitorias han sido involucradas en la inhibición de patógenos de peces.

En general, son escasos los estudios sobre los compuestos que estimulan el crecimiento de algas unicelulares (como flagelados de marea roja), Maruyama *et al.* (1989), reportaron a bacterias y sedimentos marinos productores de compuestos activos como la citoquinina (auxina ácido acético-3-indol), la cual estimula el crecimiento de algas flageladas.

También se ha reportado el crecimiento de un cultivo mixto de bacterias marinas y diatomeas axénicas (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis* y *Thalassiosira weissflogii*). En ambos organismos el crecimiento fue significativo cuando se incubaron juntos en medio sintético y/o agua de mar enriquecida con nutrientes inorgánicos, vitaminas y metales traza, observándose que las interacciones entre bacterias específicas y diatomeas marinas dependen fuertemente de las condiciones ambientales en que se encuentren, mostrando interacciones desde simbiosis hasta parasitismo (Grossart, 1999). Así mismo, las algas flageladas incrementan la bacteriovoria, una estrategia importante para adquirir nutrientes durante períodos de limitación de nutrientes inorgánicos (Nygaard, 1993).

De acuerdo a los antecedentes anteriores, el presente trabajo se realizó para examinar, bajo condiciones controladas de laboratorio, el tipo de interacción que existe en el cultivo de microalgas-bacterias. Dicho cultivo es utilizado actualmente en maricultura, como alimento particularmente de rotíferos (*Brachiounus plicatilis*), los cuales son de importancia como alimento presa de larvas de peces de importancia económica en La Paz, Baja California Sur, México.

3 JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de que en ambientes marinos las microalgas se asocian con bacterias, principalmente en la producción de peces y crustáceos (Reitan *et al.*, 1997; Hooper, *et al.* 1998); pueden existir aspectos negativos en dicha asociación como es la proliferación de bacterias patógenas oportunistas (Nottage y Birkbeck, 1986; Skejermo y Vadstein, 1999; Phatarpekar *et al.*, 2002) en los sistemas de cultivo de organismos de importancia acuícola. Esto ha traído consigo la necesidad de desarrollar técnicas de diagnóstico y control bacteriano para proteger la producción de microalgas, del alimento vivo (rotíferos), y de los cultivos de especies de peces y crustáceos de importancia comercial. Sin embargo en la actualidad, es poca la atención que han recibido las interacciones entre microalgas y bacterias (Baker y Herson, 1978; Dopazo *et al.*, 1988; Austin y Day, 1990; Austin *et al.*, 1992; Cañizares-Villanueva y Arredondo, 1993). La hipótesis planteada en este trabajo es: en los cultivos de microalgas del género *Tetraselmis* existen bacterias asociadas, las cuales establecen relaciones interespecíficas antagonismo, mutualismo, comensalismo, sinergismo y/o parasitismo con las algas. Una de las alternativas que se estudió fue bajo este punto de vista: el efecto bacteriano sobre el crecimiento de las siete especies de microalgas marinas axénicas del género *Tetraselmis* y viceversa, en cultivos a pequeña escala (10 ml). El objetivo de este trabajo fue entender el funcionamiento de las interacciones positivas y negativas entre las microalgas y bacterias en cultivos estáticos.

4 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Establecer la relación existente entre las microalgas marinas *Tetraselmis suecica*, *T. chuii*, *T. tetrathele*, *T. striata*, *T. apiculata*, *T. gracilis* y *Tetraselmis* sp., mantenidas en cultivo estático y las bacterias asociadas a ellas.

2.2 Objetivos Particulares

- 2.2.1 Aislar e identificar las bacterias asociadas al cultivo de siete microalgas marinas del género *Tetraselmis*.
- 2.2.2 Obtener cultivos axénicos de siete microalgas marinas del género *Tetraselmis*.
- 2.2.3 Evaluar el efecto de la presencia de las siete microalgas marinas en la viabilidad y el crecimiento de las bacterias asociadas a estas microalgas.
- 2.2.4 Evaluar el efecto de la presencia de las bacterias sobre el crecimiento de las siete microalgas de estudio.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microalgas y bacterias asociadas y establecimiento de sus cultivos

Tabla 1. Origen de las especies de microalgas marinas del género *Tetraselmis* de la familia *Prasinophyceae*.

Microalga	Fuente
<i>Tetraselmis apiculata</i> (2562, Butcher)	UTEX*
<i>T. chuii</i> (232, Butcher)	UTEX*
<i>T. gracilis</i> (2563, Kylin, Butcher)	UTEX*
<i>T. striata</i> (2565, Butcher)	UTEX*
<i>T. tetrathele</i> (557, Butcher)	UTEX*
<i>T. suecica</i> (2286, Kylin, Butcher)	UTEX*
<i>Tetraselmis</i> sp.	CRIP**

* Universidad de Texas, Austin Texas, U.S.A. Departamento de Botánica.

** Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de la Paz, B.C.S, México, donada a la colección de microalgas del laboratorio de Microbiología adscrito al Departamento de Desarrollo de Tecnologías del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR)-IPN, La Paz, B.C.S., México.

Condiciones de cultivo

Se corroboró el grado de pureza de las microalgas con siembras en medio sólido de Guillard (1973, 1975) f/2- β modificado (medio f/2- β) (Anexo 1a). Posteriormente, se resembraron en tubos con medio f/2- β agar inclinado formando un cepario de colección, transfiriéndose a medio fresco periódicamente (30-40 días).

Durante los experimentos, las cepas de referencia crecieron en medio líquido f/2- β modificado (Anexo 1b); bajo las siguientes condiciones de cultivo: Temperatura de 24 \pm 2°C; iluminación continua (~4000 lux), utilizando lámparas de luz fluorescentes de 75W; sin aireación y una salinidad del agua de 35 ‰; variando el tiempo de cultivo en todos los casos.

Las condiciones de cultivo de la microalga marina *Tetraselmis* sp. donada, se manejaron de acuerdo al sistema de producción de la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) en el CICIMAR-IPN; siendo cultivos continuos en columnas de 300 l con 150 l de cultivo; fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad (16:8); aireación y una salinidad de 35‰.

El muestreo del crecimiento microalgal en las columnas 7 y 8 se llevo a cabo de la siguiente manera: se abría una llave en la parte posterior a la columna donde se desechaban aproximadamente 300 ml de cultivo por efecto de la sedimentación a pesar de que contaban con aireación. Posteriormente se tomaba un alicuota aproximada de 10 ml en un tubo de ensaye con tapón de rosca, previamente estéril. Para estimar la producción microalgal se hicieron lecturas de turbidez y conteos directos por triplicado en la cámara de Neubauer.

Las bacterias se aislaron tanto de cultivos de la microalga donada *Tetraselmis* sp. como de las seis microalgas de referencia del género *Tetraselmis*, siendo las condiciones de cultivo, para estas últimas, diferentes a las de la primera microalga.

Para el aislamiento de las bacterias se empleó Agar Marino 2216 (AM) (Anexo 2) y se incubaron a 30°C de 24 a 48 horas en todos los casos. Para su conservación, las bacterias se almacenaron en condiciones asépticas en tubos con AM inclinado a 10°C realizándose resiembras periódicas (30-40 días).

5.2 Aislamiento e identificación de bacterias

Se aislaron cepas bacterianas de diferentes morfologías coloniales de los cultivos masivos de las siete especies de microalgas del género *Tetraselmis* sembradas previamente en medio líquido f/2- β durante 7 a 8 días. De estos cultivos se tomó una alícuota con una asa bacteriológica esterilizada asépticamente y se hicieron extensiones en superficies en placas con agar marino (AM) por triplicado.

Así mismo, de acuerdo a la UPIMA, en dos columnas denominadas 7 y 8 con 100 l de cultivos de la microalga *Tetraselmis* sp. se aislaron cepas bacterianas de diferentes morfologías. A partir de 10 ml de los cultivos se realizaron diluciones decimales y de la última se tomo una alícuota de 100 μ l que fueron sembrados por extensión en placas con AM por triplicado durante 16 días de muestreo para su conteo y aislamiento de colonias bacterianas.

Las bacterias en cada cultivo de microalgas se cuantificaron por cuenta viable haciendo diluciones decimales y sembrando por extensión en superficie en AM por triplicado, incubadas a 30°C de 24-48 horas y la cuantificación se hizo a través de un cuentacolinias.

A cada colonia se le describió su morfología colonial y celular, a través de la tinción de Gram (Anexo 3). Para corroborar el grado de pureza de cada cepa, se utilizó la prueba de tinción fluorescente con anaranjado de acridina (DIFCO) y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60) a 100x con aceite de inmersión.

Posteriormente, se procedió a la identificación bioquímica de las cepas bacterianas, empleando un sistema de multipuebas comerciales GN2 y GP2-MicroPlate-BIOLOG[®] (Anexo 4), las microplacas fueron incubadas a 30°C de 24-48 h. Este sistema consiste de una microplaca con 96 pozos conteniendo igual número de fuentes de carbono y por medio de un lector de microplacas ELISA (Sensident Scan de MERCK) se midió el cambio de color a una absorbancia de 580 y 690 nm incluyendo el control; esta información fue analizada a través de un software Biolog's MicroLog, el cual mostró una lista de especies y su porcentaje de identificación.

También se realizaron las pruebas de la catalasa y oxidasa. En la primera se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% y para la última, un kit de discos de diferenciación BBL[™] (0.9 mg de P-aminodimetylanilina) para *Neisseria* y *Pseudomonas*; en ambas pruebas el cambio de color fue una reacción positiva.

5.3 Obtención de cepas de microalgas axénicas del género *Tetraselmis*

Para la obtención de microalgas axénicas se hicieron siembras continuas por extensión en superficie en placas con medio f/2-β incubadas por un período de 7 a 8 días y se hicieron observaciones de las bacterias asociadas a las microalgas con un microscopio estereoscópico (ZEISS West Germany) a 10x, así como mediante pruebas de tinción de Gram, anaranjado de acridina y cuentas viables en placas de AM.

Las microalgas se cuantificaron fijándolas con formol al 4%, en una cámara de Neubauer (profundidad, 0.100 mm, superficie 0.0025 mm², cubreobjetos de 20 x 26 mm de un grosor de 0.4-0.6 mm) y observando al microscopio el número de células.

5.4 Efecto de las microalgas del género *Tetraselmis* sobre el crecimiento de las bacterias asociadas

Para evaluar un efecto negativo de las microalgas sobre el crecimiento bacteriano en un cultivo de microalgas, se utilizó el método modificado de Doble-Capa o difusión en placa (Dopazo *et al.*, 1988) (Figura 1). El experimento consistió en preparar placas con dos capas distintas de agar. La primera capa, se formó con medio f/2- β y fue inoculada por punción con las siete microalgas del género *Tetraselmis*. Las placas se dividieron con líneas dibujadas en la parte externa de la placa, cada división contenía punciones por triplicado. Estas placas se incubaron a 24°C, iluminación continua por 10 días aproximadamente hasta obtener suficiente crecimiento microalgal.

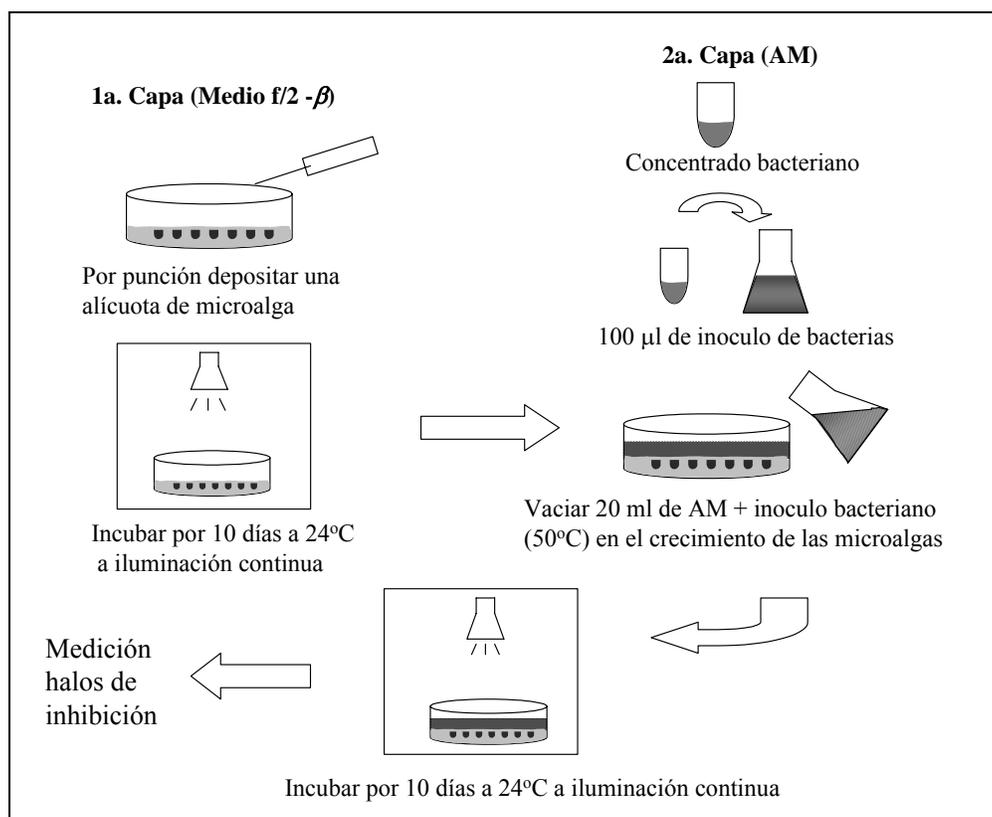


Figura 1. Esquema del proceso del método modificado de Doble Capa en placa (Dopazo *et al.*, 1988) para demostrar el efecto de inhibición de las bacterias por parte de las microalgas.

Se utilizaron 42 cepas de bacterias aisladas de los cultivos de microalgas y dos cepas patógenas de peces correspondientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, previamente

aisladas de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, durante una corrida de producción realizada en la UPIMA.

La segunda capa se formó de la siguiente manera: se sembraron las bacterias para obtener masa celular, la cual fue concentrada y lavada por centrifugación a 3700 rpm por 15 minutos a 4°C; el paquete celular se recuperó y se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica $DO = 0.1$ (10^8 UFC ml^{-1}) a 550 nm. De esta suspensión diluida, se tomó un inóculo de 100 μl y se suspendió en un matraz con 20 ml de AM al 0.7% de agar (previamente esterilizado en autoclave y enfriado a 50°C en un horno de vacío VWR 1680), una vez mezclado se vació en las 42 placas con crecimiento microalgal correspondientes a las bacterias.

Las placas fueron incubadas bajo las condiciones de cultivo de las microalgas y fueron revisadas periódicamente (de 10 a 15 días) midiendo el diámetro (mm) de los halos de inhibición (zona clara alrededor del crecimiento microalgal). En total, fueron dos placas inoculadas con las microalgas de estudio por una cepa de bacteria.

5.5 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas del género *Tetraselmis*

Para evaluar este efecto, fue a través de dos experimentos, el primero consistió del método modificado de discos en placa descrito por DeLucca y McCracken (1977) y el segundo fue por ensayos de crecimiento en cultivos cerrados en combinación con poblaciones de bacterias y microalgas.

En el primer método se evaluó el crecimiento algal en respuesta a la interacción con bacterias bajo condiciones controladas (Figura 2). Las microalgas se obtuvieron a partir del cultivo axénico en caldo $f/2-\beta$. De estos cultivos se tomaron alicuotas de 150 μl y se sembraron masivamente por estría en placas con medio $f/2-\beta$ divididas en cinco fracciones. En cada fracción se colocaron sobre el agar discos Whatman No. 1 (previamente esterilizados en un horno THELCO a 160 DM a 180°C por dos horas) conteniendo 5 μl de suspensión bacteriana (previamente sembrada y cosechada).

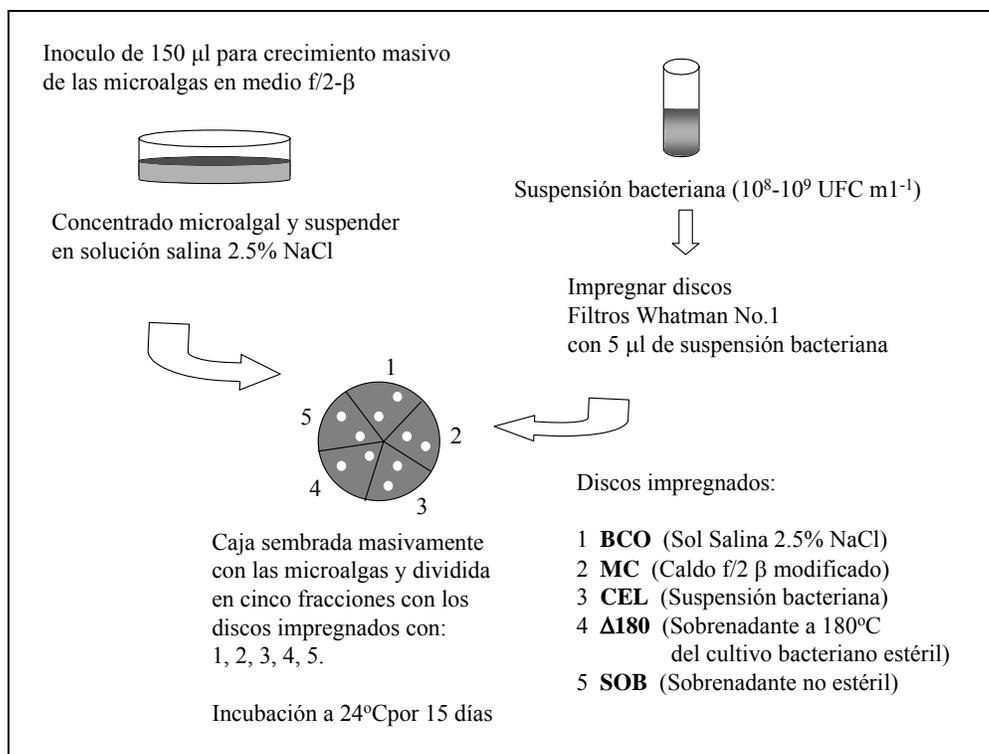


Figura 2. Esquemización del efecto de las bacterias sobre el crecimiento de microalgas por el método modificado de discos en placa (DeLucca y McCracken, 1977).

Se utilizaron 30 cepa de bacterias seleccionadas previamente como resistentes al crecimiento de las microalgas (bacterias que no formaron halos de inhibición en el experimento de Doble-Capa).

El inoculo de las cepas de bacterias fue estandarizado por el siguiente procedimiento: las bacterias fueron cultivadas en caldo marino para obtener biomasa bacteriana. Esta biomasa se concentró y se lavó (primera lavada) por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 10°C, el paquete celular se recuperó y fue diluido en solución salina al 2.5% de NaCl hasta que la suspensión alcanzó una DO de $1.0 = 10^8$ - 10^9 UFC m^{-1} analizada en un espectrofotometro (MERCK SQ118) a 550 nm.

A partir de esta suspensión celular bacteriana, se impregnaron discos con 5 µl de suspensión celular y se colocaron en la fracción etiquetada como (CEL) de la placa sembrada con las microalgas. El sobrenadante del cultivo bacteriano también se recuperó y se impregnaron los discos que fueron colocados en la segunda fracción etiquetada como (SOB). En la tercera fracción (ΔT) de igual forma se colocaron los discos impregnados con sobrenadante previamente esterilizado a 180°C por dos horas en un horno THELCO®. En la

cuarta y quinta fracción se colocaron discos impregnados con solución salina al 2.5% de NaCl (BCO) y con medio de cultivo de las bacterias (MC, caldo marino sin bacterias, esterilizado previamente a 115 lb por 15 min.) respectivamente.

Las placas fueron incubadas a 34°C con iluminación continua durante 15 días aproximadamente, haciendo observaciones periódicas (cada 7 días) hasta observar halos de inhibición o aumento en el crecimiento microalgal. La respuesta de este crecimiento se juzgo de acuerdo a los siguientes criterios: (a) exceso del crecimiento microalgal sobre o por debajo de los discos (+++); (b) formación de un anillo con el crecimiento microalgal alrededor de los discos (++); (c) escaso crecimiento microalgal sobre los discos (+). Los resultados se obtuvieron al comparar con los discos denotados como: BCO y MC.

El segundo experimento evaluó el rendimiento de las poblaciones bacterianas sobre las tasas de crecimiento de las poblaciones microalgales en cultivos estáticos, estos ensayos consistieron de unidades experimentales de microalgas axénicas y de bacterias cultivadas por separado (controles) y de la combinación de ambos organismos (tratamientos). Asimismo se determinó numéricamente la densidad celular de la microalga por la combinación de las poblaciones.

El cultivo se llevó a cabo en tubos de tapón de rosca con 7 ml de medio líquido f/2-β estéril, por triplicado para cada control y tratamiento.

A partir de cultivos axénicos de las microalgas en caldo f/2-β se obtuvo la biomasa celular (Bunt, 1968) por cada especie de microalga la cual varió, por lo tanto, la cantidad de inóculo de suspensiones celulares ajustadas a 10^5 células ml^{-1} para los tubos de cultivo fueron: para *T. apiculata*, 147 μl ; *Tetraselmis* sp. 316 μl ; *T. gracilis*, 167 μl ; *T. suecica*, 441 μl ; *T. tetrathele*, 141 μl ; *T. chuii*, 463 μl y para *T. striata*, fue de 220 μl . El inóculo se cuantificó por conteo de células previamente fijadas con formol al 4%, posteriormente se contó el número de células en una cámara de Neubauer (una profundidad, 0.100 mm; de superficie 0.0025 mm^2 ; un cubreobjetos, de 20 x 26 mm; y un grosor de 0.4-0.6 mm).

Se utilizaron 17 cepas de bacterias seleccionadas por su efecto positivo sobre el crecimiento de las microalgas (experimento anterior), las cuales fueron las siguientes: Tc3, Tc4, Tsue2, Tsue3, C7B1, C7H8, Tt1, Ta1, C8J1, Tt5, Tt4, Tc1, Tc5, Tc7, Tsue1, C7G6 y C8M2 (ver Tabla 1). Estas cepas se sembraron en AM incubadas a 30°C de 24-48 horas y a partir de estas, se obtuvo la masa celular suspendiéndola en solución salina al 2.5% NaCl

(estéril); posteriormente se lavaron las células por centrifugación a 3500 rpm por 15 min a 10°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se recuperó diluyéndolo también en solución salina hasta ajustar la DO_{550} a $1.0 = 10^8$ - 10^9 UFC m^{-1} . De esta suspensión bacteriana se tomaron 70 μ l y se inocularon los tubos de cultivo que contenían las microalgas.

Los tubos de cultivo se incubaron a 24°C en iluminación continua por 16 días. El crecimiento microalgal en presencia de las bacterias se evaluó a través de mediciones de densidad óptica (Sorokin, 1973). Con un espectrofotómetro (MERCK SQ118) a una absorbancia de 660 nm, tomando tres lecturas en cada tubo y como blanco se utilizó medio de cultivo estéril. Las mediciones se hicieron a una longitud de onda de 660 nm, para evitar los picos de absorción de la clorofila.

Al inicio y al final del experimento se determinó la presencia de bacterias viables de las unidades experimentales, tomando una alícuota y sembrando por estría en placas con AM incubadas a 30°C de 24 a 48 horas.

5.6 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de correlación simple para inferir la probable relación en el crecimiento de *Tetraselmis* sp. con respecto a las cepas bacterianas de diferentes morfologías asociadas a los cultivos microalgales en las columnas 7 y 8, con un nivel de significancia de 0.05 (Sokal y Rohlf, 1981).

Para probar el efecto de *Tetraselmis* sp. sobre las bacterias, a los datos se les probó normalidad y homocedasticidad, si cumplieron con esta regla se transformaron logarítmicamente y posteriormente se analizaron a través de una prueba no paramétrica por rangos “Kruskal-Wallis ANOVA (Sokal y Rohlf, 1981). Estimar a posteriori entre qué bacteria (s) existen las diferencias significativas que provocan rechazar la hipótesis nula de contraste de Kruskal-Wallis, por comparaciones múltiples no paramétricas (Zar, 1999). En ambas pruebas se utilizó un nivel de significancia de 0.05 (Zar, 1999). Para este análisis solamente se incluyeron los datos de las bacterias que cuando menos en dos replicas hayan formado halos (Jensen *et al.*, 1996). Así, se encontró que, dos cepas de bacterias quedaron fuera del análisis.

La cinética de crecimiento (cel ml⁻¹ dia⁻¹), tiempo de generación de las células (cel ml⁻¹ dia⁻¹) y número de generaciones por horas (cel ml⁻¹ horas⁻¹) de las microalgas, se obtuvieron de la biomasa microalgal (células ml⁻¹) de los cultivos axénicos de microalgas a los 16 días de cultivo; los cuales fueron ajustados a la forma integral de la ecuación logística (Krebs, 1985):

$$Nt = \frac{K}{1 + e^{a-rt}} \quad (1)$$

donde:

Nt = tamaño de población en el tiempo (células ml⁻¹)

K = asíntota superior o valor máximo del tamaño de la población

a = constante de integración que define la posición de la curva con relación a su origen (ordenada al origen)

r = índice de crecimiento de la población por individuo (pendiente de la curva de crecimiento)

t = tiempo (días)

Los valores medidos a 660 nm se convirtieron en número de células ml⁻¹ biomasa celular calculando las constantes de las curvas de crecimiento, la ordenada a , y la pendiente b , por el método de mínimos cuadrados (Zar, 1999).

En la cinética de crecimiento se calcularon de los controles de microalgas los días 1 y 16, utilizando la formula de Guillard (1973, 1975), transformando logaritmicamente en base dos de la densidad óptica, debido a la forma dominante de reproducción (asexual, por división binaria de la célula) de estos organismos (Fogg, 1975) :

$$\mu = \frac{\log_2(Nt_{t_1} - Nt_{t_0})}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

donde:

μ = tasa de crecimiento específica (velocidad de crecimiento)

Nt = tamaño de la población en el tiempo

Nt_{t_0} = densidad celular inicial

Nt_{t_1} = densidad celular final

Un parámetro constante importante en una población que esta creciendo exponencialmente es el tiempo de duplicación (o de generación, g) y otro parámetro de crecimiento es el número de generaciones (n) determinándose con los valores de la densidad celular, obtenidos de acuerdo a Guillard (1973, 1975); Stein (1973) y Mantell *et al.* (1985):

$$g = \frac{0.693}{\mu} \quad (3)$$

donde:

g = tiempo de generación (división/día)

μ = tasa de crecimiento

$$0.693 = \log_e(2.0)$$

$$n = \frac{t}{g} \quad (4)$$

donde:

n = número de generaciones por día

t = tiempo (días)

g = generaciones por día

Finalmente, el diseño experimental de la cinética implico específicamente de siete microalgas del género *Tetraselmis* con las 17 combinaciones de bacterias probadas. Por esta razón, se analizó por separado la producción celular obtenida al final del muestreo a través de un análisis de varianza de una vía, si los datos no cumplieron una distribución normal y homocedasticidad se transformaron logarítmicamente. Posteriormente, a través de la prueba de Tukey-HSD se comprobó e infirió cual de las combinaciones de bacterias tuvo un efecto positivo incrementando el crecimiento microalgal, en todos los casos se utilizó un nivel de significancia de 0.05 (Zar, 1999).

6 RESULTADOS

6.1 Aislamiento e identificación de bacterias

Se aislaron un total de 42 cepas de bacterias, de las cuales 20 corresponden a 6 cultivos de diferentes especies de microalgas del género *Tetraselmis* y el resto corresponden al cultivo de *Tetraselmis* sp. (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de cepas bacterias aisladas de los cultivos de microalgas marinas del género *Tetraselmis*.

Cultivo	Cepas aisladas (clave de clasificación)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Tsue1, Tsue2, Tsue3, Tsue4
<i>T. apiculata</i>	Ta1, Ta2
<i>T. tetrahele</i>	Ttet1, Ttet2, Ttet3, Ttet4, Ttet5, Ttet7
<i>T. chuii</i>	Tch1, Tch2, Tch3, Tch4, Tch5, Tch6, Tch7, Tch8
<i>T. gracilis</i>	*
<i>T. striata</i>	*
<i>Tetraselmis</i> sp.	M3, M4, C7A, C7B, C7C, C7D, C7E, C7F, C7G, C7H, C7I, C8J, C8K, C8L, C8M, C8N, C8P, C8Q, C8R, C8S, C8T, C8U

* = sin presencia de bacterias

A través de un análisis de correlación simple observamos que no hubo una correlación significativa ($p < 0.05$) del crecimiento microalgal de *Tetraselmis* sp. en la columna 7 con respecto a las cepas bacterianas (Tabla 4), pero las cepas C7A y C7B mostraron una tendencia positiva con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.275245 y 0.27726 respectivamente, como se muestra en la Figura 3.

Tabla 3. Correlación del crecimiento de *Tetraselmis* sp. con respecto al crecimiento bacteriano asociado al cultivo en la columna 7 durante 16 días de muestreo.

Clave	r^2	r	p
C7A *	0.275245	0.524638	0.147024
C7B *	0.27726	0.526555	.0145283
C7C	0.168973	0.411063	0.271723
C7D	0.023602	0.153628	0.693122
C7E	0.000070	-0.00838	0.982938
C7F	0.000005	-0.00229	0.99534
C7G	0.168164	-0.41008	0.272987
C7H	0.007	-0.08367	0.830549
C7I	0.000831	0.028825	0.941319

C7A y C7B* Cepa bacteriana significativa con respecto al crecimiento de *Tetraselmis* sp. de acuerdo al análisis de correlación simple. r^2 = coeficiente de determinación; r = coeficiente de regresión de Pearson; p = nivel de significancia de .05.

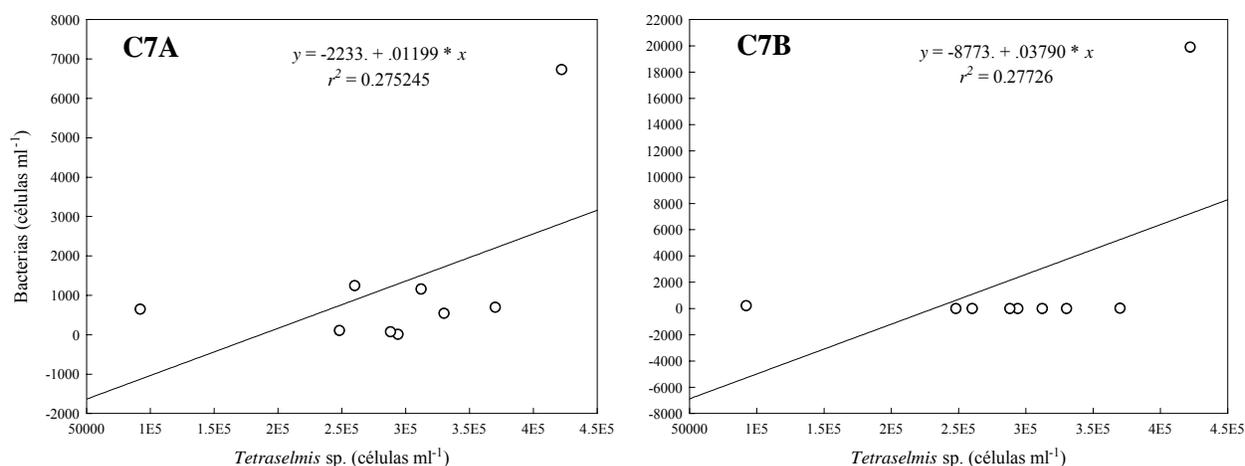


Figura 3. Correlación entre el crecimiento de *Tetraselmis* sp. y el crecimiento de las cepas bacterianas C7A y C7B asociadas al cultivo en la columna 7 durante 16 días de muestreo. La línea representa el mínimo cuadrado lineal en relación a los datos.

Las cepas bacterianas aisladas del cultivo de *Tetraselmis* sp. en la columna 8 durante 16 días de muestreo se analizaron por una correlación simple (Tabla 5), el cual indicó que ninguna se correlaciona significativamente ($p < 0.05$) con respecto al crecimiento microalgal, pero la bacteria C8Q tuvo una tendencia positiva con un coeficiente de determinación r^2 de 0.226232 (Figura 4).

Tabla 4. Correlación del crecimiento de *Tetraselmis* sp. con respecto al crecimiento bacteriano asociado al cultivo en la columna 8 durante 16 días de muestreo.

Clave	r^2	r	p
C8J	0.167045	0.408711	0.274748
C8K	0.186279	0.431601	0.246056
C8L	0.002983	-0.05462	0.889007
C8M	0.166109	0.407565	0.276229
C8N	0.166717	0.408309	0.275267
C8P	0.005118	-0.07154	0.854878
C8Q *	0.226232	0.475639	0.195628
C8R	0.05082	0.225433	0.559759
C8S	0.010065	0.100327	0.797323
C8T	0.002948	-0.05429	0.889665
C8U	0.018224	0.134997	0.729128

C8Q* Cepa bacteriana significativa con respecto al crecimiento de *Tetraselmis* sp. de acuerdo al análisis de correlación simple. r^2 = coeficiente de determinación; r = coeficiente de correlación; p = nivel de significancia de .05.

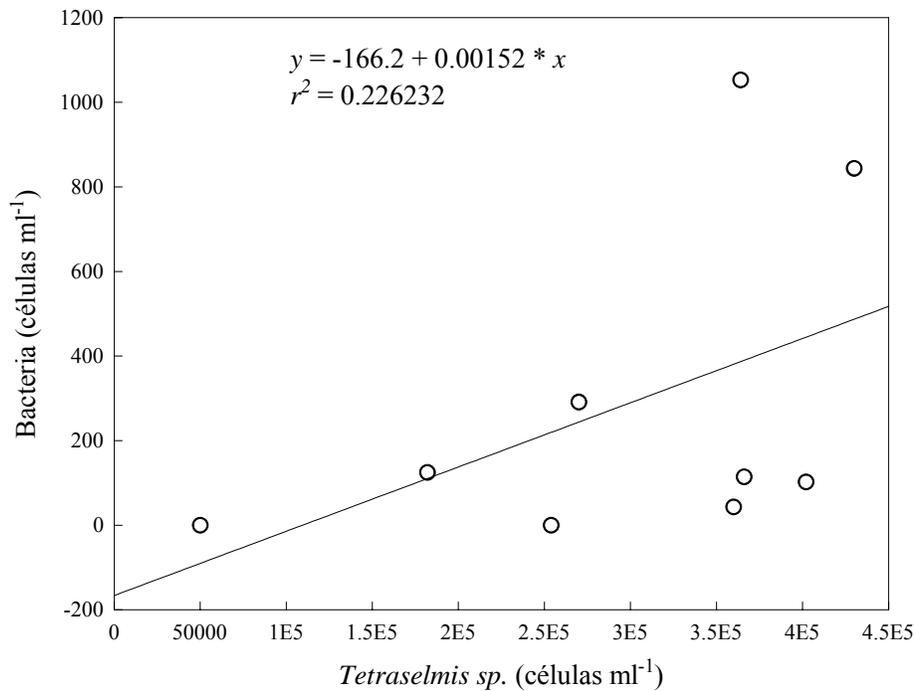


Figura 4. Correlación entre el crecimiento de *Tetraselmis* sp. y el crecimiento de la cepa bacteriana C8Q asociada al cultivo en la columna 8 durante 16 días de muestreo. La línea representa el mínimo cuadrado lineal en relación a los datos.

El 97% de las bacterias fueron Gram negativas y el 3% fueron Gram positivas, de ellas, el 76% fueron caracterizadas como bacilos, 16.6% como pleomórficas y 7% como cocobacilos (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización morfológica e identificación bioquímica de las cepas de bacterias aisladas de los siete tipos de microalgas marinas del género *Tetraselmis*.

Clave	Morfología Celular	Gram	Catalasa	Oxidasa	BIOLOG®	
T sue1	Cocobacilo	-	+	-	<i>Variovorax paradoxus</i>	
T sue2	Bacilos	-	+	+		N. id.
T sue3	Bacilos	-	+	+		N. id.
T sue4	Bacilos	-	+	+		N. id.
T a1	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T a2	Bacilos	+	+	+	N. id.	
T tet1	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T tet2	Bacilos	-	+	-	N. id.	
T tet3	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T tet4	Bacilos	-	+	-	<i>Burkholderia cocovenneas</i>	
T tet5	Bacilos	-	+	+		N. id.
T tet7	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c1	Bacilos	-	+	+	<i>Photobacterium logei</i>	
T c2	Bacilos	-	+	+		N. id.
T c3	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c4	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c5	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c6	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c7	Bacilos	-	+	+	N. id.	
T c8	Pleomorfica	-	+	+	N. id.	
M3	Bacilos	-	+	+	N. id.	
M4	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C7A	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C7B	Bacilos	-	+	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
C7C	Bacilos	-	+	+		<i>Francisella philomiragia</i>
C7D	Pleomorfica	-	+	+/-	N. id.	
C7E	Pleomorfica	-	-	+/-	N. id.	
C7F	Pleomorfica	-	+	-	N. id.	
C7G	Bacilos	-	-	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>	
C7H	Bacilos	-	+	+		<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i>
C7I	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C8J	Pleomorfica	-	+	+	N. id.	
C8K	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C8L	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C8M	Cocobacilos	-	+	+	N. id.	
C8N	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C8P	Bacilos	-	-	+	N. id.	
C8Q	Bacilos	-	+	+	N. id.	
C8R	Pleomorfica	-	+	+	<i>Photobacterium logei</i>	
C8S	Cocobacilos	-	+	-	N. id.	
C8T	Pleomorfica	-	+	+	<i>Actinobacter johnsonii</i>	
C8U	Bacilos	-	+	+	N. id.	

N. id. = No identificadas a través del BIOLOG®, + = reacción positiva, - = reacción negativa, +/- = reacción dudosa o intermedia

BIOLOG® = Software para la identificación de bacterias Gram positiva y Gram negativas.

Los resultados de la caracterización bioquímica fueron: 93% catalasa positiva y el 7% catalasa negativa; en la prueba de oxidasa el 12% fueron oxidasa negativa y el resto (88%) fueron oxidasa positiva. Todas las cepas bacterianas fueron analizadas a través del sistema BIOLOG[®], pero solo se identificó al 11% de las cepas bacterianas: C8R-*Photobacterium logei*; Tsue1-*Variovorax paradoxus*; Ttet4-*Burkholderia cocovenenas*; C7B-*Pseudomonas stutzeri*; C7C-*Francisella philomiragia*; C7G-*Vibrio alginolyticus*; C7H-*Sphingomonas macrogoltabidus* y C8T-*Acinetobacter johnsonii*.

Del resto de las cepas que no fueron identificadas a través de este sistema, 16 fueron enviadas para su identificación a la Universidad de Tasmania, Australia (School of Agricultural Science & Tasmanian Institute of Agricultural Research University of Tasmania) con el Dr. John Bowman, quien las identificó molecularmente amplificando y secuenciando una región variable del gen 16S rDNA. Las cepas identificadas tienen afinidad cercana a la subdivisión gama de la Clase *Proteobacteria* y a la subdivisión alfa de la Clase *Paracoccus* (Tabla 6).

Tabla 6. Lista de cepas bacterianas identificadas molecularmente amplificando y secuenciando el gen 16S rDNA.

Cepas	Especies cercanas
Tsue1	<i>Marinobacter aquaeolei</i>
M3	<i>M. aquaeolei</i>
M4	<i>M. aquaeolei</i>
Tc5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
C7B1	<i>P. stutzeri</i>
Tt4	<i>Idiomarina abyssalis</i>
C8J1	<i>I. abyssalis</i>
C7G6	<i>I. abyssalis</i>
C8M1	<i>Vibrio halioticoli</i>
Tt1	<i>Alteromonas macleodii</i>
Tc3	<i>Halomonas variabiis</i>
Tc7	<i>H. variabiis</i>
Tsue2	<i>H. variabiis</i>
Tc1	<i>H. variabiis</i>
C7H8	<i>H. nitritophilus</i>
Tc2	<i>Paracoccus marcusii</i> *

* subdivisión alfa de *Paracoccus*, el resto de las bacterias pertenece a la subdivisión gama de *Proteobacteria*.

6.2 Cepas axénicas de microalgas

Se axenizaron las microalgas de estudio (Figura 5), en el caso de *T. gracilis* y *T. striata*, sus cultivos no revelaron presencia de bacterias al hacerse una cuenta viable en agar marino (AM). La Figura 5, muestra las microalgas marinas axénicas, pertenecientes a la clase Chlorophytas, son flageladas de color verde oliva, observadas con un microscopio de contraste de fases.

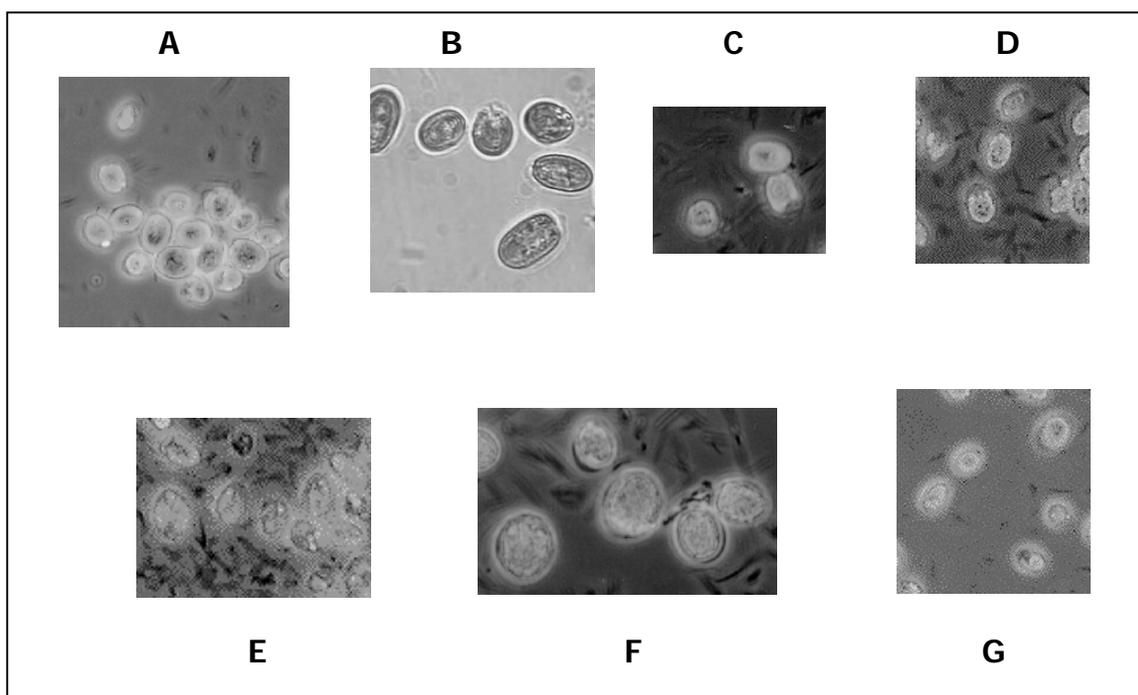


Figura 5. Microalgas marinas axénicas del género *Tetraselmis*, observadas con un microscopio de contraste de fases a 100x con aceite de inmersión. A) *T. apiculata* 2562; B) *T. suecica* 2262; C) *T. chuii* 232; D) *T. gracilis* 2563; E) *T. striata* 2565; G) *T. tetrathele* 557; F) *Tetraselmis* sp.

6.3 Efecto de las microalgas sobre el crecimiento de las bacterias asociadas

Resultados de la técnica de difusión en placa por la formación de halos de inhibición debido al efecto del crecimiento microalgal sobre el bacteriano, revelaron efectos negativos o de inhibición del crecimiento bacteriano.

De las 42 cepas de bacterias de prueba, solamente 13 cepas tuvieron efecto negativo mostrando ser sensibles al crecimiento de las microalgas del género de *Tetraselmis* (Tabla 7), las cepas, Tsue4, Tt1, C7F5 y C8P3 no se les probó este efecto. *Tetraselmis suecica*, *T. chuii*, *T. striata*, *T. tetrathele*, *T. apiculata* inhibieron el crecimiento bacteriano a través de la formación de halos de inhibición, con un promedio de halo de >30 mm de diámetro. Las bacterias *Burkholderia cocvenenans* / *Idiomarina abyssalis* y C7E3 no fueron inhibidas por las microalgas ya que no formaron halos excepto con *T. striata*, los halos tuvieron un diámetro promedio de 7 mm.

Se observó que no todas las microalgas tuvieron el mismo efecto negativo o de inhibición sobre el crecimiento bacteriano, rechazando la hipótesis nula para cada especie de microalga. De acuerdo al análisis de Comparación Múltiple no paramétrica, la diferencia significativa ($p < 0.05$) se vio reflejada como se muestra en la Tabla 8, donde esas bacterias fueron afectadas negativamente en su crecimiento en presencia de las microalgas y el resto de las bacterias no presentaron diferencia significativa en su crecimiento.

Tabla 8. Inhibición significativa del crecimiento de las bacterias por diferentes especies de microalgas marinas.

Microalga	Bacterias inhibidas*
<i>Tetraselmis</i> sp.	Tc1, C7D7, C8N1, C8T6, Tt3
<i>T. suecica</i>	C8L0, C8K0, C8N1, Ai302
<i>T. gracilis</i>	C8N1, Tc1, C7D7, C7E3
<i>T. striata</i>	C8L0, C8K0
<i>T. chuii</i>	C8K0, C8L0, C8N1, C7D7, Tc1
<i>T. apiculata</i>	C8T6, C7E3, C8N1, Tc1
<i>T. tetrathele</i>	C8N1, C7E3, C8T6, C7D7, Tc1

De acuerdo a Comparación Múltiple No Paramétrica (Zar, 1996), $Q_{(0.05, 12)} = 3.368$.

* Ver Tabla 1 para la cepa identificada, siendo las que tuvieron efectos de inhibición significativos.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de microalgas del género *Tetraselmis* sobre el crecimiento de bacterias marinas, formando halos de inhibición.

Bacterias	Diámetro de los halos (mm)						
	<i>Tetraselmis</i> sp	<i>T. apiculata</i>	<i>T. chuii</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>T. striata</i>	<i>T. suecica</i>	<i>T. tetrahele</i>
<i>Burkholderia cocovenenans</i> (Tt4) / <i>Idiomarina abyssalis</i> *	-	-	-	-	+	-	-
<i>Photobacterium logei</i> (Tc1) / <i>Halomonas variabiis</i> *	++	+	++++	++	++	+	++
Tt3 **	++	+	+++	+	++	+	+
C7A1 **	+	+	++	+	+	+	+
C7D7 **	+	+	++++	+	++	HND	+
C7E3 **	-	-	-	-	+	-	-
C7I8 **	+	++++	-	+	-	-	++++
C8L0 **	+	+	++++	+	++++	++++	+
C8K0 **	+	+	+++	+	+++	++++	+
C8N1 **	+	++++	++++	++++	++	++++	++++
<i>Actinobacter johnsonii</i> (C8T6)	++	++	++	++	++	+	++
<i>Photobacterium logei</i> (C8R3)	+	+	++	+	++	+	+
<i>Aeromonas ichtiosmia</i> 302	-	-	++	-	++	++++	-

Los signos (+ y -) se refiere al diámetro de la zona de inhibición medida en milímetros.

El signo (-) indica no actividad, (+) = actividad ≤ 10 mm, ++ = $> 11 \leq 20$ mm, +++ = $> 21 \leq 30$ mm, ++++ = ≥ 30 mm.

Kruskal-Wallis $Q_{(0.05, 12)}=3.368$.

HND=halo no definido.

* = cepas de bacteria identificadas molecularmente.

** = cepas de bacterias no identificadas.

Una muestra de la inhibición del crecimiento bacteriano se observa en la Figura 6, donde *Tetraselmis chuii*, *T. striata* y *T. suecica* inhibió a la cepa *Aeromonas johnsonii* formando halos de diferentes tamaños 17 mm, 12 mm y 4 mm, respectivamente.

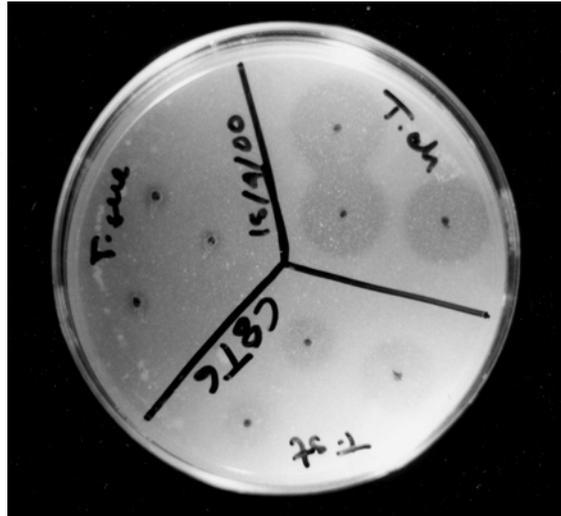


Figura 6. Inhibición del crecimiento de la cepa *Aeromonas johnsonii* (C8T6) por la microalga *Tetraselmis chuii* (T.ch), a través de la formación de halos (zona clara alrededor del crecimiento microalgal) de un diámetro de 17 mm, en *T. suecica* (T.sue) de 12 mm y en *T. striata* (T.st) un diámetro de 4 mm.

6.4 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas

Las bacterias que resultaron ser resistentes a la actividad bactericida de las microalgas, en el ensayo de difusión de discos promovieron el crecimiento de las microalgas como se muestran en la Tabla 9, la cual nos revela que las interacciones entre las microalgas y bacterias pueden ser positivas, dependiendo de las condiciones de cultivo. Ese efecto se vio reflejado en el crecimiento de las colonias microalgales sobre los discos, siendo más grandes que las del resto de la placa.

Tabla 9. Descripción cualitativa del efecto de bacterias (en discos impregnados de suspensión celular y sobrenadante) sobre el crecimiento de las siete microalgas del género *Tetraselmis*.

Bacteria	<i>Tetraselmis</i>		<i>T. striata</i>		<i>T. gracilis</i>		<i>T. apiculata</i>		<i>T. tetraathele</i>		<i>T. suecica</i>		<i>T. chuii</i>	
	CC	Sob	CC	Sob	CC	Sob	CC	Sob	CC	Sob	CC	Sob	CC	Sob
Tt1	+++	+	+++	+	+	+	-	-	-	-	++	+	+	-
Tt4	++	+	++	+	++	+	+++	+++	+	-	+++	+++	++	+
Tt5	+++	++	+	+	-	-	+++	+	-	-	+++	++	++	++
Tt7	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
Ta1	++	+	+++	-	-	-	++	++	+	-	+++	++	++	+
Tsue1	+++	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+++	+	+	+/-
Tsue2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
Tsue3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tc1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tc2	+	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Tc3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tc4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tc5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
Tc7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C7B1	+++	++	+++	+	+	+	+	+	+	-	+++	++	+++	++
C7C2	+++	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7G6	+++	+++	++	++	+	+	++	++	-	-	++	+	+++	+++
C7H8	++	+	+++	-	++	-	+++	+	+++	+/-	+++	-	+++	+
C8J1	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++
C8M2	-	+	++	+	+	-	+++	-	+	-	+++	+	+	+
C8S4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

CC = Tratamiento de Concentrado Celular bacteriano, Sob = Tratamiento de Sobrenadante celular bacteriano.

- = no crecimiento de microalgas marinas en el disco.

+ = crecimiento de microalgas por debajo del disco

++ = crecimiento de microalgas por debajo del disco y sobre el disco.

+++ = crecimiento de microalgas por debajo del disco, sobre y periferia del disco.

+/- = efecto en el crecimiento microalgal no definido.

Las letras en negritas = presentan a las bacterias que tuvieron un efecto positivo altamente significativo en el crecimiento de las 7 especies de *Tetraselmis*.

Los discos impregnados con medio de cultivo enriquecido usados como control no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento microalgal y por lo tanto son datos que no se presentaron en la Tabla 9, solamente se presentaron aquellos que tuvieron efectos positivos por lo menos en algún tratamiento, como fueron los casos de concentrado celular y sobrenadante. Las bacterias que tuvieron efecto (por debajo, sobre y periferia del disco) fueron 17 cepas, cabe aclarar que Tt4 (*Idiomarina abyssalis*) se considero porque fue resistente a todas las microalgas excepto a *T. gracilis*. Las cepas *Idiomarina abyssalis* (Tt4, C7G6, C8J1) fue más evidente su efecto positivo sobre las microalgas y las cepas Tt7,

C8S4, *Paracoccus marcusii* (Tc2) y C7C2 no estimularon el crecimiento de las microalgas, ya que no hubo crecimiento en los discos impregnados con las bacterias, aunque en el medio sólido si hubo crecimiento por parte de las microalgas. La cepa C7C2 presento una marcada estimulación en *Tetraselmis* sp.; sin embargo, en el resto su efecto fue negativo.

El efecto de estimular y/o inhibir el crecimiento microalgal se muestra en la Figura 7, los discos con crecimiento microalgal (color oscuro) están impregnados de concentrado y sobrenadante bacteriano, en los discos de color claro no causaron efecto en el crecimiento microalgal.

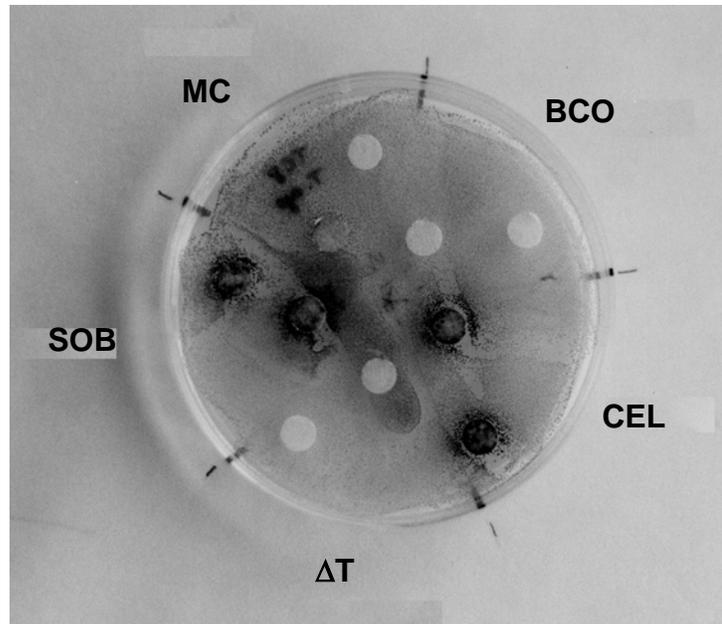


Figura 7. Discos en placa (DeLuca y McCracken, 1977). Discos de color oscuro tuvieron excesivo crecimiento microalgal de *Tetraselmis apiculata* debido a la impregnación con suspensión bacteriana y sobrenadante (CEL y SOB, respectivamente) de la cepa Tc8. En las fracciones de MC (medio de cultivo), BCO (solución salina 2.5% NaCl), ΔT (discos impregnados con sobrenadante bacteriano a 180°C) no influyeron en el crecimiento de la microalga.

De acuerdo al experimento del rendimiento de las poblaciones bacterianas sobre las tasas de crecimiento de las poblaciones microalgales en cultivos estáticos; los datos de las tasas de crecimiento (cel ml⁻¹ día⁻¹), tiempo de generación (día⁻¹) y número de

generaciones (día^{-1}) de las células previamente fueron ajustados a un modelo de crecimiento exponencial (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de crecimiento, tiempo de generación y número de generaciones por día en un cultivo estático de microalgas axénicas del género *Tetraselmis*.

Cepa	(K) [cel ml ⁻¹ día ⁻¹]	(g) (día ⁻¹) [hora ⁻¹]	Ng (día ⁻¹)	Producción media [cel ml ⁻¹]
<i>Tetraselmis</i> sp.	2.245	0.308 [7.40]	48.7	1854747
<i>T. striata</i>	2.214	0.312 [7.51]	48.0	1808334
<i>T. suecica</i>	1.306	0.530 [12.73]	28.3	1364171
<i>T. gracilis</i>	2.283	0.303 [7.282]	49.5	1839775
<i>T. chuii</i>	1.121	0.617 [14.82]	24.3	1306280
<i>T. tetrahele</i>	1.762	0.393 [9.43]	38.0	2102280
<i>T. apiculata</i>	2.309	0.300 [7.20]	50.0	2184625

K = Tasa de crecimiento.

g = Tiempo de generación (divisiones/hora).

Ng = Número de generaciones por día.

Media = Promedio de la producción celular.

Tetraselmis apiculata, *T. gracilis*, *Tetraselmis* sp. y *T. striata*, presentaron tasas de crecimiento altas, 2.309, 2.283, 2.245 y 2.214 cel ml⁻¹ día⁻¹ respectivamente; así como también altas generaciones por hora, 50, 49.5, 48.7 y 48 respectivamente. El tiempo de generación más largo lo presentó *T. chuii* (14.82 h⁻¹) y *T. suecica* (12.73 h⁻¹) (Tabla 10).

El análisis de variancia indico diferencia significativa ($p < 0.05$) en la biomasa de cada cultivo axénico de microalgas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de variancia de una vía de la biomasa celular de microalgas axénicas

Fuente Variación	g. l.	S. C.	C. M.	F	p (<0.05)
No. Celular Microalgas	6	4 E + 12	6.7 E + 11	49.81921	1.1 E - 15

g.l. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; C.M. = cuadrado medio; F = valor de tablas; p (<0.05) = nivel de significancia.

De acuerdo a su tasa de crecimiento la prueba de Tukey-HSD (Figura 8), revelo tres grupos de microalgas axénicas: I, constituido por *T. apiculata* y *T. tetrahele* con una producción máxima de 2.2 y 2.1 · 10⁶ cel ml⁻¹ respectivamente; II, formado por *Tetraselmis* sp., *T. gracilis* y *T. striata* con un intervalo de producción entre 1.9 y 1.8 · 10⁶ cel ml⁻¹, y

un grupo III con menor producción formado por *T. suecica* ($1.4 \cdot 10^6$ cel ml^{-1}) y *T. chuii* ($1.3 \cdot 10^6$ cel ml^{-1}).

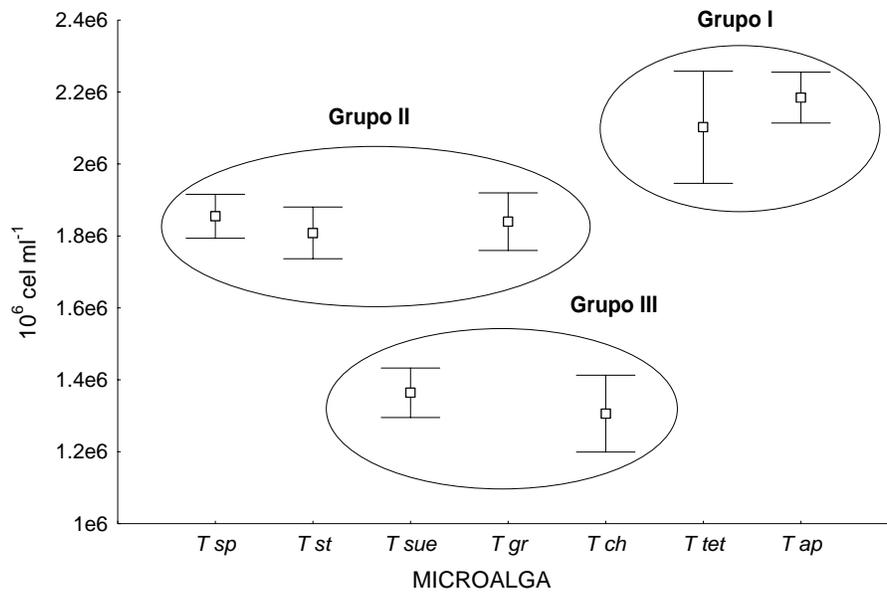


Figura 8. Agrupamiento de las siete microalgas marinas axénicas del género *Tetraselmis*, de acuerdo a su producción celular (cel ml^{-1}). Grupo I, formado por *T. apiculata* y *T. tetrethele*; grupo II, formado por *Tetraselmis* sp., *T. gracilis* y *T. striata*, y grupo III, por *T. suecica* y *T. chuii*.

El análisis de variancia reveló diferencia significativa ($p < 0.05$) en los cultivos de los siete tipos de microalgas del género *Tetraselmis* en combinación con 17 bacterias (Tabla 12).

Las curvas de crecimiento de las siete microalgas con 17 combinaciones de bacterias (previamente seleccionadas del ensayo anterior) mostraron el comportamiento de las microalgas cuando las bacterias estuvieron presentes. En las Figuras 9-15 se observan las curvas que mostraron un crecimiento mayor, menor y similar al control. Estadísticamente (análisis de variancia y prueba de Tukey-HSD) las siete microalgas con las 17 combinaciones de bacterias indicaron diferencia significativa ($p < 0.05$) como se muestra en la Tabla 12, incluyendo las combinaciones que tuvieron un comportamiento mayor, menor e igual al control.

Tabla 12. Análisis de variancia de una vía en combinaciones de 7 tipos de microalgas del género *Tetraselmis* con 17 bacterias.

Fuente Variación	g. l.	S. C.	C. M.	F	p (<0.05)
<i>Tetraselmis</i> sp.	17	3.5 E + 11	2 E + 10	6.116243	1.5 E - 06
<i>T. striata</i>	17	9.2 E + 11	5.4 E + 10	18.38983	1.5 E - 13
<i>T. suecica</i>	17	8.3 E + 11	4.9 E + 10	8.247084	3 E - 08
<i>T. gracilis</i>	17	4.1 E + 12	8.3 E + 10	10.63379	8.2 E - 10
<i>T. chuii</i>	17	5.9 E + 11	3.5 E + 10	6.220962	1.2 E - 06
<i>T. tetraathele</i>	17	1.5 E + 12	8.9 E + 10	6.541812	6.5 E - 07
<i>T. apiculata</i>	17	1.5 E + 12	8.6 E + 10	15.0226	4 E - 12

g.l. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; C.M. = cuadrado medio; F = valor de tablas; p (<0.05) = nivel de significancia.

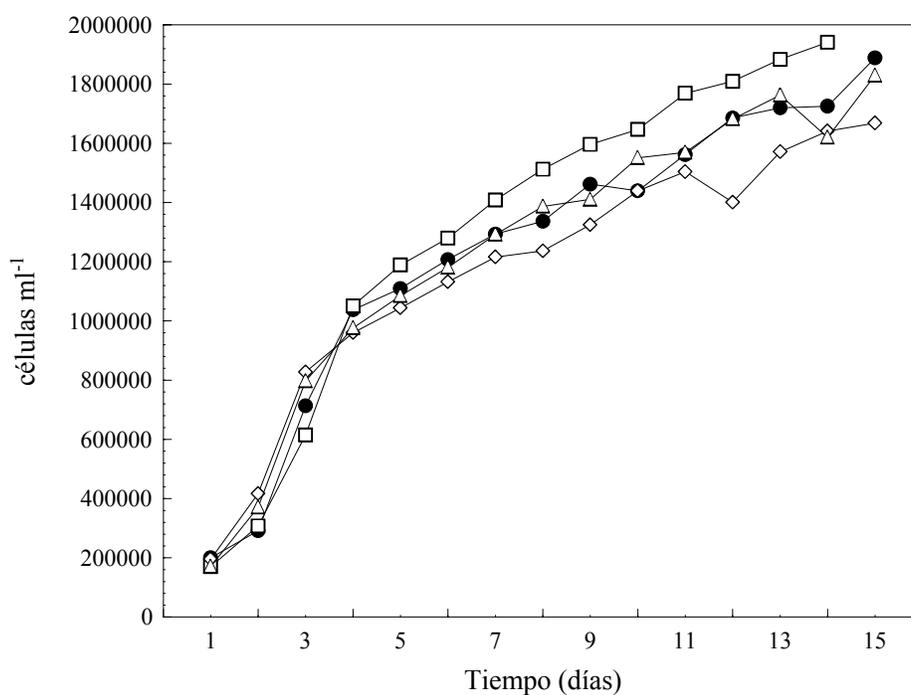


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis* sp. MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/*Idiomarina abyssalis* (C8J1 —□—), MA/*Marinobacter aquaeolei* (Tsue1 —△—), MA/*I. abyssalis* (Tt4 —◇—).

Los resultados del cultivo de *Tetraselmis* sp. y la interacción con bacterias (Figura 9) indicaron que hasta el tercer día de incubación el crecimiento de los cultivos fue paralelo. Posteriormente a este período, la interacción con *Idiomarina abyssalis* (C8J1) dio lugar a un crecimiento máximo de $2 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} y con *I. abyssalis* (Tt4) dio lugar a un crecimiento mínimo de $1.6 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . Un crecimiento intermedio o similar al cultivo axénico fue alcanzado cuando *Tetraselmis* sp. (control) fue cultivada con *Marinobacter aquaeolei* (Tsue1) alcanzando una producción de $1.8 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} .

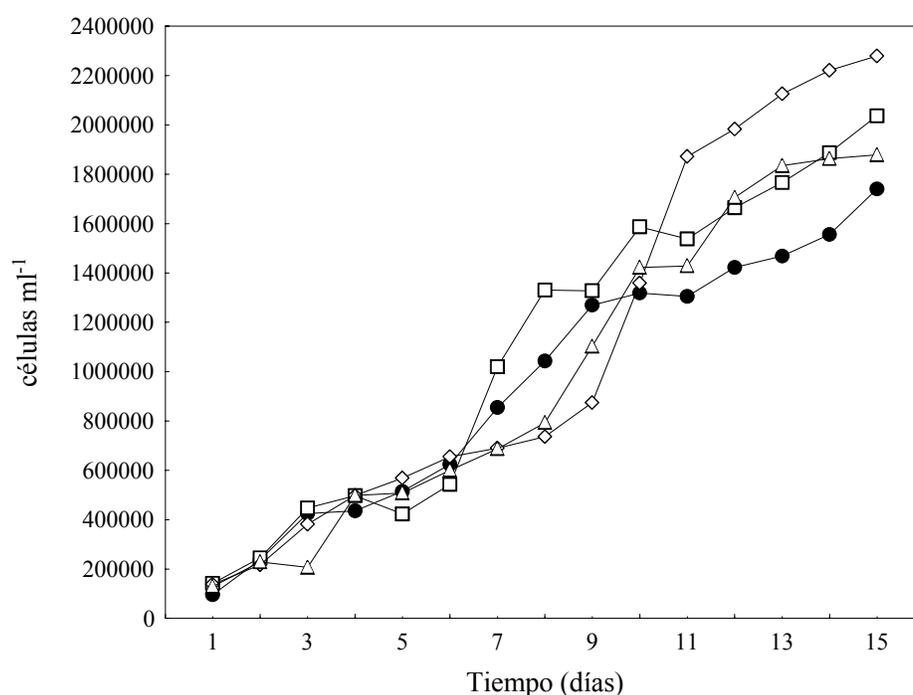


Figura 10. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis striata*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/*I. abyssalis* (C7G6 —◆—), MA/Tt5 (—□—), MA/C8M2 (—△—).

La Figura 10, muestra que hasta el sexto día el crecimiento de *Tetraselmis striata* con bacterias mantuvo un comportamiento paralelo al control. Posteriormente el cultivo que interacciona con *I. abyssalis* (C7G6) alcanza una producción de $2.2 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , mientras que el control junto con C8M2 alcanzaron solamente una producción de $1.8 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} .

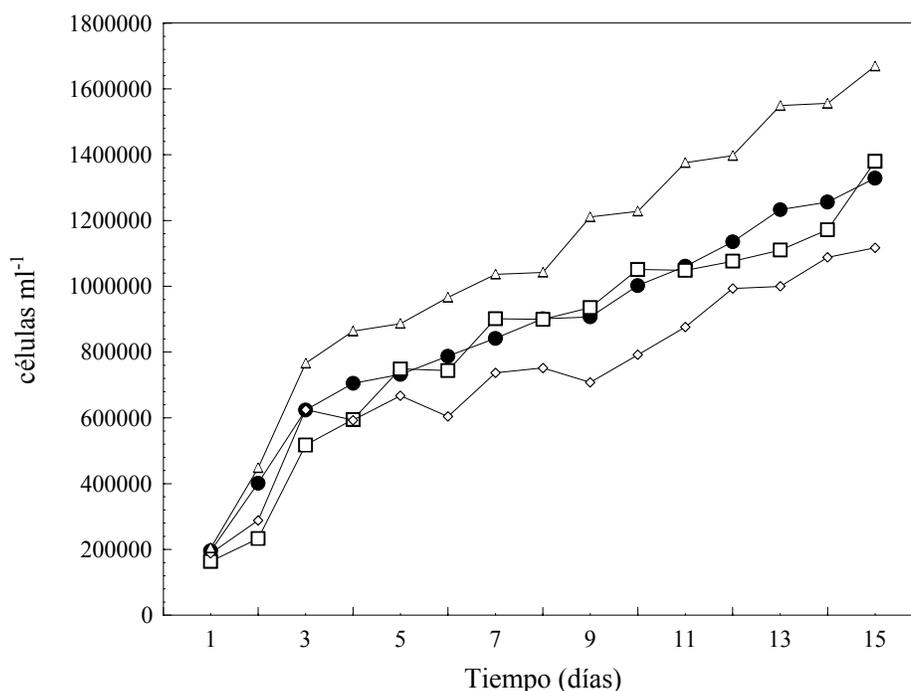


Figura 11. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/ *Halomonas variabiis* (Tc7 —△—), MA/Tt4 (—◇—), MA/Tt5(—□—).

Las curvas del crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* en combinación con las 17 bacterias, difirieron significativamente ($p < 0.05$). Las combinaciones que resultaron representativas del efecto mayor, menor e igual al control, se muestran en la Figura 11, donde *Halomonas variabiis* (Tc7), *I. abyssalis* (Tt4) interaccionan con la microalga dando lugar a una producción de biomasa máxima y mínima de $1.7 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} y $1.1 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , respectivamente. Como efecto intermedio la interacción con la cepa Tt5 dio lugar a una producción de $1.3 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} similar al control. De acuerdo a la prueba de Tukey-HSD, las combinaciones que mostraron diferencia significativa con respecto al blanco fueron (Tc7, Tc1 y Tt4).

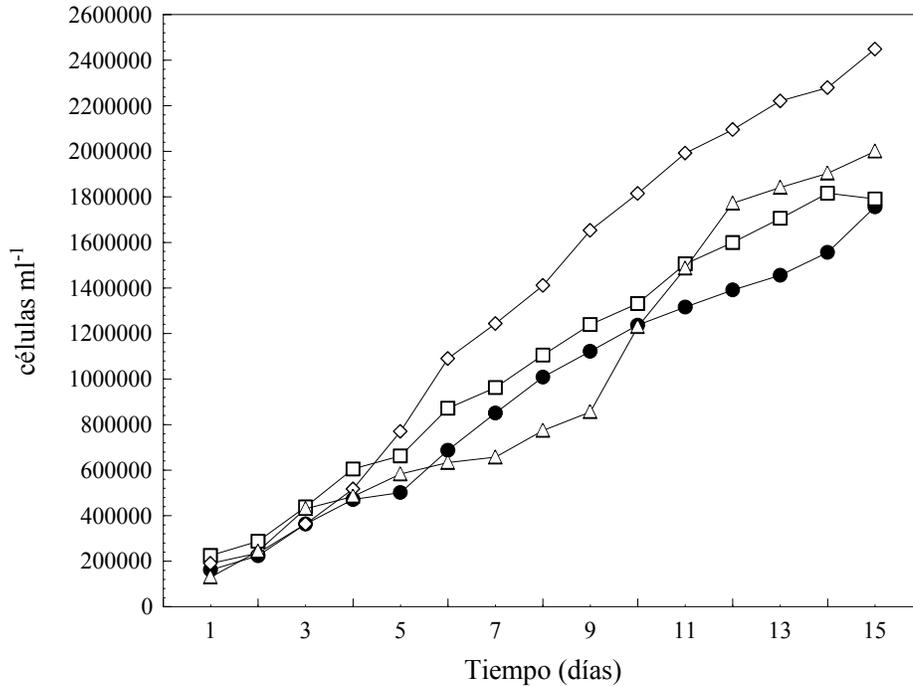


Figura 12. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis gracilis*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/*Halomonas nitritophilus* (C7H8 —◇—), MA/*Pseudomonas stutzeri* (C7B1 —□—), MA/*Marinobacter aquaeolei* (Tsue1 —△—).

La Figura 12 muestra el crecimiento de *Tetraselmis gracilis* en interacción con las bacterias que estimularon o inhibieron el crecimiento de la microalga. La interacción con *Halomonas nitritophilus* (C7H8) dio lugar a una producción de $2.5 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , mientras que la interacción con *Pseudomonas stutzeri* (C7B1) así como el cultivo axénico de la microalga alcanzaron una producción de $1.8 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . La interacción con las tres bacterias fue positiva excepto con *Marinobacter aquaeolei* (Tsue1), que en el período del sexto al décimo día de muestreo dio lugar a un crecimiento por debajo del control ($8 \cdot 10^5$ cel ml^{-1}).

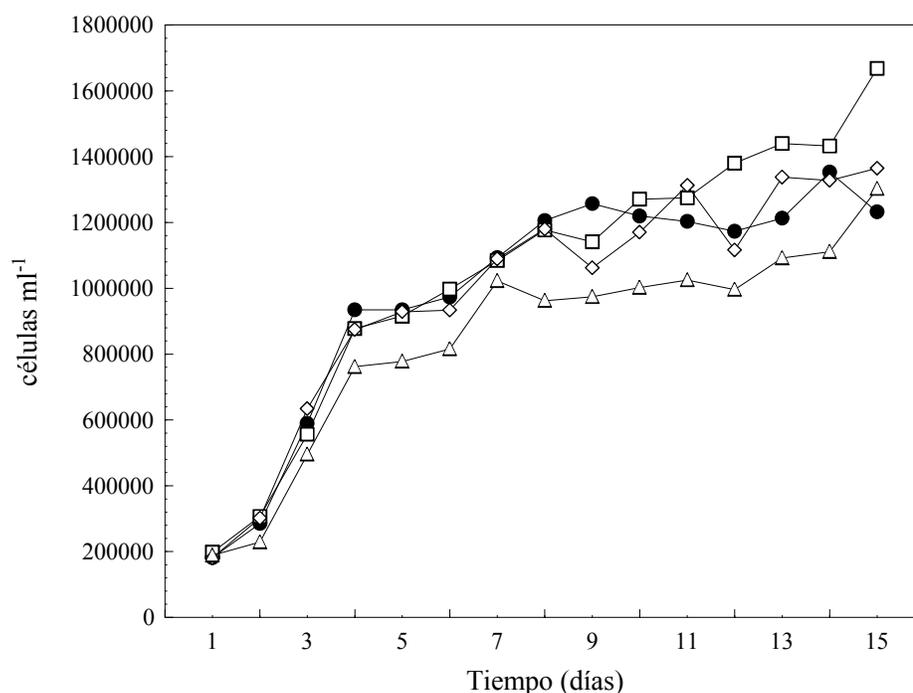


Figura 13. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis chuii*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/*Halomonas variabilis* (Tc1 —□—), MA/C8M2 (—△—), MA/*Pseudomonas stutzeri* (Tc5 —◇—).

La interacción de *Tetraselmis chuii* con las bacterias dio lugar a un crecimiento menor (Figura 13) excepto para *H. variabilis* (Tc1), la cual en los últimos 5 días de muestreo presentó una interacción negativa, observándose una máxima producción de $1.7 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹. La interacción con C8M2 durante todo el muestreo dio lugar a un crecimiento menor al control ($1 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹), con excepción del último día, donde junto con el blanco y *P. stutzeri* (Tc5) contribuyeron a incrementar la producción de microalga a $1.2 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹.

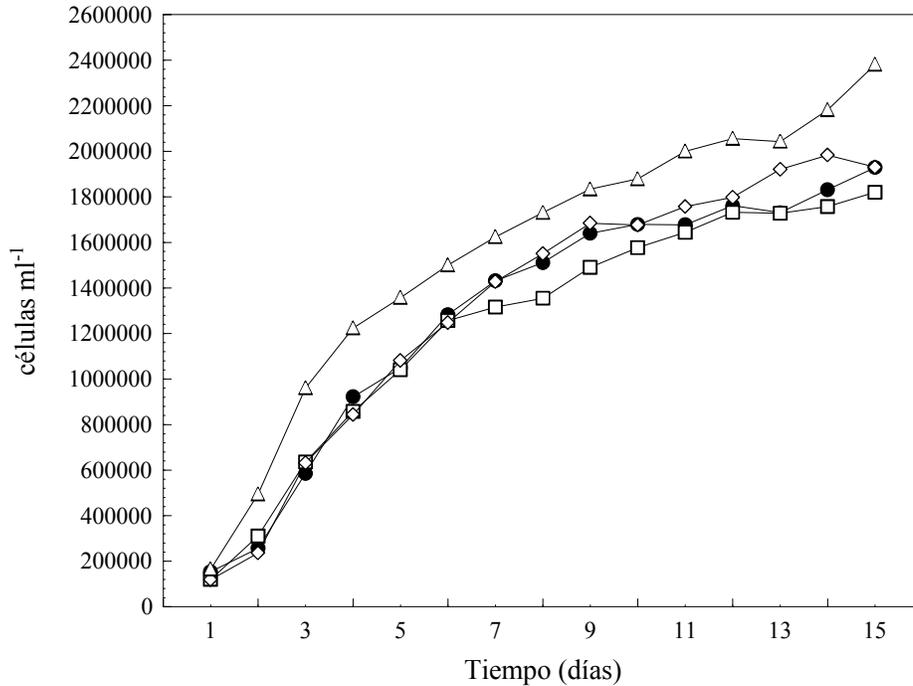


Figura 14. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis tetrathele*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas MA/*Halomonas variabiis* (Tc7 —△—), MA/*Alteromonas macleodii* (Tt1 —□—), MA/Tt5 (—◇—).

Las curvas de crecimiento de *T. tetrathele* y la interacción con bacterias (Figura 14), muestra que la interacción con *Halomonas variabiis* da lugar a un crecimiento mayor de $2.4 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , mientras que *Alteromonas macleodii* permite un crecimiento por debajo del control ($1.8 \cdot 10^6$ cel ml^{-1}). La interacción con Tt5 dio lugar a un incremento similar al blanco alcanzando una producción de $1.9 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . Solamente en los primeros seis días de muestreo estas dos últimas interacciones permitieron un crecimiento paralelo al control ($1.2 \cdot 10^6$ cel ml^{-1}).

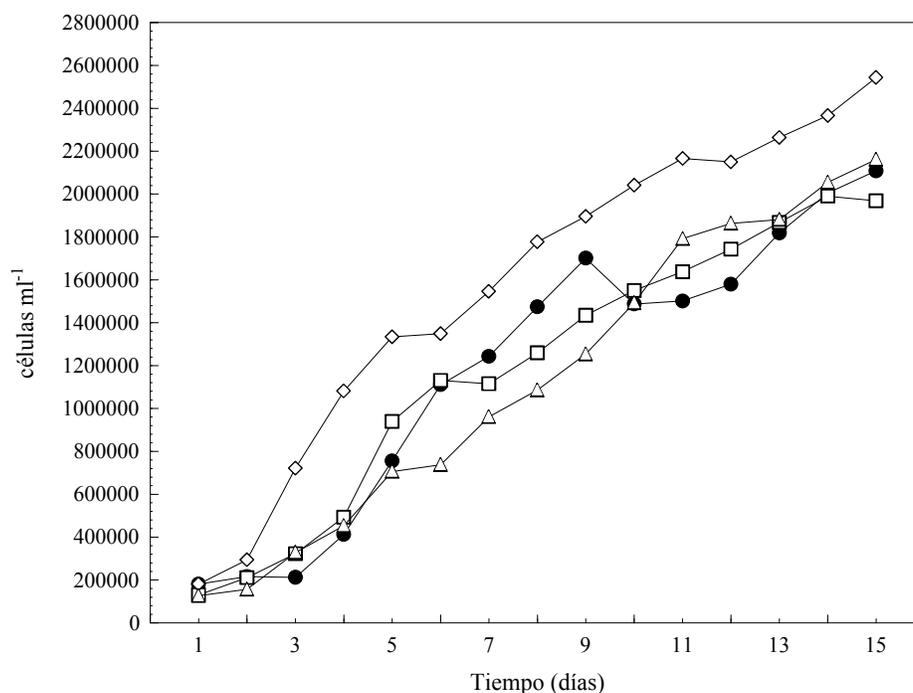


Figura 15. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis apiculata*, MA (—●—) durante la interacción con las cepas de bacterias: MA/*Halomonas variabiis* (Tc7 —◇—), MA/*Idiomarina abyssalis* (C7G6 —△—), MA/*Alteromonas macleodii* (Tt1 —□—).

La Figura 15, muestra que el crecimiento de *T. apiculata* en interacción con la bacteria *Halomonas variabiis* (Tc7) fue mayor al cultivo de microalga control ($2 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹), con una producción máxima de $2.5 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹ y las interacciones con las bacterias *Idiomarina abyssalis* (C7G6) y *Alteromonas macleodii* (Tt1) dieron lugar a un crecimiento relativamente similar al control; excepto, C7G6 que al noveno día de muestreo dio lugar a una producción de $1.2 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹ la cual al final del muestreo alcanzo la misma producción del control.

7 DISCUSIÓN

7.1 Asociación y establecimiento de bacterias en los cultivos de microalgas

Los resultados del presente trabajo, sugieren que los cultivos de microalgas marinas del género *Tetraselmis* mezclados con bacterias bajo condiciones de laboratorio, nos dan evidencias de las complejas interacciones que se presentan entre esos organismos en sus microambientes y que el crecimiento de las poblaciones de microalgas están influenciadas por bacterias con las cuales coexisten. Dentro de las interacciones observadas se tienen de tipo neutralismo, antagónicas, sinergismo, comensalismo y/o parasitismo. Es evidente que estas interacciones se debe a las condiciones del cultivo o a la especificidad tanto de las microalgas como de las bacterias.

Las cepas bacterianas aisladas del sistema de producción de *Tetraselmis* sp. fue mayor (22 cepas) que las bacterias de los cultivos de microalgas de referencia (20 cepas), lo cual se demostró la diversa morfología colonial encontrada. Las bacterias probablemente se filtraron a través del aire o del agua de mar suministrada a los cultivos de *Tetraselmis* sp. Por tal motivo, las bacterias son un componente principal de los cultivos de microalgas como lo demuestran Lewis *et al.* (1988); Moriarty (1997); Makridis *et al.* (2000).

Existen trabajos (Rossignol *et al.*, 1999; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999) que proponen posibles factores de contaminación que deben ser considerados para obtener sistemas de cultivos adecuados, como son: aireación, el agua utilizada y los tanques.

Nuestros resultados revelaron que el crecimiento de la microalga *Tetraselmis* sp. y las bacterias asociadas no presentaron una correlación significativa, infiriendo que las bacterias no tuvieron efecto sobre el crecimiento de esta microalga. Por lo tanto, ambos organismos coexisten sin afectarse en su crecimiento bajo estas condiciones de cultivo, mostrando que no hay interacción y quizás se deba a su baja densidad poblacional bacteriana. La población bacteriana tuvo un orden de 10^3 - 10^4 bacterias ml^{-1} , siendo menor a la reportada por Lewis *et al.* (1988) de 10^6 bacterias ml^{-1} en cultivos semi-continuos y Nicolas *et al.* (1989) de 10^7 bacterias ml^{-1} en cultivos abiertos en ambos casos en un cultivo de *Tetraselmis suecica*. La población microalgal fue de $4 \cdot 10^5$ células ml^{-1} de acuerdo a lo

reportado por Nicolas *et al.* (1989), quienes obtuvieron una concentración del orden de $1.4 \cdot 10^6$ células ml^{-1} en matraz de 20 l con cultivo de *Tetraselmis*.

Así mismo, Lebaron *et al.* (1998); Franklin *et al.* (2001) reportaron que la diversidad de colonias formadas en las placas fue menor debido a que las fuentes de carbono y nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo no son tan diversos como en la naturaleza. Las bacterias al adaptarse a pequeñas concentraciones de nutrientes les causa pleomorfismo, este efecto fue marcado en cultivos puros tanto en medio sólido como en caldo (Rheinheimer, 1994); nuestros resultados indican que solo el 17% de las bacterias presento este efecto.

Sin embargo, las cepas bacterianas C7A y C7B en la columna 7 y C8Q en la columna 8 mostraron una tendencia positiva, indicándonos de cierta manera que estas bacterias si estuvieron influyendo en el crecimiento de la microalga o viceversa, en la cual la microalga apporto material orgánico e inorgánico para el incremento de la abundancia bacteriana (Lewis *et al.*, 1988; Rico-Mora y Voltolina, 1995; Planas y Cunha, 1999). Otros estudios experimentales, implican que los materiales excretados por algas eucariotas son substratos importantes para el crecimiento bacteriano en sistemas acuáticos (Wang y Priscu, 1994 a y b).

En el presente trabajo la identificación y caracterización bioquímica de las bacterias asociadas a los cultivos de las microalgas concuerdan con características propias de bacterias marinas en ambientes naturales (Rheinheimer, 1994; Nicolas *et al.*, 1989). El sistema BIOLOG[®] solo identifico el 11% de la población bacteriana, esto quizás se deba a un inculo no viable o que las bacterias no fueron capaces de utilizar la fuente de carbono presente en los pozos y por consiguiente no se tiñeron; como lo proponen Garland y Millis (1991), así mismo, la producción del color en el medio de cultivo está en función de la densidad bacteriana, de la composición del inculo y de las tasas de crecimiento (Gamo y Shoji, 1999).

Entre las bacterias identificadas por ese sistema se encuentran especies patógenas y patógenas oportunistas de acuerdo al manual de Bergey's 8th edición, los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Francisella*. Dichas bacterias de cierta manera podrían considerarse como contaminantes de los cultivos debido a su baja densidad, la cual no es dominante. Por otro lado, las bacterias que fueron identificadas por el Dr. Bowman tiene

una estrecha cercanía al grupo *Proteobacteria* (bacterias púrpuras), siendo el grupo más diverso de bacterias, incluyendo bacterias fijadoras de nitrógenos (quimioautotrofos) de ahí que la flora bacteriana de aguas marinas esta estrechamente relacionada al suelo (Rheinhermer; 1994), bacterias entéricas (quimioheterotrofas), dentro de las cuales se encuentran las *Pseudomonas* y *Vibrio* (incluyen especies de *Photobacterium*, *Vibrio*, *Halomonas*, *Idiomarina*), estas pueden ser aisladas tanto del suelo como de ambientes marinos (Grüntzing *et al.*, 2001; Minerdi *et al.*, 2001).

La presencia de *Vibrio* en cultivos de *Tetraselmis* sp. no fue mayor del orden de $4 \cdot 10^2$ células ml^{-1} . Independientemente del agua de mar utilizada en estos cultivos, la población bacteriana raramente incluyen *Vibrio* spp. como lo reportaron Lewis *et al.* (1988) y Nicolas *et al.* (1989). En otros organismos como rotíferos, *Artemia* y larvas de peces y moluscos, la densidad de esta bacteria es alta hasta llegar a ser dominantes en dichos cultivos (Lewis *et al.*, 1988; Nicolas *et al.*, 1989; Sainz *et al.*, 1998; López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001).

De la poca información sobre la microflora bacteriana en sistemas de producción de microalgas, hay evidencias (Nicolas *et al.*, 1989; Grossart, 1999) que indican que esta variedad de bacterias no representan características determinadas de la flora bacteriana en los cultivos, indicando que las bacterias fueron específicamente selectivas para cada cultivo.

7.2 Cepas axénicas de microalgas marinas del género *Tetraselmis*

Las microalgas se axenizaron a través del método de dispersión en placa continuamente hasta la obtención de microalgas axénicas, para el tipo de estudio propuesto en el presente trabajo es necesario utilizar las microalgas bajo estas condiciones, ya que es recomendado usar cultivos iniciales axénicos para evitar la inoculación de bacterias patógenas al sistema de cultivos masivos de microalgas (Lewis *et al.*, 1988; Douillet y Langdon, 1993). Por el contrario, sería estresante el uso de cultivos axénicos como alimento directo para rotíferos, larvas de peces y moluscos, ya que estas excretarían carbono orgánico disuelto al medio de cultivo larvario que les afectaría a los organismos cultivados.

7.3 Efecto de las microalgas sobre el crecimiento de las bacterias asociadas

De las 42 cepas bacterianas, 29 cepas no fueron sensibles al complejo mecanismo de inhibición por parte de las 7 microalgas marinas del género *Tetraselmis*, 13 cepas bacterianas fueron sensibles a ese mecanismo. Las bacterias que fueron aisladas de las cepas de microalgas de referencia resistieron a la inhibición en comparación con las bacterias aisladas de los cultivos de *Tetraselmis* sp.

No todas las bacterias respondieron de igual manera a dicha actividad mostrando un amplio intervalo en el diámetro de los halos. Esta variabilidad probablemente se deba al tiempo de incubación de las placas experimentales (por ejemplo, las placas se incubaron a iluminación continúa hasta observar el efecto inhibitorio, algunas microalgas fueron a los 10 días y otras hasta los 13 o 15 días) o al concentrado bacteriano utilizado en este estudio, bajo esta perspectiva se ha reportado que los compuestos inhibitorios producidos por las algas llegan a perder su potencialidad en condiciones de escasez de nutrientes y estrés (Lovejoy *et al.*, 1998) y así las bacterias toleran la presencia de las microalgas.

Autores como Haldeman y Amy (1993), probaron que en una serie de bacterias aisladas de muestras de agua sedimentaria con la misma morfología colonial no respondieron similarmente a los discos de antibióticos con metal, ya que el inóculo inicial no fue uniforme en edad mostrando diferentes zonas de inhibición en 24 h.

Tetraselmis sp. presentó una menor actividad de inhibición en comparación al resto de las microalgas, permitiendo el crecimiento de una gran variedad de cepas bacterianas con diferente morfología, en dichos cultivos llevados a cabo en la UPIMA. Los términos de depredación y parasitismo son aplicados a interacciones directas como fue el caso de *T. chuii*, la cual presentó una mayor inhibición de las cepas bacterianas. Esto indica que la microalga por alguna vía inhibe a las bacterias para poder obtener los requerimientos necesarios para su crecimiento. Por el contrario, Cañizares-Villanueva y Arredondo (1993) reportaron que el crecimiento de *T. chuii* está fuertemente influenciado por dos bacterias identificadas como Grande (G) y chica (ch) asociadas a los cultivos mixtos microalga-bacteria resultando una interacción de sinergismo. La interacción entre la cepa T827/2B (*Pseudomonas* sp.) y diatomeas *Thalassiosira pseudonanna*, mostró características de parasitismo indirecto (Baker y Herson, 1978).

Las cepas bacterianas *Idiomarina abyssalis* (Tt4) identificada por el sistema BIOLOG® como *Burkholderia cocovenenan* y C7E3 fueron resistentes a la actividad inhibitoria de las microalgas con un diámetro del halo <10 mm excepto en *T. striata*. Convirtiendo a estas cepas resistentes a los compuestos inhibitorios producidos por la microalga o quizás dichos compuestos no fueron detectados o potencialmente activos para inhibir el crecimiento de la bacteria bajo esas condiciones de cultivo como lo sugieren Naviner *et al.* (1999) y Robles-Centeno y Ballantine (1999). Este proceso involucra numerosas actividades con respecto al hábitat, estación climática y etapa de la vida afectando el espectro de los compuestos activos producidos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cain *et al.* (2000) quienes describen a *Burkholderia cocovenenan* con un amplio espectro de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, protozoarios y de otras bacterias depredadoras.

T. suecica posee una alta actividad antimicrobiana, inhibiendo fuertemente a *Aeromonas ichthiosmia* 302, con un diámetro del halo >30 mm, por tal motivo son resultados importantes que podrían utilizar en un futuro a esta microalga como controladora de bacterias patógenas (Planas y Cunha, 1999) no deseables en los cultivos de larvas de peces marinos o algún otro tipo de organismos de importancia acuícola.

Austin y Day (1990) y Austin *et al.* (1992) reportaron a través de métodos *in vitro* que el sobrenadante y los extractos de una preparación comercial heterotrófica de *T. suecica* inhibió a las bacterias *Aeromonas hydrophilia*, *A. salmonicida*, *Lactobacillus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida* y *Yersinia ruckeri* tipo I en tan solo 20 min. Además al utilizarla como complemento alimenticio en salmón del Atlántico redujo el número de bacterias en los tanques de cultivo. En nuestro estudio a través de métodos *in vivo* con diferente técnica, la actividad no se presento sino hasta después de 10 días de incubación de las placas, probablemente se deba a que la microalga de este estudio fueron células vivas y tarden más tiempo en expresar su actividad y los antibióticos excretados por la microalga al cultivo presentan competencia por espacio o nutrientes (Guerrini *et al.*, 1998).

Existen otros estudios que abordan un amplio espectro de actividad antimicrobiana y antifúngica de otras microalgas como diatomeas marinas contra un amplio intervalo de bacterias marinas y terrestres (Duff *et al.*, 1966; DeLucca y McCracken, 1977; Cannell *et*

al., 1988 (b); Viso *et al.*, 1987, Jensen y Fenical, 1994; Munro *et al.*, 1995; Rico-Mora y Voltolina, 1995; Jensen *et al.*, 1996; Naviner *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000). Sin embargo, la producción de antibióticos por parte de las microalgas depende de su actividad, por ejemplo, células estresadas (como escasez de vitaminas y metales traza) (Grossart, 1999). A pesar de que el mecanismo de inhibición no fue elucidado y se propone que la interacción microalga-bacteria puede ser de tipo antagónica.

7.4 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las microalgas

21 cepas bacterianas mostraron un efecto positivo sobre el crecimiento de las 7 microalgas marinas del género *Tetraselmis*. Cualitativamente el efecto se vio reflejado en el crecimiento y en el tamaño de las colonias microalgales sobre y en la periferia de los discos impregnados de concentrado y sobrenadante bacteriano, sugiriendo que producen factores de crecimiento (como nutrientes remineralizados, vitaminas, CO₂ entre otros) para las microalgas (Baker y Herson, 1978; Fukami *et al.*, 1997; Grossart, 1999). Esos datos sugieren que la sucesión y dominancia de las especies algales pueden estar influenciadas por interacciones con bacterias.

El efecto positivo de la bacteria C8J1 sobre el crecimiento de las microalgas fue marcadamente excesivo en las siete microalgas probadas, probablemente se deba a que el concentrado celular y el sobrenadante bacteriano favorecen el crecimiento de la microalga, pero no de manera similar al resto de las bacterias estimulativas. Por ejemplo, *Pseudomonas* sp. estimulo el crecimiento de *Asterionella glacialis* ambos organismos aislados de un afloramiento fitoplanctónico. El efecto positivo de la bacteria en diatomeas se ha observado no solamente en especies planctónicas, sino también en especies asociadas (Fukami *et al.*, 1997; Suminto e Hirayama, 1997). Existen reportes que señalan a bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Xantohomonas* y *Flavobacterium*, que están estrechamente asociadas a las microalgas *Oscillatoria* y *Chlamydomonas* recolectadas en ambientes naturales y que estimularon su crecimiento (Fukami *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha reportado que algunas algas son capaces de desarrollar resistencia a compuestos inhibitorios de bacterias (DeLucca y McCracken, 1977; Smith y Doan, 1999). Más específicamente, se ha analizado un compuesto auxina ácido-acético-3-indol producido por

bacterias en sedimentos marinos, encargado de estimular el crecimiento de algas flageladas (Maruyama *et al.*, 1989).

Las interacciones microalga-bacteria demuestra que las cepas bacterianas no responden de manera similar a los cultivos microalgales singulares, pero otras si lo hacen. Esto es, las cepas Tt7, *Paracoccus marcusii* (Tc2), C7C2 y C8S4 no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento de las microalgas. Existen otras bacterias que poseen efectos algicidas o son bacterias antagónicas (Dopazo *et al.*, 1988). Munro *et al.* (1995) y Day y Tsavlos (1996) reportaron a *Flavobacterium* como inhibidora del crecimiento de *Pavlova lutheri*, con un inóculo de 10^3 ufc ml⁻¹ en un período de 3 días, ese efecto algicida se debió a factores termolábiles excretados por la bacteria al medio de cultivo. Además esa especie bacteriana inhibe el plancton de la marea roja (Fukami *et al.*, 1997). Lovejoy *et al.* (1998) y Lee *et al.* (2000) reportaron a la cepa Novel *Pseudoalteromonas* marina (subdivisión gama, clase *Proteobacteria*) aislada de un afloramiento algal de especies del género *Chatonella*, *Gymnodinium* y *Hetrosigma*, causando lisis celular y muerte de estas algas en 3 h.

Fue interesante observar que *Tetraselmis* sp. fue capaz de resistir la inhibición por parte de las bacterias Tt7, *Paracoccus marcusii* (Tc2), C7C2 y C8S4, esa resistencia probablemente se deba a algún sistema desintoxicante o una selección para individuos naturalmente resistentes (DeLucca y McCracken, 1977). De manera general, cuando el crecimiento de una diatomea, específicamente *Cylindrotheca fusiformis* no fue afectado, la presencia de las bacterias estimulo una alta producción de polisacáridos (Guerrini *et al.*, 1998).

La cepa *Idiomarina abyssalis* (Tt4) al resultar resistente a la actividad antimicrobiana de las microalgas, promovió su crecimiento fuertemente de *T. apiculata* y *T. suecica*. Si por un lado esta bacteria fue reportada con una amplia gama de actividad antimicrobiana, por el otro estimula el crecimiento de algas, ya que es descrita como un grupo extremadamente heterogéneo, el cual incluye bacterias del suelo, que promueven el crecimiento de plantas por un gen responsable de la fijación de nitrógeno (Minerdi *et al.*, 2001).

Los discos impregnados con bacterias expuestos a temperaturas altas muestran que no tuvieron efecto alguno sobre los cultivos algales, debido a que son bacterias no viables. Los discos impregnados con medio de cultivo f2-β modificado y solución salina no influyeron sobre el crecimiento de la microalga.

Estos resultados muestran que las bacterias exhiben características de parasitismo indirecto como la interacción entre la diatomea *Thalassiosira pseudonanna* y *Pseudomonas* sp. asociadas en un sistema de maricultivo (Baker y Herson, 1978). Ya que el efecto positivo del concentrado celular y sobrenadante bacteriano sobre el crecimiento microalgal no es necesario el contacto célula a célula para dicho efecto, infiriendo que las bacterias excretan compuestos necesarios para estimular el crecimiento de las algas, como en los resultados de la actividad antimicrobiana de las microalgas sobre algunas bacterias indicando un parasitismo directo.

En cultivos estáticos con medio f2-β modificado, las altas tasas de crecimiento fueron alcanzadas por cultivo axénicos de *Tetraselmis apiculata*, *T. gracilis*, *Tetraselmis* sp. y *T. striata*, con un intervalo de 2.3-2.2 cel ml⁻¹ día⁻¹ al día 16 de cultivo. De acuerdo a la producción celular fue significativamente mayor en *T. apiculata* y *T. tetrahele* (2.2 y 2.1·10⁶ células ml⁻¹, respectivamente). Debemos considerar que esta última microalga presentó una gran variancia, a pesar de que se ajusto la densidad inicial del cultivo a 10⁵ cel ml⁻¹, las densidades celulares alcanzadas fueron distintas. El número de generaciones por día fue de 50 y 38, para estas microalgas no hay reportes. Sin embargo, Fábregas *et al.* (1984) reporta que *T. suecica* en medio f/2 tolera un amplio intervalo de salinidad entre 25 y 35 ‰, obteniendo 0.55 divisiones por día y una densidad celular máxima de 1.3·10⁶ células ml⁻¹, comparando estos resultados con los obtenidos por *T. suecica* (0.53 divisiones por día y una densidad celular máxima de 1.3·10⁶ células ml⁻¹) son similares excepto el medio de cultivo y las condiciones de cultivo utilizadas.

Las microalgas *Tetraselmis* sp., *T. striata* y *T. gracilis*, mostraron tasas de crecimiento promedio de 2.2 cel ml⁻¹ día⁻¹ y generaciones promedio por día de 48.7, relativamente altas con respecto a *T. apiculata*; sin embargo, su producción celular promedio fue significativamente menor (1.8 células ml⁻¹), quizás se deba a la densidad del inoculo inicial la densidad celular del inoculo inicial y además de que las células no crecen inmediatamente después de que son cultivadas debido a que pasan por una fase de adaptación (Mantell, 1985).

Voltoлина *et al.* (1998) reportaron la importancia de procedimientos de aclimatación para evaluar medios alternativos para cultivos masivos, en *Chaetoceros* sp. fue corto el período (5 o 6 divisiones celulares) de aclimatación con un inoculo de 20·10³ células ml⁻¹

para obtener crecimiento celular apropiado y sin aclimatación, el crecimiento celular fue incapaz de crecer si se uso como cultivo inicial para un nuevo experimento con el mismo medio. En nuestros resultados, el inoculo inicial fue 10^5 células ml^{-1} y los cultivos no fueron aclimatados, por tal motivo muestren 3 agrupaciones en relación a su concentrado celular.

En este ensayo, no solo se corrobora el efecto mayor sino también el menor e igual de las bacterias adicionadas al cultivo de microalgas. De acuerdo a los resultados, las interacciones entre las 7 microalgas y 17 cepas de bacterias en cultivos estáticos fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), pero solo se seleccionaron las bacterias que tuvieron un efecto mayor, menor e igual con respecto al control (microalga axénica).

La especie de *Halomonas variabilis* como efecto mayor estimulo el crecimiento de *T. suecica*, *T. chuii*, *T. tetrathele* y *T. apiculata*; la especie de *H. nitritophilus* a *T. gracilis* y la especie *Idiomarina abyssalis* a *Tetraselmis* sp. y *T. striata*. La relación entre la microalga y la bacteria puede ser explicada en términos de combinación de interacciones debido al efecto estimulante o de inhibición. De acuerdo a los resultados de este estudio, sugerimos que la relación existente entre la microalga y las bacterias puede ser también de tipo sinérgica, ya que ambas poblaciones se benefician y son capaces de sobrevivir por si solas (la curva control) dentro de una comunidad, pero cuando están juntas la asociación les ofrece ventajas mutuas estimulando el crecimiento microalgal. Esto concuerda con lo reportado por Cañizares-Villanueva y Arredondo (1993).

En otras especies de microalgas como *Chaetoceros gracilis* (Suminto y Hirayama, 1997), *Ch. ceratosporum* al adicionarles algunas bacterias (*Flavobacterium* sp.) en su cultivo, el crecimiento de la diatomea fue estimulado y su producción celular fue relativamente constante (Fukami *et al.*, 1997). Hay reportes que abordan los factores (nutrientes esenciales para el crecimiento) que influyen en el crecimiento de alguna de las poblaciones de alga-bacteria o en ambas, mostrando un amplio intervalos de interacciones desde simbiosis hasta parasitismo variando en tiempo y espacio (Bell *et al.*, 1974; Rothhaupt, 1992; Ieyswaart *et al.*, 1994; Mayo y Noike, 1994; Wang *et al.*, 1994 b; Staats *et al.*, 1999).

Las bacterias que inhibieron el crecimiento algal fue a través de un ataque directo o indirecto (Baker y Herson, 1978; Lovejoy *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Por ejemplo,

Tetraselmis chuii y *T. suecica* mostraron un menor crecimiento en presencia a las bacterias (C8M2 y Tt4, respectivamente). En *T. chuii*, después del noveno día de muestreo se aprecia un ligero incremento bacteriano efecto positivo, esto quizás se deba a que al entrar en una fase estacionaria hay células moribundas o muertas que sirven como sustrato para las bacterias o probablemente hay excreción de compuestos orgánicos por las microalgas que son aprovechados por las bacterias (Guerrini *et al.*, 1995). Sin embargo, la cepa C8M2 tiene la capacidad de causar un decline en el crecimiento de *T. chuii* y *T. suecica*, indicando una relación de tipo comensalismo, tal como la interacción entre la diatomea *Thalassiosira pseudonanna* y la bacteria *Pseudomonas* reportada por Baker y Herson (1978). Esto indicaría una interacción directamente relacionada a parasitismo o depredación, ya que la bacteria por alguna vía mata a la alga para obtener sus requerimientos nutricionales. Similarmente, la cepa *Pseudoalteromonas* sp. mostró efectos algicidas a través de ataques directos (Lee *et al.*, 2000). En contraste, *Flavobacterium* sp. cepa 5N-3, *Pseudomonas* sp. cepa T827/2B, *Pseudoalteromonas* sp. cepa Y y cepa A28 son capaces de inhibir el crecimiento de algas a través de ataques indirectos (Baker y Herson, 1978; Lovejoy *et al.*, 1998; Grossart, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Esos resultados indican que la adición de bacterias promotoras del crecimiento a cultivos de *Tetraselmis* podrían ser tomados en cuenta para obtener cultivos de microalgas masivos estables. Además, algunas bacterias pueden suministrar factor (es) de crecimiento (como, vitaminas, glicoproteínas y compuestos activos de auxina) (Maruyama *et al.*, 1989; Suminto y Hirayama, 1997) para algunas especies de microalgas y por otro lado esas mismas bacterias pueden inhibir el crecimiento de otras especies, por lo que los efectos de las bacterias son específicas para ciertas especies de algas. Esto demuestra que las interacciones microalga-bacteria de las mismas especies no son constantes y son alteradas de acuerdo a las condiciones ambientales. Estas interacciones necesitan muchos estudios para poder comprender relaciones tanto ecológicas como fisiológicas que existen entre estos microorganismos.

8 CONCLUSIONES

42 cepas bacterianas marinas con diferente morfoloía fueron aisladas de cultivos de siete microalgas del género *Tetraselmis*. De las cuales, 20 fueron de cultivos de microalgas de referencia y el resto (22 cepas bacterianas) de cultivos masivos de *Tetraselmis* sp.

Del total de cepas de bacterias, solamente el crecimiento de 13 cepas fue inhibido por las siete microalgas del género *Tetraselmis* con actividad antimicrobiana, formando halos de inhibición con un rango promedio de 7 a >30 mm de diámetro.

17 cepas bacterianas no mostraron inhibición de su crecimiento en presencia de las microalgas. Por lo que se asumió que estimularon el crecimiento y aumentaron el tamaño de las colonias microalgales sobre y en la periferia de los discos impregnados de concentrado y sobrenadante bacteriano. Los discos con medio de cultivo, solución salina y sobrenadante bacteriano a temperatura >180°C no influyeron en el crecimiento de las microalgas.

Las mayores tasas de crecimiento las presentaron *Tetraselmis apiculata*, *T. gracilis*, *Tetraselmis* sp. y *T. striata*, 2.309, 2.283, 2.245 y 2.214 cel ml⁻¹ día⁻¹ respectivamente; el crecimiento microalgal axénico fue significativamente diferente y *T. apiculata* obtuvo una producción máxima de 2.2 · 10⁶ cel ml⁻¹ así como el número de generaciones por día más alto de 50.

A través de cultivos estáticos se corroboró el efecto positivo de las 17 bacterias con curvas de crecimiento de las microalgas donde se muestran los efectos de mayor, menor y/o igual con respecto al control (microalga axénica). Como efecto mayor, la especie de *Halomonas variabilis* estimuló el crecimiento de *T. suecica*, *T. chuii*, *T. tetrathele* y *T. apiculata*; la especie de *H. nitritophilus* a *T. gracilis* y la especie *Idiomarina abyssalis* estimuló el crecimiento a *Tetraselmis* sp. y *T. striata*. *Tetraselmis chuii* y *T. suecica* mostraron un menor efecto por parte de las bacterias (C8M2 y Tt4, respectivamente), indicando una relación de tipo comensalismo.

Las interacciones microalga-bacteria observadas bajo condiciones controladas de laboratorio en este estudio fueron desde neutralismo hasta comensalismo y parasitismo.

9 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en los experimentos de los efectos de las siete microalgas marinas del género *Tetraselmis* sobre el crecimiento de las bacterias y viceversa proporcionará información acerca del funcionamiento ecológico de las asociaciones microalga-bacteria que pudieran ser presentadas en condiciones de cultivos masivos y de baja densidad. Sin embargo, la orientación del estudio no tuvo como propósito determinar los factores de crecimiento o de inhibición de ambos microorganismos.

Por lo tanto se sugiere primeramente aislar e identificar los compuestos activos de las microalgas que inhibieron el crecimiento bacteriano. Así mismo, los factores de crecimiento de las bacterias que estimularon el crecimiento de las microalgas. Aunado a esto, sería imperativo realizar experimentos que consideren variación de nutrientes y mezcla de más de una bacteria en combinación con una microalga, para determinar si hay competencia por nutrientes, sustrato y/o espacio.

De esta manera, las microalgas que resultaron tener actividad antibacteriana, sería deseable adicionarlas como “agua verde” a los cultivos de larvas de peces comerciales y evaluar si también inhiben o controlan el crecimiento de bacterias patógenas de peces.

Las condiciones de cultivos estáticos con bacterias que estimulan el crecimiento de las microalgas sería necesario escalar estos cultivos en combinación con las microalgas y bacterias, no sin antes controlar los factores físicos y químicos de este microambiente para obtener información más precisa acerca de las posibles interacción a densidades más altas.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, N. Nishimura & M. Hirano. 1999. Simultaneous production of β carotene, vitamin E and vitamin c by the aeria microalga *Trentepohlia aurea*. *Journal of Applied Phycology*, 11: 331-336.
- Atlas, R.M. 1990. *Microbiología, Fundamentos y Aplicaciones*. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, pp. 887.
- Armstrong, E., L. Yan, K.G. Boyd, P.C. Wright & J.G. Burgess. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia*, 461: 37-40.
- Austin, B. & J.G. Day. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90: 389-392.
- Austin, B., E. Baudet & M. Stobie. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, 15: 55-61.
- Baker, K.H. & D.S. Herson. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and an associated *Pseudomonad* in a mariculture system. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(4): 791-796.
- Bell, W.H., J.M. Lange & R. Mitchell. 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnology and Oceanography*, 19(5): 833-839.
- Benemann, J.R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*, 4: 233-245.
- Borowitzka, M.A. 1992. Algal biotechnology products and processes – matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, 4: 267-279.
- Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393-401.
- Bunt, J.S. 1968. The influence of inoculum size on the initiation of exponential growth by marine diatom. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie*, 8(4): 289-292.
- Cahu, Ch. & J. Zambonino Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161-180.
- Cain, C.C., A.T. Henry, R.H. Waldo III, L.J. Casida, JR. & J.O. Falinham III. 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 4139-4141.

- Cannell, R.J.P., A.M. Owsianka & J.M. Walker. 1988 (b). Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. ***British Phycological Journal***, 23: 41-44.
- Cañizares-Villanueva, R.O. & C. O. Arredondo. 1993. Comportamiento cinético de un cultivo mixto de la microalga marina *Tetraselmis chuii* y dos bacterias. ***Revista de Investigaciones Marinas***, 14(1):86-91.
- Cho, J.Y., H-J. Jin, H.J. Lim, J.N.C. Whyte & Y-K. Hong. 1999. Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*. ***Journal of Applied Phycology***, 10: 561-567.
- Cooper, S., A. Battat, P. Marsot & M. Sylvestre. 1983. Production of antibacterial activities by two *Bacillariophyceae* grown in dialysis culture. ***Canadian Journal of Microbiology***, 29: 338-341.
- Day, J.G. & A.J. Tsavalos. 1996. An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis*. ***Journal of Applied Phycology***, 8: 73-77.
- DeLucca, R. & M.D. McCracken. 1977. Observations on interactions between naturally-collected bacteria and several species of algae. ***Hydrobiologia***, 55(1): 71-75.
- De Pauw, N., J. Morales & G. Persoone, 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. ***Hydrobiologia***, 116/117: 121-134.
- Dopazo, C.P., M.L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J.L. Barja & A.E. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. ***Journal of Applied Bacteriology***, 65: 97-101.
- D'Souza, F.M.L. & G.J. Kelly. 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. ***Aquaculture***, 181: 311-329.
- Douillet, P. & C.J. Langdon. 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. ***Biology Bulletin***, 184: 36-51.
- Douillet, P. & C.J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). ***Aquaculture***, 119: 25-40.
- Duff, D.C.B., D.L. Bruce & N.J. Antia. 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. ***Canadian Journal of Microbiology***, 12(5): 877-884.
- Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabazas & M. Veiga. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. ***Aquaculture***, 42: 207-215.

- Fenwick, C. & J.G. Day. 1992. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes. *Journal of Applied Phycology*, 4: 105-109.
- Flynn, K.J. 1990. Composition of intracellular and extracellular pools of amino acids, and amino acid utilization of microalgae of different sizes. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 139: 151-166.
- Fogg, G.E. 1975. *Algal cultures ad phytoplankton ecology*. 2^a edition. Ed. The University of Wisconsin Press, 175 pp.
- Franklin, R.B., J.L. Garland, C.H. Bolster & A.L. Mills. 2001. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 702-712.
- Freeman, B.A. 1989. *Microbiología de Burrows*. 22^a edición. Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 1181 pp.
- Fukami, K., T. Nishijima & Y. Ishida. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*, 358: 185-191.
- Gamo M. & T. Shoji. 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4419-4424.
- Garland, J.L. & A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8): 2351-2359.
- Glazer, A.N. & H. Nikaido. 1995. *Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company, Editor, New York, pp. 662.
- Goldman, J.C. & M.R. Dennett. 1991. Ammonium regeneration and carbon utilization by marine bacteria grown on mixed substrates. *Marine Biology*, 109: 369-378.
- González, J.M., R. Simó, R. Massana, J.S. Covert, E.O. Casamyo, C. Pedrós-Alió & M.A. Moran. 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4237-4246.
- Green, D.H., Ph. R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca & S.M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4288-4291.

- Grossart, H-P. 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology*, 19: 1-11.
- Grüntzing, V., S.C. Nold, J. Zhou & J.M. Tiedje. 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 760-768.
- Guerrini, F., A. Mazzotti, L. Boni & R. Pistocchi. 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology*, 15: 247-253.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: *Handbook of Phycological Methods culture methods and growth measurements*. Stein, J.R. 1973. Editor: Cambridge University Press, London, p. 289-311.
- Guillard, R.R.L. 1975. *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. Reprinted from: Culture of marine invertebrates animals. Edited by W.R. Sith and M.H. Chaveby, Plenum Publisheries Corporation.
- Gupta, A.B. & Shrivastava, G.C. 1965. On antibiotic properties of some fresh water algae. *Hydrologia*, 25: 285-288.
- Hai, T., H. Ahlers, V. Gorenflo & A. Steinbüchel. 2000. Axenic cultivation of anoxygenic phototrophic bacteria, cyanobacteria, and microalgae in a new closed tubular glass photobioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 53: 383-389.
- Haldeman, D.L. & P.S. Amy. 1993. Diversity within a colony morphotype: implications for ecological research. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 933-935.
- Hooper, L.V., L. Bry, P.G. Falk & J.I. Gordon. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *BioEssays*, 20: 336-343.
- Ietswaart, T., P.J. Schneider & R.A. Prins. 1994. Utilization of organic nitrogen sources by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(59): 1554-1560.
- Jensen, P.R. & W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annual Review Microbiology*, 48: 559-584
- Jensen, P.R., C.D. Harvell, K. Wirtz & W. Fenical. 1996. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Marine Biology*, 125: 411-419.
- Krebs, Ch.J. 1985. *Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia*. 2ª edición HARLA, México, D.F. 753 pp.

- Lebaron, P., J-F. Ghiglione, C. Fajon, N. Batailler & P. Normand. 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiology Letters*, 160: 137-143.
- Lee, S.O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Misutani & H. Ohtake. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4334-4339.
- Lewis, T.E., C.D. Garland, T.D. O'Brien, M.I. Fraser, P.A. Tong, C. Ward, T.G. Dix & T.A. McMeekin. 1988. The use of 0.2 μ m membrane-filtered seawater for improved control of bacterial levels in microalgal cultures fed to larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 69: 241-251.
- Lincoln, R.A, K Strupinski & J.M. Walker. 1990. Use of a isolated guinea-pig ileum assay to detect bioactive compounds in microalgal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 2: 83-88.
- Lopes Thompson, F., P.C. Abreu & W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- López-Torres, M.A., & M.L. Lizárraga-Partida. 2001. Bacterial isolated on TCBS media associated with hatched Artemia cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194: 11-20.
- Lovejoy, C., J.P. Bowman & G.M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a Novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, Gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): 2806-2813.
- Makridis, P., A.J. Fjellheim, J. Skejermo & O. Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture*, 185: 207-218.
- Mantell, S.H., J.A. Mattheus & R.A. Mackee. 1985. *Principles of plant biotechnology an introduction to genetic engineering in plants*. Ed. Blackwell Scientific Publications. 269 p.
- Maruyama, A., M. Maeda & U. Simidu. 1989. Microbial production of auxin indole-3-acetic acid in marine sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 58: 69-75.
- Mayo, A.W. & T. Noike. 1994. Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Water Research*, 28(5): 1001-1008.

- Minerdi, D., R. Faniy, R. Gallo, A. Boarino & P. Bonfante. 2001. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 725-732.
- Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 157: 333-349.
- Munro, P.D., H.A. McLean, A. Barbour & T.H. Birkbeck. 1995. Stimulation or inhibition of growth of the unicellular alga *Pavlova lutheri* by bacteria isolated from larval turbot culture systems. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 519-524.
- Nakano, S. 1996. Bacterial response to extracellular dissolved organic carbon released from healthy and senescent *Fragilaria crotonensis* (Bacillariophyceae) in experimental systems. *Hydrobiologia*, 339: 47-55.
- Naviner, M., J.-P. Bergé, P. Durand & H.L. Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174: 15-24.
- Nicolas, J.L., E. Robic & D. Ansquer. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83: 237-248.
- Nottage, A.S. & T.H. Birkbeck. 1986. Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine Vibrios. *Journal of Fish Diseases*, 9: 249-256.
- Nygaard, K. 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnology and Oceanography*, 38(2): 273-279.
- Olafsen, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223-247.
- Olsen, A.I., Y. Olsen, Y. Attramadal, K. Christie, T.H. Birkbeck, J. Skjermo & O. Vadstein. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 190: 11-25.
- Otero, A. & J. Fábregas. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159: 111-123.
- Phatarpekar, P.V., V.D. Kenkre, R.A. Sreepada, U.M. Desai & C.T. Achuthankutty. 2002. Bacterial flora associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 203: 279-291.
- Planas, M. & I. Cunha. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.

- Prescott, L.M., J.P. Harley, D.A. Klein. 1993. **Microbiology**. 2^a edition. Wm.C. Brown Publishers. Dubuque, I.A., 912 pp.
- Qin, J.G., L. Pearson & J.E. Carragher. 1999. Response of *Tetraselmis suecica* to nutrient and grazer manipulation. **Journal of Applied Phycology**, 11: 481-485.
- Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(9): 3763-3766.
- Reitan K.I., J.R. Rainuzzo, G. Oie & Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. **Aquaculture**, 155: 207-221.
- Rheinheimer, G. 1994. Marine bacteria. In: G. Rheinheimer (Editor), **Aquatic Microbiology**, 4th Edición. John Wiley, New York, NY. pp. 31-39.
- Rico-Mora, R. & D. Voltolina. 1995. Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* cleve (Bacillariophyceae) cultures. **Revista Italiana Acquacoltura**, 30: 105-109.
- Rico-Mora, R., D. Voltolina & J.A. Villaescusa-Celaya. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. **Aquacultural Engineering**, 19: 1-6.
- Robles-Centeno, P.O. & D.L. Ballantine. 1999. Effects of culture conditions on production of antibioticly active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). I. Light. **Journal of Applied Phycology**, 11: 217-224.
- Roeck-Holtzhauer, Y.D., I. Quere & C. Claire. 1991. Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, 3: 259-264.
- Rombaut, G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos & W. Verschuere. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture**, 176: 195-207.
- Rossignol, N., L. Vadanjon, P. Jaouen & F. Quéméneur. 1999. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. **Aquacultural Engineering**, 20: 191-208.
- Rothhaupt, K.O. 1992. Stimulation of phosphorus-limited phytoplankton by bacterivorous flagellates in laboratory experiments. **Limnology Oceanography**, 37(4): 750-759.
- Rothhaupt, K.O. & H. Güde. 1992. The influence of spatial and temporal concentration gradients on phosphate partitioning between different size fractions of plankton: Further evidence and possible causes. **Limnology Oceanography**, 37(4): 739-749.

- Sainz, J.C., A.N. Maeda-Martínez & F. Ascencio. 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). ***Microbial Ecology***, 35: 188-192.
- Skejeremo, J. & Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. ***Aquaculture***, 177: 333-343.
- Smith, G.D. & N.T. Doan. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. ***Journal of Applied Phycology***, 11: 337-344.
- Sokal, R.R & F.J. Rohlf. 1981. ***Biometry***. Editor: W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 859 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. In: ***Handbook of Phycological Methods culture methods and growth measurements***. Stein, J.R. 1973. Editor: Cambridge University Press, London, p. 321-343.
- Staats, N., B.D. Winder, L.J. Stal & L.C.R. Mur. 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. ***European Journal of Phycology***, 34: 1161-169.
- Stein, J.R. 1973. ***Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements***. Sponsored by the Phycological Society of America INC. Ed. Cambridge University Press, 448 pp.
- Stoderegger, K. & G.J. Herndl. 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton ***Limnology Oceanography***, 43(5): 877-884.
- Su, H.M., M.S.Su & I.C. Liao. 1997. Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. ***Hydrobiologia***, 358: 37-40.
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo & Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. ***Aquaculture***, 165: 269-280.
- Suminto & K. Hirayama. 1997. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. ***Hydrobiologia***, 358: 223-230.
- Takeuchi, T. 2001. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. ***Aquaculture***, 200: 203-222.
- Tsavalos, A.J. & J.G. Day. 1994. Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina*. ***Journal of Applied Phycology***, 6: 431-433.

- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez & F. Núñez-Cebrero. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *Galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the *f/2* medium. *Aquacultural Engineering*, 20: 135-147.
- Viso, A.C., D. Pesando & C. Baby. 1987. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Botanica Marina*, 30: 41-45.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers ad C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 128: 219-240.
- Voltolina, D., M. Nieves, G. Navarro, R. Oliva & D. Peraza. 1998. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering*, 19: 7-15.
- Wang, L. & J.C. Priscu. 1994 (a). Stimulation of aquatic bacterial activity by cyanobacteria. *Hydrologia*, 277: 145-158.
- Wang, L. & J.C. Priscu. 1994 (b). Influence of phytoplankton on the response of bacterioplankton growth to nutrient enrichment. *Freshwater Biology*, 277: 145-158.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4^a. Edición. Prentice Hall, Editor, New Jersey. 663 pp.

11 ANEXOS

ANEXO 1a

Medio sólido f/2- β modificado (Guillard, 1975)

Trabajar las soluciones stock de los Nutrientes Mayores, Metales Traza y de Vitaminas (Anexo 1b), llevarla a 1000 ml de agua de mar y adicionar 15 g⁻¹ l de agar bacteriológico. Esterilizar a 15 lb por 15 minutos, dejar que se temple el medio y vaciar en placas de petri estériles.

Nota: Para comprobar su esterilidad de las placas con medio se meten a una incubadora de 35°C por 24 h.

ANEXO 1b**Medio líquido f/2-β modificado (Guillard, 1975)**

<i>Material</i>	Uso	μM	Solución Stock, % (W/V)
Mayores nutrientes: NaNO ₃ NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O Agua destilada	1 ml	75 mg (883) 5 mg (36.3) 15-30 mg (1.5-3 mg Si o 54-107)	7.5 0.5 3 100 ml
Metales Traza: Soluciones Primarias: CuSO ₄ · 5H ₂ O ZnSO ₄ · 7H ₂ O ó ZnCl ₂ CoCl ₂ · 6H ₂ O MnCl ₂ · 4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O FeC ₆ H ₅ O ₇ · 5H ₂ O C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O Agua destilada pH	1 ml	0.01 mg (Cu 2.5 μg o ca. 0.04 μM) 0.022 mg (Zn 5 μg o ca. 0.08 μM) 0.01 mg (Co 2.5 μg o ca. 0.05 μM) 0.18 mg (Mn 0.05 μg o ca. 0.9 μM) 0.006 mg (Mo 2.5 μg o ca. 0.03 μM) 3 mg (Fe 0.5 mg o 8.9 μM ; citrato 8.9 μM) 16.8 mg (citrato 80.1 μM)	0.98 2.2 1.0 1.0 18.0 0.63 900 ml 2.3
Vitaminas: Tiamina · HCl Biotina (B1) Cianocobalamina (B12)	0.5 ml	0.1 mg 0.5 μg 0.5 μg	

Nota: n% (W/V) n mide gramos para llevar a un volumen de 100 ml de agua destilada. Usar 1 ml por litro de agua de mar.

Es conveniente hacer los stocks primarios individuales de los metales traza.

El hierro es suministrado como el citrato.

Soluciones Stock de Metales Traza, el citrato como quelante.

Disolver 16.8 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) en ca. 900 ml de agua destilada. Adicionar 3.0 g de citrato férrico ($FeC_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$) y 1 ml de cada stock primario de metales traza (Tabla) pH cerca de 2.3. Proteger esta solución de la luz y oxígeno. Usar 1 ml^{-1} l de esta solución.

Soluciones stock primarias de vitaminas

Solución Stock Primaria: Biotina es obtenida en forma cristalina. Una solución stock primaria se hace conteniendo 0.1 mg/ml, pesando cerca de 10 mg y adicionar agua destilada, 9.6 ml por cada mg de biotina. Hacer la solución ligeramente ácida, si es necesario autoclave, poner la solución en tubo o frasco estéril y congelar.

Vitamina B12: es obtenida en forma de cristales. Pesar y hacer una solución stock primaria teniendo 1 mg/ml. Acidificar la solución, si es necesario autoclave y ponerla en un frasco estéril y congelar.

Trabajar las soluciones stock de vitaminas: Tomar 1.0 ml del stock primario de biotina y 0.1 ml del stock primario de B12, llevar a 100 ml y adicionar 20 mg de Tiamina \cdot HCl. No se necesita stock primario de tiamina. La solución stock de vitaminas se pone en un tubo o frasco estéril de 1, 2 o 5 ml se esterilizan y se almacenan en refrigerador. Usar 0.5 ml por litro del medio final.

ANEXO 2

Agar marino 2216

Reactivo	Cantidad (w/v)
Peptona de Carne de Carnero	1%
Extracto de Levadura	0.1%
Fe ₃ SO ₄	0.0002 g
Agar bacteriológico	15 %
Agua de mar filtrada	1000 ml

ANEXO 3

Tinción de Gram

Cristal violeta (Oxalato de amonio): 2 g de cristal violeta , en 20 ml etanol (95%) y 80 ml de agua destilada.

Lugol: 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 300 ml de agua destilada.

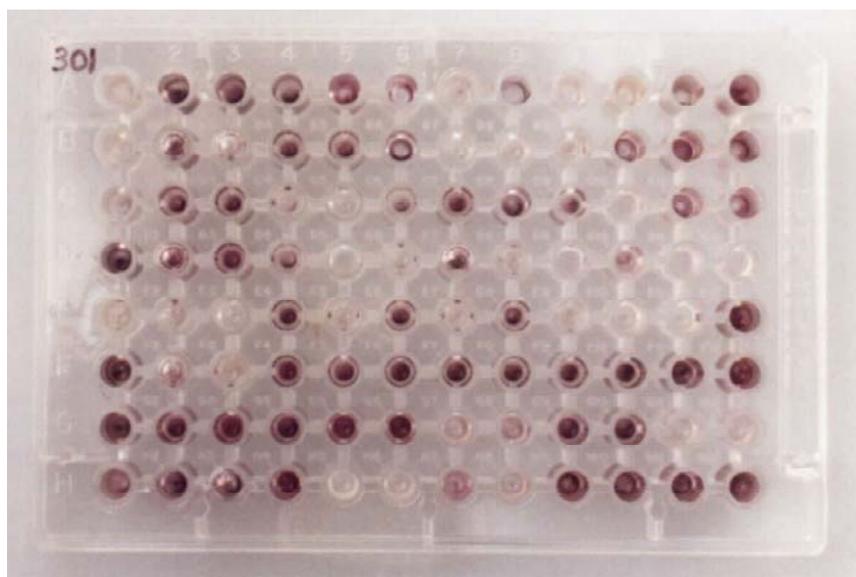
Alcohol-Acetona: 30 y 70%, respectivamente.

Safranina: 0.25 g de safranina, 10 ml de etanol (95%) en 90 ml de agua destilada.

ANEXO 4

Sistema de multipuebas comerciales GN2 y GP2-MicroPlate-BIOLOG®

El sistema de GN2 MicroPlate™ consiste de un panel de pruebas de un método estandarizado usando 95 pruebas bioquímicas para identificar un amplio rango de bacterias entéricas, no entéricas, y gram-negativas. El software Biolog's MicroLog™ 1, MicroLog 2, o MicroLog 3, son usados para identificar las bacterias de acuerdo a su patrón metabólico en el sistema GN2 MicroPlate. La prueba Biolog MicroPlates consiste de la capacidad de un microorganismo para utilizar o oxidar un panel preseleccionado de diferentes fuentes de carbono. La prueba produce un patrón característico de pozos púrpuras, el cual constituye a un "Metabolic Fingerprint" la capacidad del organismo inoculado. Todos los nutrientes y bioquímicos necesarios están perfilados y secados dentro de 96 pozos de la placa. Violeta tetrazolium es usado como un ojo redox para indicar colorimétricamente la utilización de las fuentes de carbono.



Microplaca BIOLOG® con 95 pruebas de diferentes fuentes de carbono, el cambio de color en el pozo es la capacidad del microorganismo en utilizar esa fuente.

ANEXO 5

Identificación de cepas de bacterias asociadas a cultivos de microalgas del género *Tetraselmis* por el sistema BIOLOG[®].

Fuente de carbono	<i>Variovorax paradoxus</i> Tsue1	<i>Burkholderia cocovenenans</i> Tt4	<i>Photobacterium logei</i> Tc1	<i>Photobacterium logei</i> C8R	<i>Pseudomonas stutzeri</i> C7B	<i>Francisella philomiragia</i> C7C	<i>Vibrio alginolyticus</i> C7G	<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> C7H	<i>Acinetobacter johnsonii</i> C8T
A 1 WATER	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 2 A- CYCLODEXTRIN	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
A 3 DEXTRIN	+	-	+	+	+	-	+	-	-
A 4 GLICOGEN	+/-	-	+	+	+	-	+	-	+/-
A 5 TWEEN 40	+	+	+	-	+	-	+	+	-
A 6 TWEEN 80	-	+	+	-	+	-	+	+	-
A 7 N- ACETYL GALACTOSAMINE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A 8 N- ACETYL-D-GLUCOSAMINE	-	-	+/-	+	-	-	+	-	-
A 9 ADONITOL	+	-	+	+	-	-	-	-	-
A 10 L- ARABINOSE	+	+	+	-	+	+	+/-	+/-	-
A 11 D- ARABITOL	+	-	+	+	-	-	-	-	-
A 12 D- CELLOBIOSE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
B 1 I- ERYTHRITOL	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B 2 D- FRUCTOSE	+	-	+	+	+/-	-	+	-	-
B 3 L- FUCOSE	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
B 4 D- GALACTOSE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
B 5 GENTIOBIOSE	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B 6 A-D- GLUCOSE	+/-	-	+	+	+	-	+	-	+/-
B 7 M- INOSITOL	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B 8 A-D- LACTOSE	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B 9 LACTULOSE	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B 10 MALTOSE	-	-	+	+	+	-	+	-	-
B 11 D- MANNITOL	+	-	+	+	+	-	+	-	-
B 12 D- MANNOSE	-	-	+	+	+/-	-	+	-	-
C 1 D- MELIBIOSE	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
C 2 B- METHYL-D-GLUCOSIDE	+/-	-	+	+	-	-	+/-	-	-
C 3 D- PSICOSE	+	-	+	+	+	-	+/-	-	-
C 4 D- RAFFINOSE	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-
C 5 L- RHAMNOSE	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+/-
C 6 D- SORBITOL	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Identificación de cepas de bacterias asociadas a cultivos de microalgas del género *Tetraselmis* por el sistema BIOLOG®.

Fuente de carbono	<i>Variovorax paradoxus</i> Tsue1	<i>Burkholderia cocovenenans</i> Tt4	<i>Photobacterium logei</i> Tc1	<i>Photobacterium logei</i> C8R	<i>Pseudomonas stutzeri</i> C7B	<i>Francisella philomiragia</i> C7C	<i>Vibrio alginolyticus</i> C7G	<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> C7H	<i>Acinetobacter johnsonii</i> C8T
C 7 SUCROSE	-	-	-	+	-	-	+	-	-
C 8 D- TREHALOSE	-	-	+	+	+/-	-	+	-	-
C 9 TURANOSE	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-
C 10 XYLITOL	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C 11 METHYL PYRUVATE	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+
C 12 METHYL SUCCINATE	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-	+/-	-
D 1 ACETIC ACID	+	+/-	+	+	+	+/-	-	-	-
D 2 CIS- ACONITIC ACID	+/-	-	+	+	+	-	-	-	-
D 3 CITRIC ACID	+/-	-	+	+	+	-	-	-	+/-
D 4 FORMIC ACID	+	-	+	-	+	-	-	-	-
D 5 D- GALACTONIC ACID LACTONE	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-
D 6 D- GALACTURONIC ACID	-	-	+	+	+	-	-	-	+/-
D 7 D- GLUCONIC ACID	-	-	-	+	+	-	+	-	+/-
D 8 D- GLUCOSAMINIC ACID	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D 9 D- GLUCURONIC ACID	-	-	+	+	+	-	-	-	+/-
D 10 A- HYDROXYBUTYRIC ACID	+/-	-	+	+	+/-	-	-	-	-
D 11 B- HYDROXYBUTYRIC ACID	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-	+
D 12 G- HYDROXYBUTYRIC ACID	+/-	-	+	+	+	-	-	+/-	+/-
E 1 P- HYDROXYPHENYL ACETIC ACID	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
E 2 ITACONIC ACID	+/-	-	+	+/-	+	-	-	-	-
E 3 A- KETO-BUTYRIC ACID	+/-	-	+	+	+/-	-	-	-	-
E 4 A- KETO-GLUTARIC ACID	+/-	-	+	+	+	-	-	-	+/-
E 5 A- KETO-VALERIC ACID	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E 6 D,L- LACTIC ACID	+	-	+	+	+	-	+	-	-
E 7 MALONIC ACID	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E 8 PROPIONIC ACID	+	-	+	+/-	+	-	+/-	+/-	+/-
E 9 QUINIC ACID	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E 10 D- SACCHARIC ACID	-	-	+	+	+	-	-	-	-
E 11 SEBACIC ACID	-	-	+	-	+	-	-	-	-
E 12 SUCCINIC ACID	+/-	+	+	+	+	-	+	-	-
F 1 BROMO SUCCINIC ACID	-	-	+	+	+	-	+/-	-	-
F 2 SUCCINAMIC ACID	+/-	-	+	+	+/-	-	-	-	-
F 3 GLUCURONAMIDE	-	-	+	+	-	-	-	-	-
F 4 ALANINAMIDE	+/-	-	+	+	+	-	-	-	-

Identificación de cepas de bacterias asociadas a cultivos de microalgas del género *Tetraselmis* por el sistema BIOLOG®.

Fuente de carbono	<i>Variovorax paradoxus</i> Tsu1	<i>Burkholderia cocovenenans</i> Tt4	<i>Photobacterium logei</i> Tc1	<i>Photobacterium logei</i> C8R	<i>Pseudomonas stutzeri</i> C7B	<i>Francisella philomiragia</i> C7C	<i>Vibrio alginolyticus</i> C7G	<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> C7H	<i>Acinetobacter johnsonii</i> C8T
F 5 D- ALANINE	+/-	-	+	+	+	+/-	-	-	-
F 6 L- ALANINE	-	-	+	+	+	+/-	+	-	+/-
F 7 L- ALANYL-GLYCINE	-	-	-	+	+/-	-	+	-	+/-
F 8 L- ASPARAGINE	+/-	-	+	+	+	-	+	-	+/-
F 9 L- ASPARTIC ACID	+	-	+	+	+	-	+	-	-
F 10 L- GLUTAMIC ACID	+/-	+/-	+	+	+	-	+	-	+/-
F 11 GLYCYL-L-ASPARTIC ACID	+/-	-	+	+	-	-	+	-	-
F 12 GLYCYL-L-GLUTAMIC ACID	-	-	+	+	-	-	+	-	+/-
G 1 L- HISTIDINE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
G 2 HYDROXY-L-PROLINE	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
G 3 L- LEUCINE	-	+/-	+	+	+	-	-	-	-
G 4 L- ORNITHINE	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
G 5 L- PHENYLALANINE	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
G 6 L- PROLINE	-	-	+	+	+	-	+/-	-	+
G 7 L- PYROGLUTAMIC ACID	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G 8 D- SERINE	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-
G 9 L- SERINE	-	-	+	+	-	-	+	-	+/-
G 10 L- THREONINE	-	-	+	+	-	-	+	-	+/-
G 11 CARNITINE	-	-	+	+	-	-	-	-	-
G 12 G- AMINO BUTYRIC ACID	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-
H 1 UROCANIC ACID	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-
H 2 INOSINE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
H 3 URIDINE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
H 4 THYMIDINE	-	-	+	+	-	-	+	-	-
H 5 PHENYLETHYLAMINE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H 6 PUTRESCINE	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H 7 2- AMINO ETHANOL	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
H 8 2,3- BUTANEDIOL	-	-	+	+	+	-	-	-	-
H 9 GLYCEROL	-	-	+	-	+	-	-	-	-
H 10 D,L-A- GLYCEROL PHOSPHATE	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
H 11 GLUCOSE-1-PHOSPHATE	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
H 12 GLUCOSE-6-PHOSPHATE	-	-	-	+	+/-	-	+	-	-

+/- => reacción es positiva.