



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RECUPERACIÓN Y RECICLAMIENTO DE
RESIDUALES DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DEL
CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* MEDIANTE
SISTEMAS DE FICORREMEDIACION

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación: Acuicultura)

Presenta

Melissa López Vela

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 17 del Mes de Febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Recuperación y reciclamiento de residuales de nitrógeno y fósforo del cultivo de *Litopenaeus vannamei* mediante sistemas de ficorremediación

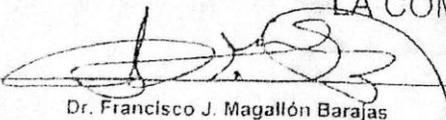
Presentada por la alumna:

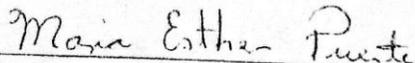
Melissa López Vela

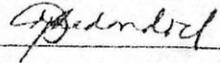
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

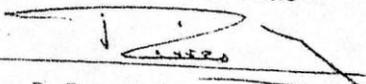
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

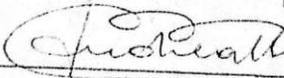
LA COMISION REVISORA

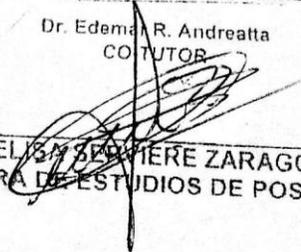

Dr. Francisco J. Magallón Barajas
CO-DIRECTOR DE TESIS


Dra. Ma. Esther Puente
CO-DIRECTOR DE TESIS


Dra. Bertha O. Arredondo Vega
CO-TUTOR


Dr. Roberto Civera Cerecedo
CO-TUTOR


Dr. Edemar R. Andreatta
CO-TUTOR


DRA. ELISA BERNIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco J. Magallón Barajas (CIBNOR)
Co-Director de Tesis

Dra. Ma. Esther Puente (CIBNOR)
Co-director de Tesis

Dra. Bertha O. Arredondo Vega (CIBNOR)
Co-Tutor de Tesis

Dr. Roberto Civera Cerecedo (CIBNOR)
Co-Tutor de Tesis

Dr. Edemar R. Andreatta (UFSC)
Co-Tutor de Tesis

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Francisco J. Magallón Barajas

Dra. Ma. Esther Puente

Dra. Bertha O. Arredondo Vega

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Edemar R. Andreatta

SUPLENTE

Dr. Humberto Mejía Ruiz (CIBNOR)

Dr. Ramón Casillas Hernández (ITSON)

RESUMEN

En las últimas dos décadas la acuicultura ha crecido considerablemente alrededor del mundo, siendo la producción de peneidos, la actividad más importante dentro de dicha industria en términos de volúmenes y valores de producción. Dicho modelo se fundamenta en la transformación de proteína de origen agrícola y pesquero en proteína de camarón. Hasta 2010, esta actividad enfrentó una sobreproducción que afectó a los acuicultores ya que se generó una oferta superior a la demanda, lo cual, declinó los precios del producto con un subsecuente aumento en los costos de producción ya que, insumos como la harina y el aceite de pescado debido a su alto precio y escasez se convirtieron en una limitante para el desarrollo de dicho cultivo. Aunado a lo anterior, la ecoeficiencia con la que se utilizan el fósforo (P) y nitrógeno (N) contenidos en los alimentos balanceados en sistemas de cultivo autotróficos es en promedio del 20 %, mientras que el 80 % restante, es liberado al ambiente generando problemas ambientales como la eutrofización de los cuerpos de agua adyacentes a las granjas de camarón. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la recuperación de residuales de P y N del cultivo de *Litopenaeus vannamei* su reciclamiento e impacto en la ecoeficiencia utilizando una asociación microalga-bacteria heterotrófica en sistemas de ficorremediación.

Para lograr lo anterior, se llevaron a cabo bioensayos de liberación y retención de nutrientes (P y N) en donde se evaluó el efecto de 6 dietas experimentales basadas en fuentes de proteína de origen animal y/o vegetal con 3 niveles de proteína (bajo, medio y alto) y una dieta comercial, sobre la concentración de las formas orgánicas, inorgánicas, disueltas y particuladas del P y N contenidas en el agua residual del cultivo de *L. vannamei*. Con lo anterior, se observó que la mayor parte del P residual se encontraba en la fase particulada, que la mayor parte del N residual se encontraba en forma de amonio (NH_4^+) y que ambas, tanto la concentración de las formas orgánicas e inorgánicas de P como las de N, aumentaron con el nivel de proteína sin importar la fuente proteica. Utilizar fuentes de proteína vegetal no varió en forma significativa la composición de las diferentes formas residuales de N, pero si disminuyó en forma significativa la concentración de las diferentes formas de P residual. Se observó también que sustituir la harina de pescado por fuentes de

proteína vegetal como la pasta de soya y la harina de trigo, contribuyó en forma significativa tanto a la retención de N como de P, sin afectar parámetros como supervivencia, tasa de crecimiento y peso final.

Aunado a lo anterior y con el fin de obtener la asociación microalga- bacteria heterotrófica a utilizar en la fitorremediación del agua residual del cultivo de *L. vannamei* se realizó el aislamiento, purificación, selección e identificación a nivel molecular de cepas bacterianas nativas que fueran aeróbicas, mostraran capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de NH_4^+ , asimilaran carbohidratos, fueran tolerantes a la actividad antimicrobiana que pudiesen presentar las microalgas, utilizaran fuentes de carbono exudadas por las microalgas seleccionadas, no tuvieran actividad alguicida y fueran capaces para asimilar nutrientes residuales (P y N). Como resultado se obtuvieron 11 cepas de bacterias, las cuales al obtener las secuencias de nucleótidos y compararlas con las de la base de datos de la NCBI, mostraron fuerte similitud con las especies de bacterias: *Rheinheimera aquimaris*, *Kocuria rosea*, *Pseudomonas mendocina*, *Micrococcus luteus* y *Enterococcus faecium*.

En forma paralela, a partir de cultivos de 3 microalgas de origen marino (*Chlorella capsulata*, *Tetraselmis suecica* y *Tetraselmis chui*), se aislaron e identificaron a nivel molecular, 5 cepas de bacterias diferentes las cuales, al obtener las secuencias de nucleótidos y compararlas con las de la base de datos de la NCBI, mostraron fuerte similitud con las especies de bacterias: *Bacillus megaterium*, *Marinobacter salsuginis*, *Marinobacter alkaliphilus*, *Alteromonas macleodii* y *Muricauda lutimaris*. Se evaluó su crecimiento utilizando el medio mineral F/2 variando la fuente de nitrógeno (NaNO_3 , NaNO_2 , NH_4NO_3) y adicionando una fuente de carbono (acetato de sodio o glucosa) y se observó que la combinación F/2 + NO_2^- + acetato de sodio fue la que favoreció el crecimiento de las 5 cepas de bacterias. Adicionalmente, se evaluó el crecimiento de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* utilizando NO_2^- como fuente de nitrógeno en el medio mineral F/2 adicionando o no acetato de sodio y se observó que dicha forma nitrogenada favoreció el crecimiento de las 3 cepas de microalgas en especial, cuando el medio no se encuentra enriquecido con fuentes de carbono, puesto que las mismas, permiten el desarrollo de las cepas de bacterias asociadas a las células microalgales. Se evaluó también,

el crecimiento y la asimilación de nutrientes de *C. capsulata* combinada con las 5 cepas de bacterias aisladas y no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el crecimiento de la microalga en aquellos tratamientos donde se inocularon las diferentes bacterias después de 4 días; mientras que, en el tratamiento donde el medio de cultivo se enriqueció con acetato de sodio y las 5 cepas de bacterias estuvieron presentes desde el inicio del cultivo, sí se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el crecimiento de *C. capsulata*. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la asimilación de NH_4^+ y NO_3^- antes y ni después de inocular las bacterias. Por el contrario, se observaron diferencias significativas en la asimilación de NO_2^- y PO_4^{-3} ($P < 0.05$) después de inocular las bacterias a los cultivos de *C. capsulata*.

Por último, se evaluó la capacidad de asimilación de nutrientes residuales de P y N generados del cultivo de *L. vannamei* por parte de las cepas de microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* así como tres de las cepas de microalgas mayormente utilizadas como alimento en acuicultura (*Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*) en conjunto con un consorcio microbiano utilizado en la industria (Acuicultura Mahr S.A. de C.V., B.C.S., México). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos en la concentración de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , solo se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al analizar la concentración de PO_4^{-3} . No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos sobre la supervivencia, tasa de crecimiento y el peso final de *L. vannamei*. En conclusión, para incrementar la eficiencia del uso de bioflóculos compuestos por microalgas más bacterias, es necesario incorporar especies de microalgas que puedan fijar altas cantidades de CO_2 , que posean alta eficiencia de conversión energética con baja intensidad luminosa así como mayor asimilación de nutrientes residuales.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, asimilación de fósforo y nitrógeno, interacción microalga-bacteria.

ABSTRACT

In the past two decades aquaculture has grown significantly around the world, the production of marine shrimps represents one of the most important aquaculture activities in terms of production value. This model is based on the transformation of agricultural and fishing protein into shrimp biomass. Until 2010, this activity faced overproduction affecting farmers as supply exceeding demand was generated, which declined the product prices with a subsequent increase in production costs since, inputs such as meal and fish oil due to its high price and scarcity became a limiting factor for shrimp's culture development. In addition, the inefficient use of dietary protein by shrimp in autotrophic culture systems is 20 %, while the remaining 80 % is released resulting in serious environmental problems. Therefore, the aim of this study was to evaluate the recovery of residual P and N from *Litopenaeus vannamei* culture, its recycling and its impact on the eco-efficiency using a microalgae-bacteria association in phycoremediation systems.

To achieve this, a feeding trial and a nutrient release bioassay were conducted to determine the growth and P and N retention of juvenile *L. vannamei*, and whether the size of the shrimp or the dietary protein source had an impact on the concentration of organic, inorganic, dissolved or particulate P and N wastes. Six diets with three dietary protein levels (low, medium and high) were tested, three were animal and plant protein based and three were only plant protein based; a commercial diet was used as control. Most of the P was found in the particulate form and most of the residual N was present in the form of ammonium (NH_4^+), the concentration values of organic and inorganic N and P residual forms increased with increasing the protein level regardless of the protein source. The use of vegetal protein sources did not change significantly the different forms of N residuals; nevertheless it was observed that the substitution of fish meal for soybean meal diminishes the quantity of P residual. The substitution of fish meal for soybean meal contributed significantly to the retention of P without affecting N retention or any zootechnical parameters (survival, growth rate, final weight).

In order to obtain the microalgae-bacteria association, native bacterial strains were isolated, purified and identified; as a result, eleven different bacterial strains were obtained. The 16S rDNA gene sequences from isolates were compared to those of NCBI data base and showed strong similarity to the bacterial species: *Rheinheimera aquimaris*, *Kocuria rosea*, *Pseudomonas mendocina*, *Micrococcus luteus*, and *Enterococcus faecium*.

Furthermore, five different cultivable bacterial strains were identified and isolated from *Chlorella capsulata*, *Tetraselmis suecica*, and *Tetraselmis chui* cultures; the 16S rDNA gene analysis revealed that bacterial strains were closely related to *Bacillus megaterium*, *Marinobacter salsuginis*, *Marinobacter alkaliphilus*, *Alteromonas macleodii*, and *Muricauda lutimaris*. The growth of the five bacteria was assessed using F/2 media with different nitrogen (NaNO_3 , NaNO_2 , and NH_4NO_3) and carbon sources (sodium acetate or glucose); F/2 + NO_2^- + sodium acetate was the combination that promoted optimal growth of the five bacteria. Using nitrites as nitrogen source favoured the growth of *C. capsulata*, *T. suecica*, and *T. chui*, especially when the media was not enriched with a carbon source, since sodium acetate promoted the development of bacteria associated with microalgal cells. The presence of *Bacillus megaterium*, *Marinobacter salsuginis*, *Marinobacter alkaliphilus*, *Alteromonas macleodii*, and *Muricauda lutimaris* did not significantly affect growth and nutrient uptake of *C. capsulata* after four days of culture. However, when the culture media was enriched with sodium acetate, the presence of the five bacteria resulted in significant differences in growth ($P < 0.05$). No significant differences ($P > 0.05$) were observed in terms of NH_4^+ or NO_3^- uptake either before or after bacterial inoculation. In contrast, significant differences ($P < 0.05$) were observed in NO_2^- and PO_4^- uptake after bacteria were inoculated into the *C. capsulata* culture.

Finally, a nutrient release bioassay was conducted to determine growth of *L. vannamei* and the P and N residual uptake ability of *C. capsulata*, *T. suecica*, and *T. chui*, as well as three microalgae species used as fed in aquaculture (*Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, and *Chaetoceros calcitrans*), the six of them were mixed with a microbial consortium used in the industry. No significant differences ($P > 0.05$) in NH_4^+ , NO_2^- and NO_3^- between treatments were detected; in contrast, significant differences ($P < 0.05$) were observed in

terms of PO_4^{-3} uptake. The use of the six different microalgae and microbial consortium combinations did not contribute significantly ($P>0.05$) to the survival, growth rate or final weight of *L. vannamei*. In conclusion to increase the efficiency of the process, further studies on bioflocs based on microalgal and bacterial biomass are needed. To incorporate microalgae species with higher nutrient removal rates, high CO_2 fixing and high solar energy conversion efficiencies at low light intensities, could make this system a practical reality.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, phosphorus uptake, nitrogen uptake, microalgae-bacteria interaction.

DEDICATORIA

A Dios por siempre estar conmigo, por llenarme de luz y darme salud, fuerza e inteligencia para alcanzar una meta más en mi vida.

A mi padres por siempre hacer todo lo posible para que yo pueda lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.

A mi esposo Daniel por su amor y apoyo incondicional, por estar siempre conmigo y para mí, te amo.

A mi hermano José Luis por siempre llenar mi vida de alegría.

A todos los integrantes de la familia Magallón Servín, mi segunda familia por brindarme su cariño y apoyo durante esta travesía.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroestes S.C. (CIBNOR) por la oportunidad brindada para llevar a cabo el presente trabajo de investigación y con éste, continuar mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de doctorado con registro 229663.

A mis co-directores de tesis el Dr. Francisco J. Magallón Barajas y la Dra. Ma. Esther Puente por brindarme su amistad, confianza, apoyo y guía durante estos cuatro años y medio para realizar esta investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Bertha O. Arredondo Vega por enseñarme a trabajar con las microalgas, por sus valiosas asesorías y por el apoyo económico brindado al final de mi trabajo, al Dr. Roberto Civera Cerecedo por las facilidades brindadas para la elaboración de los diferentes alimentos experimentales utilizados en este trabajo y por sus valiosas asesorías y al Dr. Edemar Andreatta por su buena disposición y aportaciones enriquecedoras.

A la Dra. Rosalía Servín Villegas por brindarme su cariño, apoyo y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

A los técnicos del Laboratorio de Análisis Químico Proximal Sonia G. Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga por la asesoría en el análisis de las diferentes muestras de insumos y alimentos. A los técnicos del Laboratorio de Análisis Químico de Agua Ibán

Murillo Murillo y Celina Beltrán Camacho por su asesoría en el análisis de las diferentes muestras de agua. A Ernesto Goytortúa Bores del Laboratorio de Nutrición Acuícola por su apoyo y asesoría en la elaboración de los alimentos balanceados utilizados en los bioensayos. A Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por su asesoría en el análisis de muestras y a Victor Manuel Moyrón Ibarra del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico por el apoyo en la obtención de cultivos bacteriológicos.

A Marte Virgen Felix por su asesoría y apoyo con las diferentes cepas de microalgas utilizadas. A los técnicos del Laboratorio de Microalgas Julián A. Garzón Favela, Cynthia E. Avilés Aldana y Adriana Yee Greene por su apoyo con la producción de los cultivos de las diferentes cepas de microalgas utilizadas en los bioensayos. A Jesús Martín Ramírez Orozco del Laboratorio de Biomedicina Bioquímica Celular por su apoyo y gran aportación en la identificación molecular de las diferentes cepas de bacterias aisladas.

A Norma A. Ochoa Álvarez del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme el mundo de la microbiología, por sus consejos, asesorías y apoyo durante la realización de los diferentes experimentos. A Sandra De La Paz Reyes por sus asesorías en el trabajo con los camarones, por apoyarme sobre manera en los bioensayos realizados en las instalaciones del Laboratorio de Crustáceos y a ambas porque desde el comienzo me brindaron su amistad y cariño.

A Emerson Carlo Zuñiga Mayoral del Laboratotio de Servicios Analíticos por su apoyo en el análisis de las diferentes muestras de agua. A Jenny y Alondra por su valioso apoyo en el análisis de las diferentes muestras y a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo, muchas gracias.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. ANTECEDENTES -----	4
2.1 Panorama mundial sobre la acuicultura-----	4
2.2 Cultivo de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)-----	4
2.2.1 Ineficiencia en el aprovechamiento de la proteína en los cultivos de camarón-----	7
2.3 Asimilación de residuales en acuicultura de camarón-----	9
2.4 Fitorremediación, biotecnología para el tratamiento de aguas residuales del cultivo de <i>L. vannamei</i> -----	10
-----	12
2.5 Importancia y uso de flora natural en el cultivo de camarón-----	12
2.6 Microalgas para la acuicultura-----	13
2.6.1 Composición química y valor nutricional de las microalgas-----	14
2.7 Fitorremediación, reciclamiento de bioproductos y reemplazo parcial de harina y aceite de pescado-----	15
-----	16
2.8 Bacterias heterotróficas en acuicultura marina-----	16
2.9 Asociaciones Microalga-Bacteria-----	17
3. JUSTIFICACIÓN -----	20
4. OBJETIVOS -----	20
4.1 Objetivo General-----	20
4.2 Objetivos Específicos-----	21
5. HIPÓTESIS -----	21

6. MATERIAL Y MÉTODOS -----	22
6.1 Diseño y manufactura de dietas experimentales basadas en proteína vegetal y animal-----	22
6.2 Organismos-----	26
6.3 Bioensayo de retención proteica-----	26
6.4 Bioensayo de liberación de nutrientes (P y N)-----	27
6.5 Análisis estadístico-----	29
6.6 Bacterias heterotróficas con potencial para procesos de ficorremediación-----	30
6.6.1 Fuentes para la selección de bacterias heterótroficas nativas-----	30
6.6.1.1 Sistemas de cultivo de camarón (<i>L. vannamei</i>) -----	30
6.6.1.2 Sistemas heterotróficos de cultivo de camarón-----	31
6.6.1.3 Cultivos de microalgas clorofitas con aireación sin filtración-----	31
6.6.2 Aislamiento, purificación y selección de cepas bacterianas en medios selectivos-----	31
6.6.3 Evaluación de la actividad amilolítica y solubilización de fosfatos-----	32
6.6.4 Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias heterótroficas mediante bioensayos de cultivo en extractos microalgales-----	33
6.6.4.1 Cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	33
6.6.4.2 Extractos de la biomasa proveniente de los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	34
6.6.4.3 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano-----	34
6.6.5 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de las bacterias heterotróficas seleccionadas-----	36
6.6.6 Conservación de las cepas de bacterias heterotróficas seleccionadas e identificadas a nivel molecular-----	37
6.7 Microalgas candidatas para procesos de ficorremediación-----	37
6.7.1 Cepas utilizadas-----	37
6.7.2 Aislamiento y purificación de la flora bacteriana de las cepas de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	38
6.7.3 Tratamientos evaluados para la purificación de los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	40
6.7.3.1 Antibiógramas-----	40
6.7.3.2 Evaluación de gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina y su mezcla para eliminar la flora bacteriana presente en los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	40
6.7.3.3 Evaluación de gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, vancomicina, neomicina y su mezcla para eliminar la flora bacteriana presente en los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	41
6.7.4 Aislamiento de las cepas de bacterias persistentes de los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> después del tratamiento con diferentes antibióticos y centrifugación-----	43
6.7.5 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de la flora bacteriana de acompañamiento de los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	43
6.7.6 Conservación de las cepas de bacterias heterotróficas seleccionadas e identificadas a nivel molecular-----	44
6.7.7 Evaluación de la actividad extracelular amilasa y solubilización de fosfatos de la flora bacteriana presente en los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	45
6.7.7.1 Actividad Amilolítica-----	45
6.7.7.2 Solubilización de Fosfatos-----	45

6.7.8 Pruebas de antagonismo entre los componentes de la flora bacteriana presente en los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	46
6.7.9 Evaluación del crecimiento de la flora bacteriana presente en los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) modificado con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono-----	47
6.7.10 Evaluación del crecimiento de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ con y sin acetato de sodio 1 %-----	48
6.7.11 Evaluación del crecimiento de <i>C. capsulata</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ con diferentes porcentajes de acetato de sodio-----	49
6.7.12 Evaluación del crecimiento de <i>C. capsulata</i> en presencia de su flora bacteriana-----	50
6.7.13 Análisis estadístico-----	52
6.8 Bioensayo del cultivo experimental de <i>L. vannamei</i> utilizando asociaciones microalga-consorcio bacteriano para procesos de fitorremediación-----	53
6.8.1 Análisis estadístico-----	56
7. RESULTADOS -----	57
7.1 Análisis químico proximal, contenido energético y humedad de las seis dietas experimentales basadas en fuentes de proteína animal y vegetal-----	57
7.2 Evaluación de la concentración de las diferentes formas de P y N residuales-----	58
7.3 Retención de P y N-----	60
7.4 Efecto de la fuente de proteína utilizada en las dietas experimentales sobre los parámetros de producción de <i>L. vannamei</i> -----	61
7.5 Bacterias heterotróficas con potencial para procesos de fitorremediación-----	62
7.5.1 Cepas de bacterias heterotróficas nativas de: sistemas de cultivo de <i>L. vannamei</i> , sistemas heterotróficos de cultivo de camarón y cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> con aireación sin filtración-----	62
7.5.2 Actividad amilolítica y solubilización de fosfatos-----	63
7.5.3 Inhibición del crecimiento bacteriano por acción de extractos microalgales-----	67
7.5.4 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de las bacterias heterotróficas seleccionadas-----	68
7.6 Microalgas candidatas para procesos de fitorremediación-----	69
7.6.1 Flora bacteriana perteneciente a los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	69
7.6.1.1 Aislamiento, purificación e identificación molecular por secuenciación del 16S rRNA-----	71
7.6.1.2 Capacidad amilolítica, capacidad para solubilizar fosfatos (PO ₄) y pruebas de inhibición-----	73
7.6.1.3 Crecimiento en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono-----	73
7.6.2 Cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> -----	73
7.6.2.1 Crecimiento en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ ⁻ con y sin acetato de sodio 1 %-----	73
7.6.2.2 Crecimiento de <i>C. capsulata</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) enriquecido con diferentes concentraciones de acetato de sodio-----	76

7.6.2.3 Evaluación del crecimiento y asimilación de nutrientes de <i>C. capsulata</i> en presencia de su flora bacteriana-----	77
7.7 Cultivo experimental de <i>L. vannamei</i> utilizando asociaciones microalga-consorcio bacteriano para procesos de fitorremediación-----	82
7.7.1 Efecto de las diferentes combinaciones microalga-consorcio microbiológico sobre los parámetros de producción de <i>L.vannamei</i> -----	82
7.7.2 Evaluación de la concentración de N y P residuales-----	84
8. DISCUSIÓN -----	87
8.1 Diferentes formas residuales de P y retención de P en la biomasa de <i>L.vannamei</i> -----	87
8.2 Diferentes formas residuales de N y retención de N en la biomasa de <i>L.vannamei</i> -----	89
8.3 Efecto de la sustitución de la harina de pescado por pasta de soya sobre los parámetros de producción-----	91
8.4 Bacterias heterotróficas aisladas con propósitos de fitorremediación-----	93
8.5 Microalgas candidatas para procesos de fitorremediación y su comportamiento en presencia de una fuente de carbono y su flora bacteriana de acompañamiento-----	95
8.6 Efecto de las diferentes combinaciones microalga-consorcio microbiológico sobre los parámetros de producción y la composición del agua residual del cultivo de <i>L. vannamei</i> -----	109
9. CONCLUSIONES -----	113
10. LITERATURA CITADA -----	115
11. ANEXOS -----	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Sistema experimental utilizado en los bioensayos de liberación de nutrientes.-----	28
Figura 2.- Distribución de los sensidiscos embebidos con los diferentes extractos utilizados para las pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano.-----	35
Figura 3.- Sistema de aireación que genera el burbujeo para la formación de biopelículas en los sistemas de cultivo de <i>L.vannamei</i> . -----	55
Figura 4.- Cepa de bacteria aislada de Sistemas de cultivo <i>L. vannamei</i> (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) que presentó crecimiento tanto en el medio AN + NaCl 2 %, como en el medio selectivo basado en la relación Redfield. -----	63
Figura 5.- Cepas de bacterias aisladas de: (A) sistemas de cultivo <i>L. vannamei</i> (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) y (B) sistemas heterotróficos de cultivo de <i>L. vannamei</i> (Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR) que resultaron positivas a la evaluación de la capacidad amilolítica.-----	66
Figura 6.- Cepas de bacterias aisladas de cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> con aireación sin filtración que resultaron positivas a la evaluación de la solubilización de fosfatos. -----	66
Figura 7.- Cepas de bacterias aisladas de: (A) sistemas de cultivo <i>L. vannamei</i> (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) y (B) cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> con aireación sin filtración que no fueron inhibidas por extractos microalgales.-----	67
Figura 8.- Cepas de bacterias <i>Marinobacter salsuginis</i> y <i>Marinobacter alkaliphilus</i> que resultaron positivas en la evaluación de la capacidad amilolítica.-----	72
Figura 9.- Placas control con medio marino 2216 (Zobel 1941) sin inoculación de cepas bacterianas y placas inoculadas con suspensiones bacterianas y bocados con cultivos de bacterias utilizadas para las pruebas de inhibición de crecimiento. -----	72
Figura 10.- Curvas de crecimiento de <i>Chlorella capsulata</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ ⁻ con y sin acetato 1 %. -----	74
Figura 11.- Curvas de crecimiento de <i>Tetraselmis suecica</i> en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ ⁻ con y sin acetato 1 %. -----	75

- Figura 12.-** Curvas de crecimiento de *Tetraselmis chui* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻ con y sin acetato 1 %.----- 75
- Figura 13.-** Curvas de crecimiento de *Chlorella capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻ enriquecido con diferentes porcentajes de acetato de sodio. ----- 76
- Figura 14.-** Curvas de crecimiento de *Chlorella capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻ en presencia de su flora bacteriana. CC: *Chlorella capsulata*; BM: *Bacillus megaterium*; MS: *Marinobacter salsuginis*; MA: *Marinobacter alkaliphilus*; AM: *Alteromonas macleodii*; ML: *Muricauda lutimaris*; T0 y T4: Tiempo de inoculación de las diferentes bacterias a los cultivos de *C. capsulata*. ----- 78
- Figura 15.-** Tasa de crecimiento (g semana⁻¹) de *L. vannamei* durante 32 d en cultivos experimentales enriquecidos con la combinación de diferentes microalgas y un consorcio microbiano.----- 83
- Figura 16.-** Ganancia en peso (g) de *L. vannamei* durante 32 d en cultivos experimentales enriquecidos con la combinación de diferentes microalgas y un consorcio microbiano.----- 83
- Figura 17.-** Supervivencia de *L. vannamei* después de 32 d en cultivos experimentales enriquecidos con la combinación de diferentes microalgas y un consorcio microbiano. -- 84

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Cantidad utilizada de los diferentes insumos empleados en la elaboración de las seis dietas experimentales para <i>L. vannamei</i> basadas en proteína animal y vegetal.-----	23
Tabla II.- Técnicas utilizadas en el laboratorio de análisis químico proximal, CIBNOR, S.C. -----	25
Tabla III.- Tratamientos utilizados para la evaluación del crecimiento de <i>C. capsulata</i> en presencia de su flora bacteriana.-----	50
Tabla IV.- Tratamientos evaluados en el experimento del cultivo experimental de <i>L. vannamei</i> utilizando asociaciones microalga-bacteria heterotrófica para procesos de fitorremediación.-----	54
Tabla V.- Composición proximal (media \pm DS), humedad, energía y contenido de nitrógeno y fósforo de las seis dietas experimentales para <i>L. vannamei</i> basadas en proteína vegetal y animal.-----	57
Tabla VI.- Concentración (mg L ⁻¹ ; media \pm DS) de las diferentes formas de fósforo (orgánico, inorgánico y particulado) en el agua residual del cultivo de <i>L. vannamei</i> alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial. -----	58
Tabla VII.- Concentración (mg L ⁻¹ ; media \pm DS) de las diferentes formas de nitrógeno (orgánico, inorgánico y particulado) en el agua residual del cultivo de <i>L. vannamei</i> alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial. -----	59
Tabla VIII.- Concentración (mg L ⁻¹ ; media \pm DS) de los componentes (NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ y NO ₂ ⁻) del nitrógeno inorgánico disuelto en el agua residual del cultivo de <i>L. vannamei</i> alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial. -----	60
Tabla IX.- Contenido y retención de fósforo y nitrógeno (media \pm DS) por parte de <i>L. vannamei</i> alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.-----	61
Tabla X.- Parámetros de producción (media \pm DS) de <i>L. vannamei</i> alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial. -----	62
Tabla XI.- Evaluación de la capacidad amilolítica (24 h) de los diferentes morfotipos bacterianos que presentaron crecimiento en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934).-----	64

Tabla XII.- Evaluación de la capacidad amilolítica (48 h) de los diferentes morfotipos bacterianos que presentaron crecimiento en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934).-----	65
Tabla XIII.- Identificación molecular de los morfotipos de bacterias no inhibidas por los extractos de las microalgas <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> . -----	68
Tabla XIV.- Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de los cultivos de <i>C. capsulata</i> , <i>T. suecica</i> y <i>T. chui</i> . -----	71
Tabla XV.- Tasa de crecimiento y concentración celular (media \pm DS) del cultivo de <i>Chlorella capsulata</i> en el medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ ⁻ , enriquecido con acetato de sodio.-----	77
Tabla XVI.- Tasa de crecimiento y concentración celular (media \pm DS) del cultivo de <i>Chlorella capsulata</i> en presencia de su flora bacteriana en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO ₂ ⁻ . -----	79
Tabla XVII.- Concentración (μ ; media \pm DS) de NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ y PO ₄ ⁻³ en los cultivos de <i>Chlorella capsulata</i> adicionados con las cepas de bacterias aisladas. -----	81
Tabla XVIII.- Concentración (μ ; media \pm DS) de NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ y PO ₄ ⁻³ en los cultivos experimentales de <i>L. vannamei</i> adicionados con diferentes combinaciones de microalga más consorcio microbiano. -----	86

ABREVIATURAS

N. -----	Nitrógeno
P. -----	Fósforo
HP. -----	Harina de pescado
HT. -----	Harina de trigo
HC. -----	Harina de calamar
PS. -----	Pasta de soya
DAV_(B). ----	Dieta experimental con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal
DAV_(M). ----	Dieta experimental con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal
DAV_(A). ----	Dieta experimental con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal
DV_(B). -----	Dieta experimental con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal
DV_(M). -----	Dieta experimental con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal
DV_(A). -----	Dieta experimental con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal
DC. -----	Dieta comercial
BLN₁. -----	Primer bioensayo de liberación de nutrientes
BLN₂. -----	Segundo bioensayo de liberación de nutrientes
PT. -----	Fósforo total
PID. -----	Fósforo inorgánico disuelto
POD. -----	Fósforo orgánico disuelto
PP. -----	Fósforo particulado
NT. -----	Nitrógeno total
NID. -----	Nitrógeno inorgánico disuelto
NOD. -----	Nitrógeno orgánico disuelto
NP. -----	Nitrógeno particulado
NH₄⁺. -----	Amonio
NO₂⁻. -----	Nitritos
NO₃⁻. -----	Nitratos
PO₄⁻³. -----	Fosfatos
AN. -----	Agar nutritivo
TSA. -----	Agar soya tripticasa
CLOR. ----	Cloranfenicol
GM. -----	Gentamicina
KM. -----	Kanamicina
NM. -----	Neomicina
TE. -----	Tetraciclina
VM. -----	Vancomicina
AM. -----	<i>Alteromonas macleodii</i>
BM. -----	<i>Bacillus megaterium</i>
MA. -----	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>

ML. -----	<i>Marinobacter lutimaris</i>
MS. -----	<i>Marinobacter salsuginis</i>
CC. -----	<i>Chlorella capsulata</i>
TS. -----	<i>Tetraselmis suecica</i>
TC. -----	<i>Tetraselmis chui</i>
IG. -----	<i>Isochrysis galbana</i>
PL. -----	<i>Pavlova lutheri</i>
CHC. -----	<i>Chaetoceros calcitrans</i>
CM. -----	Consorcio microbiano

1. INTRODUCCIÓN

Una práctica acuícola exitosa es el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) el cual, depende directamente de la proteína de origen pesquero y agrícola. La industria de la acuicultura proporciona el 89 % de la producción total mundial de dicha especie (FAO, 2008, 2010) y hasta 2010, se presentó una sobreproducción de este cultivo lo que afectó directamente a los acuicultores puesto que, generó una oferta superior a la demanda; teniendo como resultado una disminución en los precios del producto con un subsecuente aumento en los costos de producción.

Por encarecimiento de los precios de insumos como las harinas de pescado, aceites, cereales y soya, los márgenes de utilidad se redujeron y tanto la harina de pescado como el aceite, se convirtieron en una limitante para el desarrollo de la acuicultura. Lo anterior representa uno de los principales problemas de desarrollo económico que la acuicultura dependiente de proteína de origen pesquero enfrenta, ya que dichos insumos son recursos limitados.

De acuerdo con ello, el dilema se encuentra relacionado con la falta de metodologías para superar los niveles de ecoeficiencia existentes (alrededor del 20 %) en el aprovechamiento de la proteína suministrada a los sistemas de cultivo de camarón (Cabanillas *et al.* 2001; Pérez-Velázquez *et al.* 2008; Tacon *et al.* 2002), y en los altos porcentajes de nitrógeno y fósforo residuales (80 % aproximadamente) que al no ser aprovechados, se depositan en ecosistemas adyacentes donde provocan serios problemas de eutrofización, agravándose con el advenimiento de enfermedades virales epidémicas que impactan en ecoeficiencias menores y empeoran con el uso de sistemas abiertos de producción.

Dicha problemática, puede aminorarse utilizando sistemas acuícolas cerrados de recirculación que disminuyan el ingreso de patógenos, acoplados con sistemas de ficorremediación, biotecnología que emplea macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes presentes en agua o aire, basada en la capacidad de dichos organismos fotosintéticos para metabolizar nitrógeno, fósforo, diversos ácidos orgánicos y metales pesados (Olguín, 2003).

Las microalgas juegan un papel predominante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos cultivados, siendo altamente nutritivas y fáciles de ingerir debido al tamaño que poseen (Riquelme y Avendaño 2003).

No obstante, en los sistemas de producción acuícola es muy difícil e impráctico trabajar con cultivos axénicos de microalga, debido a que las células microalgales pueden secretar sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano. De esta forma el alimento utilizado en los sistemas de cultivos es mixto y está compuesto por una especie de microalga y una o varias bacterias asociadas, dependiendo de la especie de microalga cultivada. La presencia de bacterias en los sistemas de producción de microalgas puede generar competición por los nutrientes inorgánicos disponibles en la columna de agua (Currie y Kalff 1984; Joint y Morris 1982; Joint *et al.* 2002).

La absorción de nutrientes por parte de la comunidad microalgal, depende de numerosos factores como el tamaño de la célula (relación superficie-volumen), el hecho de que sea o no inducido, un sistema de transporte de nutrientes y la densidad de los componentes de dicho sistema asociados a la membrana celular. De ahí que el tamaño considerablemente menor de las bacterias en comparación con el de las microalgas, les permita una absorción más rápida de las diferentes formas inorgánicas disueltas de nitrógeno y fósforo; lo que puede resultar en la limitación de la producción primaria (Currie y Kalff 1984).

Sin embargo, el suministro de nutrientes esenciales puede cambiar la interacción microalga-bacteria de competencia a mutualismo (Vadstein 2000) o bien, dependiendo de las condiciones ambientales, dicha interacción puede resultar en una sinergia (Grossart 1999). Lo anterior, sugiere que las interacciones varían según el tipo de bacteria y microalga, de las concentraciones de nutrientes y de las condiciones del ambiente en el cual interactúen.

Por lo tanto, este trabajo de investigación se encuentra orientado en la obtención de un mecanismo basado en la formulación de dietas con criterios tanto nutricionales, como de reciclamiento de residuales, que pueda emplearse en el tratamiento de las aguas residuales generadas del cultivo de *L. vannamei* para asimilar los compuestos de nitrógeno, fósforo y

carbón residuales, que a su vez, puedan ser reciclados en forma de biomoléculas con valor nutricional como fuente de ácidos grasos (microalgas) y proteína (bacterias) para ser utilizada como alternativa de alimento en la acuicultura.

2. ANTECEDENTES

2.1 Panorama mundial sobre la acuicultura

La acuicultura dependiente del suministro de proteína, como cultivos de peces y crustáceos, básicamente transforma la proteína de origen pesquero y agrícola en proteína acuícola, bien en forma directa o indirecta, desempeña un papel importante en los medios de subsistencia de millones de personas en todo el mundo, puesto que genera alimento de origen animal y constituye una importante fuente de proteínas, empleo e ingresos.

La acuicultura mundial se ha incrementado significativamente en los últimos 50 años. En la actualidad, representa el 76 % de la producción mundial de peces de aleta de agua dulce y el 65 % de la producción de moluscos y peces diádromos, lo cual, indica que dicha actividad continúa creciendo a un ritmo mayor que otros sectores que generan productos de origen animal.

Debido a su constante crecimiento, esta importante actividad, se encuentra por primera vez en disposición de proporcionar la mitad del pescado consumido por la población humana a nivel mundial, en una etapa en la que la pesca ha llegado a sus límites de explotación. Lo cual, es un reflejo no sólo de la vitalidad del sector de la acuicultura sino también del crecimiento económico mundial así como de los continuos avances en la elaboración y comercio de productos pesqueros. Actualmente, contribuye con el 40 % de la producción mundial de productos de origen acuático y se estima que para el 2030 se incrementará hasta un 60 % (FAO 2008, 2010).

2.2 Cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

Los métodos de producción de camarón han cambiado y mejorado en los últimos años. Durante la década de los 80's la producción de camarón se realizaba en estanques que ocupaban grandes superficies con densidades de población bajas. Para la década de los 90's, las estrategias en la producción de *L. vannamei* cambiaron al incluir mejores tecnologías como la fertilización, el uso de bandejas para la alimentación, el incremento en

las densidades de población en los estanques, la reducción en el uso del agua con fines de recambio en los sistemas de cultivo, lo cual, permitió disminuir el volumen de aguas residuales, así como el impacto negativo en los ecosistemas adyacentes a las granjas (Wasiolesky *et al.* 2006).

El incremento de la actividad acuícola en años recientes (Cuzon *et al.* 2004; Rocha *et al.* 2004) no solo ha enfrentado problemas ambientales, sino también fuertes problemas sanitarios causados por diferentes microorganismos como el caso del virus del síndrome del taura (Brock *et al.* 1997), el virus de la mancha blanca (Lightner 1999) y otros problemas ocasionados por mionecrosis (Lightner y Pantoja 2004).

Con el uso de estanques de cultivo sin recambio de agua, se reduce el riesgo de introducción y propagación de enfermedades en el sistema. También, se generan condiciones adecuadas que favorecen el crecimiento de la “producción natural” la cual, provee beneficios en la nutrición del camarón además de impactar en forma positiva sobre la calidad del agua de cultivo (Arnold *et al.* 2006, 2009; Bratvold y Browdy 2001; Burford *et al.* 2003, 2004; Cupertino *et al.* 2007; Khatoon *et al.* 2009; Moss *et al.* 2001; Samocha *et al.* 2001; Weirich *et al.* 2002).

El máximo rendimiento sustentable estimado para la captura de camarón de los océanos del mundo, es de 1.6 millones de toneladas métricas (Páez-Osuna 2001). Debido a las demandas futuras de este producto, la acuicultura es la práctica que podría satisfacer dichos requerimientos puesto que, de acuerdo con lo reportado por FAO (2008) la acuicultura proporciona el 89 % de la producción total mundial de camarón.

Hasta 2010 se presentó una sobreproducción de dicho cultivo, la cual, afectó directamente a los acuicultores pues generó una oferta superior a la demanda; disminuyendo los precios del producto con un subsecuente aumento en los costos de producción. Además de impactar en forma negativa los ecosistemas adyacentes con las descargas de aguas residuales sin previo tratamiento (Rosenberry 2001; Schuler *et al.* 2010).

Uno de los principales insumos utilizados en la elaboración de alimentos balanceados para camarón, es la harina de pescado. La cual, es considerada una de las fuentes principales de proteína, su alta calidad y concentración de nutrientes esenciales en especial la variedad de aminoácidos (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina), ácidos grasos (ω -3, ω -6), contenido energético, vitaminas (complejo B, especialmente vitamina B12, niacina, colina, ácido pantoténico y riboflavina) y minerales, hacen de la harina de pescado un ingrediente indispensable en las dietas de la mayoría de las especies cultivadas en acuicultura (Miles y Chapman 2006). La harina de pescado se ha convertido en un factor limitante para la acuicultura puesto que, la demanda ha sobrepasado su producción y con lo anterior, se está llegando a los límites de explotación de los recursos pesqueros disponibles, teniendo como consecuencia que los precios tanto de la harina como del aceite de pescado se incrementen afectando a los márgenes de utilidad (Ye *et al.* 2010).

La acuicultura depende del uso de animales acuáticos como fuente de proteína y las limitaciones que se prevén para el abastecimiento de dichos insumos, permite visualizar el uso creciente de fuentes proteicas de origen vegetal. Por esta razón, el uso de insumos proteicos no acuícolas, representaría un beneficio ambiental reduciendo la presión sobre los recursos marinos para la obtención de alimentos balanceados para el cultivo de camarón (Hu *et al.* 2008). Como resultado, se han llevado a cabo diversas investigaciones con diferentes grados de éxito en las que se pretende reemplazar en forma parcial o total la harina de pescado por ingredientes de menor costo y más sustentables, que contengan las características necesarias para igualar o mejorar la calidad nutricional de los alimentos basados en harina de pescado. Ejemplo de lo anterior, es el uso de proteína de origen vegetal que, gracias a su bajo precio y calidad consistente, representa a menudo una fuente de proteína económica y nutricional (Amaya *et al.* 2007; Beiping *et al.* 2005; Davis *et al.* 2002; Foster *et al.* 2003; Galicia-González 2009; Hernández *et al.* 2004; Luke *et al.* 2009). Sin embargo, su uso en acuicultura es frecuentemente limitado (Davis y Arnold 2000) debido a los bajos niveles de aminoácidos esenciales y poca palatabilidad. Otras opciones como el uso de alimento para la producción avícola (Davis y Arnold 2000; Amaya *et al.*

2007) y para la producción porcina (Hernández *et al.* 2008), han demostrado su viabilidad al reemplazar parcialmente la harina de pescado en dietas balanceadas.

La composición lipídica de los organismos marinos incluyendo los camarones ha sido extensamente estudiada. En parte para determinar los requerimientos nutricionales de las especies sometidas al cultivo y por otro lado, por su importancia en la nutrición humana debido a que representan una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ω -3. De acuerdo a diferentes estudios realizados, tanto el porcentaje de lípidos como el perfil de ácidos grasos de los camarones, varía de acuerdo a la dieta suministrada (Lim 1996), al alimento natural disponible y a las condiciones de cultivo de los organismos (Araujo y Lawrence 1993).

Si bien la producción de alimentos acuícolas representa un beneficio en la alimentación humana, el crecimiento de la acuicultura ha sido cuestionado por diferentes componentes de la sociedad, los cuales advierten los riesgos del desarrollo de dicha actividad en temas pertinentes a la huella ecológica, la modificación del hábitat y la eutrofización de ecosistemas acuáticos. Por otra parte, este rápido crecimiento también enfrenta problemas sanitarios y en algunos casos epidémicos con nuevos patógenos que han surgido con el desarrollo de la acuicultura; ambos problemas implican retos importantes para el desarrollo sustentable de dicha actividad.

2.2.1 Ineficiencia en el aprovechamiento de la proteína suministrada a los cultivos de camarón

La ecoeficiencia con la que se utiliza el nitrógeno en actividades acuícolas como la camaronicultura, depende del sistema tecnológico que se utilice. En sistemas autotróficos donde el nitrógeno (N) y fósforo (P) residuales son asimilados por una comunidad autotrófica, la ecoeficiencia en el uso del N, es de alrededor del 20 % (Avnimelech y Ritvo 2003; Cabanillas *et al.* 2001; Pérez-Velázquez *et al.* 2008; Tacon *et al.* 2002.), mientras que el 80 % restante es liberado a los ecosistemas adyacentes para su asimilación por los

servicios ecosistémicos. Lo anterior implica que por cada 5 kg de proteína que se utiliza en la producción de camarón, solo 1 kg es transferido a la alimentación humana y los 4 kg restantes, se convierten en formas residuales que generan problemas de eutrofización dentro de los sistemas de cultivo y en los ecosistemas adyacente a las granjas de producción (Magallón 2006). La recuperación de dichos residuales es uno de los retos más importantes que enfrenta actualmente esta actividad económica.

Las evaluaciones de nutrientes residuales en la acuicultura autotrófica se han realizado al calcular la diferencia entre el N y P suministrado en alimentos y fertilizantes con el recuperado en el producto final (Magallón 2006). El problema de este método, consiste en que si bien permite evaluar la eficiencia en el uso del N y P, no permite conocer la forma en que dichos residuales fluyen tanto en el sistema de cultivo como en el ambiente.

El método de balance de masas, considera la variación de los niveles de N y P entre las entradas y salidas de los sistemas de cultivo (Casillas *et al.* 2006), pero no permite identificar la composición de los nutrientes residuales en el momento en que se generan, debido a la combinación de la velocidad con la que los sistemas autotróficos asimilan las formas inorgánicas tanto del N como del P y a la velocidad con la que dichos nutrientes se acumulan en los sedimentos y se regeneran (Burford y Longmore 2001; Burford y Lorenzen 2004). Por esta razón, es común encontrar bajos niveles de N y P inorgánicos, entre ellos el amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4^{3-}), que son asimilados por la comunidad autotrófica presente en los sistemas de cultivo. La composición de las diferentes formas inorgánicas de N puede variar de acuerdo con las densidades de cultivo en niveles superiores a 180 organismos m^{-2} . Debido a estas condiciones, la generación de NH_4^+ residual puede superar la capacidad de asimilación del sistema de cultivo, teniendo como resultado altas concentraciones de NH_4^+ en el agua residual (Burford y Lorenzen 2004).

La evaluación de residuales utilizando estudios de excreción nitrogenada, ha permitido valorar la generación de NH_4^+ y urea como formas del N residual. A lo largo de la historia, dichos estudios se han visto limitados debido a que son realizados bajo condiciones de ayuno y reposo, enfocándose en las formas inorgánicas más que en las orgánicas. No

obstante, estudios de excreción post-alimenticias han demostrado que las formas orgánicas también son importantes. La generación de residuales de N y P en condiciones post-alimenticias controladas, comprende al menos seis complejos de residuales integrados por formas de N y P orgánicas e inorgánicas, particuladas y solubles que pueden variar de manera importante con el nivel de proteína de las dietas suministradas y el tamaño de los organismos (Calderón 2007).

La disminución en los niveles de inclusión de la harina de pescado y el uso cada vez mayor de fuentes de proteína de origen vegetal puede influir en la composición de residuales de N y P. Para reutilizar los nutrientes residuales de N y P, es importante conocer cómo se modifica la composición de éstos de acuerdo a la disminución en el contenido de harina y aceite de pescado. Este conocimiento es necesario para la selección de microorganismos que contribuyan a la asimilación y reciclaje de residuales generados del cultivo de camarón.

2.3 Asimilación de residuales en sistemas de cultivo de *L. vannamei*

En sistemas de acuicultura donde se utilizan altas densidades de siembra, el aumento en los niveles de NH_4^+ es considerado el segundo factor limitante después del oxígeno. Para disminuir este problema se han utilizado tres vías para la conversión del NH_4^+ : (a) la asimilación y remoción fotoautotrófica por medio de algas y/o microalgas, (b) la conversión de NH_4^+ en nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) por medio de bacterias oxidadoras del amonio y nitrificantes, y (c) la conversión del NH_4^+ en biomasa bacteriana por medio de bacterias heterotróficas (Ebeling *et al.* 2006).

En la última década se ha intentado incrementar la ecoeficiencia en el uso del N a niveles cercanos al 50 %, similar a los que opera la industria agropecuaria (Han *et al.* 2001; Rotz 2004). La mejor aproximación a este nivel de ecoeficiencia se ha logrado en la camaronicultura con el uso de sistemas de cultivo heterotróficos, donde los residuales de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en la forma de NH_4^+ son reasimilados por la comunidad autotrófica y heterotrófica en forma de aminoácidos. Aún cuando los niveles de

ecoeficiencia en el uso del N pueden aproximarse a aquellos de la industria agropecuaria, estos sistemas no permiten resolver el 50 % restante del N residual (James *et al.* 2006). Los sistemas heterotróficos, poseen la ventaja de operar a mayores densidades de cultivo en comparación con los sistemas autotróficos, puesto que utilizan menor área y menores volúmenes de agua, pero los requerimientos energéticos son mayores, ya que, pueden necesitar de 30 a 80 Hp ha⁻¹ (Azim y Little 2008). Lo anterior se debe a que el procesamiento heterotrófico de residuales dentro del sistema de cultivo, demanda el uso de energía para mantener condiciones de oxigenación y de mezcla. Adicionalmente se requiere un aporte de carbón orgánico con objeto de estimular la asimilación heterotrófica del NH₄⁺, además de generar pérdida en la producción por riesgos sanitarios y caídas en los niveles de oxígeno (Avnimelech 2006). En estos sistemas, recientemente se han detectado niveles crecientes de NO₃⁻ y NO₂⁻ debidos al incremento inadvertido de bacterias nitrificantes, combinado con el escaso desarrollo de componentes autotróficos como las microalgas que puedan asimilarlos (Azim y Little 2008; Pérez-Velázquez *et al.* 2008).

2.4 Fitorremediación: biotecnología potencial para el tratamiento de aguas residuales del cultivo de *L. vannamei*

La calidad y cantidad de los desechos producidos en acuicultura, dependen de los sistemas de cultivo, las especies a producir y la calidad de los alimentos suministrados. De acuerdo con lo anterior, los principales desechos que pueden encontrarse son: alimento no consumido por los organismos, heces, nutrientes disueltos, compuestos orgánicos disueltos y algunos químicos o fertilizantes. Los sistemas de cultivo en acuicultura producen grandes cantidades de materia orgánica y nutrientes (N y P) que son considerados limitantes para el crecimiento de los organismos en sistemas acuáticos (Hua y Bureau 2006). Dichos residuales impactan en forma negativa al ser descargados en ecosistemas adyacentes sin tratamiento alguno, debido a que altas concentraciones de materia orgánica reducen los niveles de oxígeno disuelto y contribuyen con la formación de sedimentos y la producción excesiva de fitoplancton (Ghaly *et al.* 2005).

La ficorremediación, es una biotecnología que emplea macroalgas o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes presentes en agua o aire y se basa en la capacidad de dichos organismos fotosintéticos para metabolizar nitrógeno, fósforo, varios ácidos orgánicos y metales pesados (Olguín 2003). Se considera una biotecnología ambientalmente pertinente ya que contribuye al uso sustentable de los recursos naturales con un impacto positivo en el ambiente (Olguín 2004).

De acuerdo con estudios realizados por Olguín (2003, 2008) y Muñoz y Guieysse (2006), algunas de sus aplicaciones son:

- (a) Remoción de nutrientes de aguas residuales y de efluentes ricos en materia orgánica.- Las microalgas pueden asimilar una cantidad significativa de nitrógeno y fósforo para así sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos.
- (b) Disminución de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).- Estos tipos de microorganismos, durante el crecimiento fotoautótrofo liberan de 1.5 a 1.92 kg O₂ kg⁻¹ de biomasa producida.
- (c) Transformación y degradación de contaminantes orgánicos.- Ciertas microalgas y cianobacterias son capaces de utilizar compuestos tóxicos y recalcitrantes como fuente de nitrógeno, fósforo, carbono y azufre.
- (d) Control de patógenos.- Las microalgas, poseen la capacidad de alterar condiciones ambientales tales como pH y oxígeno disuelto, debido a la actividad metabólica que presentan. Lo cual, podría tener efecto adverso para los patógenos existentes en el agua residual.

Los excesos de N y P en las formas de NH₄⁺, NO₃⁻ y PO₄³⁻ en las aguas residuales del cultivo de *L. vannamei*, pueden representar una fuente de nutrientes ideal para el desarrollo de cultivos microalgales, puesto que el nitrógeno amoniacal NH₃ (NH₄⁺ cuando se encuentra soluble en agua a pH<8.5) es la fuente de N elegida por las microalgas, además de asimilar también NO₃⁻ y NO₂⁻ (Chen *et al.* 2012). Con respecto al P, el ión fosfato ingresa a las células por la acción de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, el cual, es

acumulado como polifosfato dentro de la célula o es directamente incorporado a las rutas metabólicas energéticas por los procesos de fosforilación a nivel sustrato (fosforilación oxidativa y fotofosforilación), además de ser utilizado para la síntesis de fosfolípidos (Gobbrelaar 2005).

Diferentes especies de microalgas se han utilizado en procesos de fitorremediación, por ejemplo, *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* y *Phormidium*. Dichas especies presentan las siguientes cualidades: (a) alta tasa de absorción de los compuestos a remover del sistema (Gonzalez *et al.* 1997), (b) alta tasa de crecimiento (Hoffman 1998), (c) alta tolerancia a contaminantes y xenobióticos (Post *et al.* 1994) y, (d) son capaces de interactuar de forma positiva con bacterias para lograr los propósitos de remoción de nutrientes (Muñoz y Guieysse 2006).

Algunos autores han evaluado la fitorremediación de aguas residuales utilizando el inmovilizado celular, ya que esto representa una forma eficiente para solucionar el problema de la separación y recuperación de las células de microorganismos del medio del sistema a tratar (AbdelHameed y Hammouda 2007; de-Bashan *et al.* 2002b, 2004; Tam y Wang 2000).

2.5 Importancia y uso de la flora microbiana natural en el cultivo de camarón

El cultivo de camarón en estanques con bajo recambio de agua favorece el crecimiento de la microbiota natural, lo cual, permite el uso de dietas balanceadas con bajos niveles de proteína y contribuye con la disminución de las concentraciones de N y P (Páez-Osuna 2001). Además de ser más amigables para el ambiente, el uso de dichas dietas disminuye tanto los costos de alimentación como la demanda de la harina de pescado. Con el fin de propiciar la formación de biofilms y la producción natural asociada, en varios estudios se ha evaluado el uso de diferentes tipos de sustratos dentro de los estanques de cultivo los cuales, coinciden en la posibilidad de aprovechar dicha producción como fuente nutricional para el camarón, además de tener impacto positivo en la calidad del agua del

sistema de cultivo (Arnold *et al.* 2006, 2009; Browdy *et al.* 2001; Cupertino *et al.* 2007; Decamp *et al.* 2002; Moss 2002; Moss y Moss 2004; Khatoon *et al.* 2007a, 2007b, 2009; Zarain *et al.* 2006).

Neori y Shpigel (2002) y Neori *et al.* (2000) elaboraron un esquema prometedor y sostenible al integrar la acuicultura con la algacultura. Dicha integración es a menudo esencial debido a que el valor del alimento constituye el mayor costo de inversión. Aunado a lo anterior, los residuales derivados de éste constituyen la fuente principal de contaminación para las aguas costeras receptoras de dichos efluentes. Ciertamente, el impacto ambiental de esta eutrofización en los ecosistemas adyacentes a la maricultura, genera dudas acerca del desarrollo sostenible de esta actividad. La integración de la acuicultura con la algacultura, ofrece diferentes soluciones para superar problemas como los antes citados, puesto que los efluentes resultantes se transforman en recursos redituables además de mejorar la calidad del agua de cultivo para su recirculación.

2.6 Microalgas para la acuicultura

Las microalgas juegan un papel predominante en el desarrollo de la acuicultura, pues constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos cultivados, siendo altamente nutritivas y fáciles de ingerir debido al tamaño que poseen (FAO 1988). Pueden emplearse en forma directa como componente único no procesado, para la formación de la cadena alimenticia corta o, como material seco para la manufactura de alimentos balanceados (Tulli *et al.* 2012). Las diversas especies de microalgas son utilizadas como sustituto de nutrientes básicos, como fuente de pigmentos para la coloración de la carne (salmónidos), la piel (peces de lujo) o para otros propósitos biológicos (Mueller-Feuga *et al.* 2003).

El mejoramiento y la estabilización de la calidad del agua, es uno de los mayores efectos de las microalgas en la acuicultura gracias a la producción fotosintética de oxígeno. El efecto

de las microalgas sobre el pH, varía del día a la noche, puesto que durante el día de acuerdo con el nivel de iluminación incrementa; siendo lo contrario por la noche ya que disminuye debido a la actividad respiratoria en la cual, el CO₂ es liberado. La acción de compuestos excretados por las microalgas, representan un efecto positivo en el control y regulación de las comunidades bacterianas, además de poseer efectos probióticos y propiedades para estimular al sistema inmunológico de los camarones (Becker 2004).

2.6.1 Composición química y valor nutricional de las microalgas

El valor nutricional de las microalgas depende principalmente de su composición química y su estructura celular, se encuentra influenciada en cierto grado por las condiciones de cultivo. Sin embargo, para que las microalgas puedan ser utilizadas en la acuicultura, deben poseer los constituyentes nutritivos esenciales, no deben presentar toxicidad alguna, deben ser del tamaño necesario para ser ingeridas, además de tener una pared celular digerible para que los nutrientes estén disponibles (Ting *et al.* 2013). Ejemplo del último criterio son las algas verde azules (cianobacterias) ya que presentan paredes celulares delgadas, cantidades abundantes de proteína de alta calidad, ácidos grasos esenciales y vitaminas (Becker 2004).

Esta reportado que el contenido proteico de las microalgas puede ser de hasta 60 % del peso seco (Arredondo y Voltolina 2007) lo cual, representa uno de los beneficios más importantes al utilizar microalgas en la acuicultura. Teniendo en cuenta que la harina de pescado es uno de los insumos más importante y de costo elevado para la acuicultura, entonces reemplazar la harina de pescado por proteína proveniente de cultivos microalgales sería de gran relevancia comercial. Las microalgas también representan una fuente considerable de lípidos. Diversos ácidos grasos poliinsaturados sintetizados por las microalgas, son importantes para el crecimiento de camarones, peces y moluscos. El contenido de ácidos grasos, en particular el ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω -3), el ácido araquidónico (ARA, 20:4 ω -6) y al ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω -3) es de

mayor importancia en la evaluación de la composición nutricional de las especies de microalgas que se pretendan utilizar como fuente de alimento para organismos marinos.

Concentraciones significativas de EPA se encuentran en especies diatomeas (*C. calcitrans*, *C. gracilis*, *S. costatum*, *T. pseudonana*), en eustigmatofitas (*Nannochloropsis* spp.) y en primnesioficeas (*Platymonas lutheri*); mientras que altas concentraciones de DHA pueden encontrarse en primnesioficeas como *Pavlova lutheri*, *Isochrysis* spp. y *Chroomonas salina* (Patnaik *et al.* 2006).

El cultivo de camarón depende de fuentes lipídicas marinas, debido a los requerimientos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los alimentos balanceados se formulan con 30 % a 60 % de harina de pescado y con 10 % a 20 % de aceite de pescado (D'Abramo *et al.* 1997). Las predicciones para la siguiente década en la producción de la acuicultura son de 10^8 ton, si se considera una disponibilidad de 2 a 3×10^7 ton de peces provenientes de la pesca, se concluye que estos, no podrán ser suficientes para satisfacer el incremento en la demanda de harina y aceite de pescado destinados a la acuicultura (FAO 2010).

Tomando en cuenta la demanda del consumo humano directo, aunado a la destinada para las actividades agropecuarias, la escasez de ácidos grasos poliinsaturados, podría ascender a más de 10^7 ton, por lo tanto, el uso de microalgas como fuente comercial de ácidos grasos poliinsaturados, de proteína de alta calidad y otros nutrientes, representa una solución potencial. Ejemplo de lo anterior, puede observarse en lo reportado por Patnaik *et al.* (2006) donde la inclusión de productos microalgales ricos en ácidos grasos en dietas para *L. vannamei* mostró potencial para el reemplazo del aceite de pescado (Patnaik *et al.* 2006).

2.7 Fitorremediación, reciclamiento de bioproductos y reemplazo parcial de harina y aceite de pescado

Las especies de microalgas poseen el potencial para asimilar nutrientes residuales de P, N y carbono inorgánicos, proveer oxígeno y generar bioproductos ricos en proteína, lípidos y carbohidratos (Riquelme y Avendaño 2003) lo que las hace candidatas ideales

para el doble propósito de ficorremediación y reciclamiento. Para desarrollar dicho potencial, es necesario conocer cuáles especies de microalgas pueden ser más eficientes para asimilar nutrientes residuales, cuáles de éstas tienen la calidad nutricional para sustituir al menos parcialmente las harinas y aceites de pescado, y cuáles pueden crecer bajo condiciones de cultivo heterotrófico y/o, en condiciones de inmovilización y co-cultivo para ser recicladas de manera efectiva.

2.8 Bacterias heterotróficas en acuicultura marina

Las bacterias heterótrofas presentan una mayor diversidad a diferencia de las microalgas de interés para acuicultura que son mejor conocidas y además, de encontrarse disponibles en ceparios. Las diferentes especies de bacterias que pueden asimilar NH_4^+ para incorporarlo a proteína en presencia de carbono orgánico, son menos conocidas y disponibles. Por ello es importante conocer especies nativas de bacterias heterótrofas que puedan formar asociaciones benéficas con microalgas para asimilar residuales de N y P y enriquecer con ello, la biomasa que pueda producirse y reciclarse.

La adición de carbono orgánico a los cultivos de camarón incrementa la cantidad de bacterias heterotróficas en la columna de agua y en los sedimentos en cultivos extensivos (Hary *et al.* 2006). En cultivos intensivos la adición de carbono orgánico es la base del desarrollo de bioflóculos integrados por bacterias heterotróficas los cuales, pueden desarrollarse dentro de los sistemas de cultivo o en biorreactores externos (Azim y Little 2008; Schneider 2006).

Los bioflóculos se componen principalmente de bacterias heterotróficas nativas agregadas que pueden asimilar NH_4^+ para incorporarlo directamente como proteína, y son acompañados por bacterias nitrificantes que aumentan los niveles de NO_2^- y NO_3^- en los cultivos. Dado que el sistema de bioflóculos no inicia por la inoculación de cepas conocidas, los resultados en términos de asimilación de nutrientes, productos generados y valor nutricional, pueden ser muy variables.

2.9 Asociaciones microalga-bacteria

El concepto de “anillo microbiano” introducido por Azam *et al.* (1983), cambió notablemente el rol que los microorganismos tienen en los ecosistemas acuáticos. Este concepto, plantea la importancia de la interacción bacteria-microalga como componentes básicos del ecosistema, proponiendo que las bacterias no solo reciclan la materia orgánica, sino que además, poseen la capacidad de absorber nutrientes desde el océano y hacer circular estas fuentes de carbono mediante diversas interacciones ecológicas con los otros componentes del plancton. Las interacciones que se producen entre bacteria-fitoplancton son recíprocas y están determinadas principalmente por la utilización y producción de carbono orgánico disuelto, por el tipo de células microalgales y por su efecto en el crecimiento bacteriano. También se ha sugerido, que la superficie de las células de las microalgas podría proveer un microambiente para procesos bacterianos como la fijación de N, los cuales no podrían ocurrir en la columna de agua sin la aportación de las bacterias (Riquelme y Avendaño 2003).

La interrelación de bacteria-microalga es dependiente de variables estacionales (primavera-verano), así como de parámetros físico-químicos y biológicos. Estos factores podrían actuar en forma separada o bien interrelacionados, dando como resultado una mayor o menor disponibilidad de carbono orgánico en los ecosistemas acuáticos. Por lo cual, las bacterias son los principales responsables de la mineralización de carbono orgánico e intermediarios de estos en la cadena trófica (Azam *et al.* 1983).

Diversos estudios han demostrado que la relación de mutualismo entre microalgas y bacterias, mediante la producción y consumo de carbono orgánico extracelular, se rompe en condiciones limitantes de nutrientes. Así por ejemplo, cuando el P es limitante, las bacterias compiten con las microalgas provocando una disminución en la tasa de crecimiento de las mismas. Por lo tanto, el grado de influencia de la comunidad bacteriana sobre la dinámica de las microalgas depende del tipo de nutriente limitante (Mudrik y Korzeniewski 1995).

La asociación de microalgas con bacterias heterótrofas que asimilan NH_4^+ y carbono orgánico, puede proporcionar ventajas a la fitorremediación y al reciclamiento de

nutrientes residuales, aún cuando compiten por la misma fuente de nutrientes. Los sistemas de cultivo de camarón autotróficos basados en el desarrollo de microalgas dentro del sistema de cultivo, se encuentran limitados en las densidades de siembra puesto que, alcanzan niveles de NH_4^+ que superan la capacidad de asimilación de las microalgas (Burford y Lorenzen 2004). Mientras que los sistemas de cultivo heterotróficos se encuentran limitados por los requerimientos energéticos para el suministro de oxígeno, carbono orgánico y las altas concentraciones de NO_2^- y NO_3^- debido al desarrollo de bacterias oxidadoras de amonio y nitrificantes y a la ausencia de componentes autotróficos como las microalgas que puedan asimilarlos.

Desde el punto de vista de asimilación de nutrientes residuales, las interacciones entre las microalgas y bacterias heterotróficas representan beneficios tales como el aporte de oxígeno y carbohidratos por parte de las microalgas hacia las bacterias y la asimilación por parte de las microalgas del carbono inorgánico generado por las bacterias. Se ha reportado que en condiciones de inmovilización en matrices de alginato, las microalgas presentan la misma eficiencia para remover nutrientes residuales de N y P que en cultivos libres; además de liberar polisacáridos al medio. El crecimiento de las microalgas en las matrices puede afectarse por limitación de CO_2 y por la disminución en la incidencia de la luz debido al efecto de sombra (AbdelHameed y Hammouda 2007), limitación que no presentan las bacterias heterótrofas.

Recientemente, ha sido reportado que microalgas como *Tetraselmis suecica* son capaces de adaptarse a medios de cultivo heterotróficos. Azma *et al.* (2010), observaron cambios en la morfología de dicha microalga al realizar procesos de adaptación a cultivos heterotrófico y concluyeron, que las células de *T. suecica* crecen exitosamente en condiciones de completa oscuridad, lo cual indica que dicha microalga utilizó compuestos orgánicos como fuente de energía en vez de la luz requerida por las células fototróficas. Por otra parte, las microalgas pueden producir antibióticos que inhiben el desarrollo bacteriano (Chu *et al.* 2004; Liao *et al.* 2003), mientras que algunas especies de bacterias, producen alguicidas que limitan el crecimiento de las microalgas (Yoon-Kyung *et al.* 2008). Por otro lado, existen especies de bacterias que promueven el crecimiento de las microalgas (de-Bashan *et al.* 2002a, 2002b);

por ello es necesario conocer las características tanto de las cepas de microalgas como de bacterias para conformar asociaciones eficientes.

Desde el punto de vista del reciclamiento, las microalgas son ricas en ácidos grasos que pueden sustituir al aceite de pescado (Patnaik *et al.* 2006) y las bacterias heterotróficas son ricas en proteína que puede sustituir parcialmente la harina de pescado (Khun *et al.* 2009). Lo cual sugiere que ambas son candidatas para el reciclamiento de nutrientes para fines de acuicultura. Sin embargo, la calidad nutricional tanto de microalgas como bacterias puede variar de acuerdo con las especies presentes y el tipo de interacciones entre ellas.

El desarrollo de sistemas de ficorremediación, basados en el uso y conocimiento de asociaciones de microalgas con interés para la acuicultura y bacterias heterotróficas nativas de los sistemas de cultivo de camarón, que puedan asimilar nutrientes residuales, constituyen un modelo de cultivo que podría incrementar la ecoeficiencia en el uso del N y P en acuicultura, lo cual forma parte sustancial de este trabajo de investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una actividad que se realiza a nivel mundial. Hasta el 2010, enfrentó una sobreproducción que afectó a los acuicultores pues generó una oferta superior a la demanda, lo cual, declinó los precios del producto con un subsecuente aumento en los costos de producción ya que, insumos como la harina y el aceite de pescado, debido a su alto precio y escasez se han convertido en limitante para el desarrollo de dicho cultivo.

Así mismo, es necesario el desarrollo de metodologías que permitan elevar los niveles de ecoeficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes suministrados a los sistemas de cultivo, puesto que, al no ser asimilados son descargados sin tratamiento alguno generando problemas de eutrofización en los cuerpos receptores.

Con base en lo anterior, este trabajo de investigación permitirá conocer la caracterización de las aguas residuales generadas del cultivo de *L. vannamei*, así como el entendimiento de las asociaciones microalga-bacteria heterotrófica que permitan, mediante procesos de ficorremediación, asimilar residuales de nitrógeno y fósforo con el fin de obtener un mecanismo que pueda ser empleado en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la acuicultura que a su vez, puedan reciclarse en forma de biomoléculas con valor nutricional como fuente de ácidos grasos (microalgas) y proteína (bacterias) para ser utilizada como alimento potencial en dicha industria.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la recuperación de residuales de nitrógeno y fósforo del cultivo de *Litopenaeus vannamei* su reciclamiento e impacto en la ecoeficiencia utilizando una asociación microalga-bacteria heterotrófica en sistemas de ficorremediación.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las aguas residuales provenientes del cultivo de *L. vannamei* a partir de la cantidad de proteína contenida en dietas balanceadas evaluadas en bioensayos de liberación de nutrientes.
- Seleccionar al menos una asociación microalga-bacteria heterotrófica que, de acuerdo con la caracterización de las aguas residuales y sus capacidades de remoción de nutrientes, sea la más apropiada para procesos de ficorremediación.
- Evaluar la ecoeficiencia en el uso del nitrógeno y fósforo en sistemas de cultivo experimental de *L. vannamei* con el uso de la asociación microalga-bacteria heterotrófica en sistemas de ficorremediación.

5. HIPÓTESIS

Si la asociación microalga-bacteria heterotrófica utilizada en sistemas de ficorremediación es capaz de asimilar el nitrógeno y fósforo residual del cultivo de *L. vannamei* y poseer cualidades para ser reciclados, entonces es posible mejorar los niveles de ecoeficiencia en el uso de proteína, mejorar la calidad del agua residual y producir biomoléculas con valor nutricional para la sustitución potencial de insumos utilizados en la fabricación de alimentos balanceados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de realizar la caracterización de las aguas residuales provenientes del cultivo de *L. vannamei* a partir de la cantidad de proteína contenida en dietas balanceadas, se realizaron las siguientes actividades:

6.1 Diseño y manufactura de dietas experimentales basadas en proteína vegetal y animal

Se elaboraron seis dietas isocalóricas e isolipídicas de acuerdo con los algoritmos desarrollados por Calderón-Flores (2007) con niveles bajo (24-25 %), medio (33-25 %) y alto (37-41 %) de proteína. En todas las dietas la cantidad de lípidos (6.3%) se niveló con aceite de pescado, por lo que todas las dietas incluyeron una proporción de ingredientes de origen marino.

Tres de las dietas contenían una mezcla de proteína animal y vegetal (DAV) que incluía 36.46 % de harina de pescado (HP), 36.46 % de pasta de soya (PS) y 27.14 % de harina de trigo (HT).

Las tres restantes contenían gran cantidad de proteína de origen vegetal (80 % de PS, 15 % de HT) y una pequeña porción de proteína animal (harina de calamar (HC) como attractante) (Tabla I).

Tabla I. Cantidad utilizada de los diferentes insumos empleados en la elaboración de las seis dietas experimentales para *L. vanammei* basadas en proteína animal y vegetal.

Ingredientes (g Kg⁻¹ como alimento)	DAV_(B)	DAV_(M)	DAV_(A)	DV_(B)	DV_(M)	DV_(A)	DC
Harina de pescado ¹	216.39	296.39	376.36	----	----	----	----
Pasta de soya ²	216.39	296.39	376.36	509.60	696.80	802.40	----
Harina de calamar ³	----	----	----	31.85	43.55	50.15	----
Harina de trigo ⁴	161.21	220.81	280.38	95.55	130.65	150.45	----
Almidón ⁵	387.24	203.97	20.77	322.28	116.29	----	----
Aceite de pescado ⁶	23.77	18.02	11.99	31.45	28.57	26.65	----
Lecitina de soya ⁷	39.17	39.17	39.46	39.17	39.17	39.46	----
Colesterol 60% ⁸	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	----
Premix de vitaminas y minerales ⁹	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	----
Ácido algínico ¹⁰	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	----
Cenizas ¹¹	52.05	26.02	----	26.74	9.64	----	----
Celulosa ¹²	9.16	4.58	----	12.54	4.52	----	----
Etoxiquinona ¹³	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	----

DAV_(B): dieta con bajo nivel de proteína basada en proteína animal y vegetal; DAV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; DAV_(A): dieta con alto nivel de proteína basada en proteína animal y vegetal; DV_(B): dieta con bajo nivel de proteína basada en proteína vegetal; DV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; DV_(A): dieta con alto nivel de proteína basada en proteína vegetal; ¹Harina de sardina (68.27% proteína, 5.28% lípidos) PIASA (La Paz, Baja California Sur, México). ²Pasta de soya extraída con solventes (46.47% proteína, 0.84% lípidos) PIASA (La Paz, Baja California Sur, México). ³Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. (Guadalajara, México). ⁴Harina de trigo (13.80% proteína, 1.41% lípidos) PIASA (La Paz, Baja California Sur, México). ⁵Almidón de maíz, Unilever de México, S. de R.L. de C.V. (Tultitlán-Estado de México, México). ⁶Aceite de sardina PIASA (La Paz, Baja California Sur, México). ⁷Exportadora de México, S.A. de C.V. (Naucalpan-Estado de México, México). ⁸Sigma-Aldrich Corp. C8667 (St. Louis, MO, USA). ⁹Cruz-Suárez *et al* (2000). ¹⁰Sigma-Aldrich Corp. A2158 (St. Louis, MO, USA). ¹¹Cenizas de harina de sardina (68.27% proteína, 5.28% lípidos) incineradas a 600°C por 5 h. ¹²Sigma-Aldrich Corp. C6288 (St. Louis, MO, USA). ¹³Sigma-Aldrich Corp. E8260 (St. Louis, MO, USA) utilizado como antioxidante.

La elaboración de las dietas antes mencionadas, se realizó en las instalaciones de la planta de alimentos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) de la siguiente forma:

- (a) Pulverización de los ingredientes sólidos y tamizado a través de una malla de 250 μm , para obtener mejor compactación del alimento. Pesado de la cantidad requerida de cada ingrediente.
- (b) Separación de los ingredientes en: macronutrientes (los que representan más del 5 % en peso), micronutrientes (los que representan menos del 5 % en peso) y lípidos (aceite de pescado, lecitina de soya y etoxiquinona).
- (c) Mezclado de los micronutrientes y lípidos por separado en un recipiente durante un periodo de 5-10 min. Los macronutrientes se mezclaron durante el mismo tiempo en el recipiente del equipo de mezclado.
- (d) Incorporación de los micronutrientes al recipiente donde se mezclaron los macronutrientes. Este paso se realizó lentamente y sin dejar de mezclar (velocidad baja) durante 10 min.
- (e) La emulsión obtenida de la combinación de lípidos se adicionó lentamente, a velocidad baja y con la mezcladora en movimiento a los macro y micronutrientes. Los restos de lípidos que quedaron en el recipiente donde se mezclaron, fueron recuperados utilizando una parte de la mezcla de ingredientes (macronutrientes + micronutrientes).
- (f) Una vez adicionados los tres grupos, se homogenizaron durante 10 min.
- (g) Se agregó un volumen de agua previamente calentada (50 °C) equivalente al 30-50 % del peso de la masa hasta obtener una pasta uniforme y evitar así, que se desquebraje fácilmente o tenga textura arenosa. En el caso de las dietas de bajo nivel de proteína, se agregó un volumen mayor de agua (75 % aprox.) debido a la cantidad de almidón utilizado, ya que éste, es un ingrediente hidrocópico que absorbe grandes cantidades de agua.

(h) La masa se procesó mediante el equipo de extrusión dos veces. La primera vez, se realizó rápido para acondicionamiento previo de la masa, la segunda vez se pasó lentamente para obtener la masa extruida. Se cortaron los pellets y se recibieron y acomodaron en una charola limpia con papel. Se cuidó que la coloración de la masa al salir del equipo de extrusión, no presentara oscurecimiento, cuando ello ocurrió la mezcla se extruyó más rápido.

(i) Las charolas con los pellets obtenidos se introdujeron en una estufa de secado con circulación de aire durante 18 a 24 h a una temperatura de 40 °C. Las dietas se almacenaron en bolsas de plástico negras y en congelación para evitar la presencia de bacterias u hongos.

A las seis dietas manufacturadas (DAV, DV) y a la dieta comercial (DC), se les realizó el análisis del perfil bromatológico, así como también se cuantificó la cantidad de humedad y energía. Todos los análisis, se realizaron, siguiendo las técnicas utilizadas en el Laboratorio de Análisis Químico Proximal del CIBNOR, S.C. (Tabla II).

Tabla II.- Técnicas utilizadas en el laboratorio de análisis químico proximal, CIBNOR, S.C.

Análisis	Técnica utilizada
Humedad	Determinación por pérdida de peso a 105°C/ 4h
Cenizas	Determinación por diferencia de peso. Calcinación a 600° C / 5h
Proteína	Método Microkjeldahl (%N x 6.25)
Extracto etéreo	Método Soxtec-Avanti TECATOR
Fibra cruda	Método de hidrólisis sucesiva (ácido/base)
Energía bruta	Determinación por calorímetro adiabático automático
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	Calculado por diferencia: 100 - (% Proteínas + % Lípidos + % F. Cruda, + % Cenizas)

6.2 Organismos

Las postlarvas de *L. vannamei* se obtuvieron de la empresa acuícola Acuacultura Mahr S.A. de C.V., Baja California Sur, México y se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (temperatura 30 ± 0.5 °C, oxígeno disuelto >4 mg L⁻¹). Los organismos (2000 Pl m⁻³) se alimentaron con una dieta comercial para camarón (40.6 % proteína, 4.79 % lípidos, PIASA, Baja California Sur, México) a saciedad dos veces por día y se realizaron recambios de agua del 100 %. Estas condiciones se mantuvieron hasta que los organismos alcanzaron un rango de peso de entre 1.5 y 2.5 g.

6.3 Bioensayo de retención proteica

Durante 77 d se llevó a cabo dicho bioensayo con objeto de evaluar el crecimiento y la retención de nitrógeno (N) y fósforo (P) de juveniles de *L. vannamei*. Los organismos se alimentaron 2 veces por día con las 6 dietas experimentales antes mencionadas y una dieta comercial (DC), la cantidad de alimento suministrada correspondía al 5.5 % de la biomasa de cada sistema experimental. Se tuvieron cuatro réplicas por cada tratamiento, asignadas completamente al azar en 28 acuarios de 50 L. Cada acuario contenía 6 organismos (1.5-2.5 g) que se mantuvieron bajo condiciones de cultivo controladas (temperatura 30 ± 0.5 °C, oxígeno disuelto >4 mg L⁻¹, salinidad 38 UPS, fotoperiodo 12h_{luz}/12h_{oscuridad}), las cuales eran verificadas cada tercer día. El peso de los organismos se registró cada semana y con estos datos se calcularon el peso final, la tasa de crecimiento y el porcentaje de supervivencia.

Diariamente se realizaba recambio de agua en todos los acuarios (80 % d⁻¹), así como recuento de los organismos y mudas (los organismos muertos eran retirados de los sistemas experimentales), además de la recuperación del alimento no consumido. Los residuos de alimento se recolectaron y se mantuvieron en congelación hasta el término del bioensayo para posteriormente, secarlos a 70 °C durante 17 a 24 h. Los datos del peso seco de los

residuos fueron utilizados para calcular la cantidad de alimento consumido por los organismos.

Para evaluar el contenido de N y P se utilizó la biomasa de 24 camarones completos por cada tratamiento, la cual, se cortó en pequeños pedazos, se secó (80 °C, 18 h) y molió. La proteína total se evaluó utilizando el método micro-Kjeldahl y el N total ($\text{g N kg}_{\text{camarón}}^{-1}$) se calculó dividiendo la cantidad de proteína total sobre el factor 6.25. En el caso del P, la materia seca remanente del análisis de proteína, fue calcinado (600 °C, 5 h) y las cenizas resultantes fueron utilizadas para cuantificar la cantidad de P total ($\text{g P kg}_{\text{camarón}}^{-1}$) utilizando la técnica propuesta por Strickland y Parson (1972) y Greenberg *et al.* (2005).

La retención de nutrientes (P o N) en los organismos se calculó dividiendo el contenido total de P o N en el tejido de los camarones sobre el contenido total de P o N en la dieta consumida por los mismos $[(\text{PT o NT}_{\text{biomasa de camarón}} / \text{PT o NT}_{\text{consumido en la dieta}}) \times 100]$.

El contenido de P y N de las diferentes dietas utilizadas se calculó de la misma forma que la cantidad de P y N en el tejido de los camarones.

6.4 Bioensayo de liberación de nutrientes (P y N)

Se realizaron dos bioensayos de liberación de nutrientes con el fin de determinar si el tipo y porcentaje de proteína utilizada en los alimentos, así como el tamaño de los organismos tenía efecto alguno sobre la concentración de P y N en el agua residual generada por su cultivo. El peso promedio de los juveniles de *L. vannamei* utilizados en el primer bioensayo (BLN₁) fue de 4.50 ± 0.3 g, para el segundo bioensayo (BLN₂) se usaron camarones más grandes (8.51 ± 1.6 g). En ambos experimentos, se utilizaron los mismos organismos evaluados en el bioensayo de retención proteica cuando éstos, alcanzaron los pesos antes descritos. Cabe mencionar que al término de cada bioensayo de liberación de nutrientes, los organismos eran devueltos a sus respectivos acuarios.

En una tina de fibra de vidrio (1.65 m × 1.71 m × 0.3 m) se colocaron dos calentadores sumergibles (300 watt) para regular la temperatura (30 ± 0.5 °C), así como piedras de aireación para mezclar el agua y asegurar que la temperatura fuera homogénea en toda el área.

Dentro de ella, se instalaron 28 contenedores plásticos de 5 L de capacidad, cada uno equipado con una piedra de aireación y 3 L de agua de mar previamente filtrada utilizando una bolsa Gaff de 1 μm (Figura 1).



Figura 1.- Sistema experimental utilizado en los bioensayos de liberación de nutrientes.

Se evaluaron las dietas experimentales basadas en proteína animal y vegetal (DAV) con contenido de proteína bajo (24 %), medio (33 %) y alto (41 %), las dietas basadas en proteína vegetal (DV) con contenido de proteína bajo (25 %), medio (35 %) y alto (37 %), además de una dieta comercial (40.6 % proteína, PIASA, Baja California Sur, México). Los alimentos fueron asignados completamente al azar a las unidades experimentales y se tuvieron 4 réplicas. Los camarones utilizados en BLN₁ y BLN₂ (uno en cada contenedor plástico de 5 L) se sometieron a un proceso de ayuno durante 24 h, después del cual, el agua de los contenedores se sustituyó con agua de mar filtrada como se describió anteriormente. En ambos bioensayos los juveniles de *L. vannamei* se alimentaron con los

diferentes tratamientos una sola vez con una cantidad de alimento equivalente al 5.5 % de su biomasa y se incubaron durante 24 h más.

Para determinar la concentración de P y N residuales, los organismos se retiraron de los contenedores después de 24 h y el agua se homogenizó para asegurar que la fracción particulada estuviera dentro de la muestras de agua (250 mL). La cuantificación de las diferentes formas de P y N se realizó utilizando un autoanalizador equipado con automuestreo (Lachat Quick Chem-8000). Las diferentes formas de P evaluadas fueron: fósforo total (PT), fósforo inorgánico disuelto (PID), fósforo orgánico disuelto (POD) y fósforo particulado (PP) (Greenberg *et al.* 2005; Strickland y Parson 1972). Las diferentes formas de N evaluadas fueron: nitrógeno total (NT), nitrógeno orgánico disuelto (NOD), nitrógeno particulado (NP) y amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) como nitrógeno inorgánico disuelto (NID) (Valderrama 1981), así como, urea (Koroleff 1977; modificado por Calderon-Flores 2007).

6.5 Análisis estadístico

En todos los experimentos, los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad. Para evaluar el efecto del tamaño de los organismos y las dietas utilizadas sobre la concentración de las diferentes formas de P y N se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples. Para evaluar el efecto de las diferentes dietas sobre el crecimiento y la retención de P y N por *L. vannamei*, a cada serie de datos se le realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA™ 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) y las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$.

Con el fin de seleccionar al menos una asociación microalga-bacteria heterotrófica que, de acuerdo con la caracterización de las aguas residuales y sus capacidades de remoción de

nutrientes, fuera la más apropiada para procesos de ficorremediación, se realizaron las siguientes actividades:

6.6 Bacterias heterotróficas con potencial para procesos de ficorremediación

Considerando la gran diversidad de géneros y especies de bacterias heterótrofas marinas, se realizó el aislamiento, purificación y selección de cepas nativas que fueran aeróbicas, mostraran capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de NH_4^+ , asimilaran carbohidratos, fueran tolerantes a la actividad antimicrobiana que pudiesen presentar las microalgas, utilizaran fuentes de carbono exudadas por las microalgas seleccionadas, no tuvieran actividad alguicida y fueran capaces para asimilar nutrientes residuales (P y N) del cultivo de *L. vannamei*.

6.6.1 Fuentes para la selección de bacterias heterótrofas nativas

6.6.1.1 Sistemas de cultivo de camarón (*L. vannamei*)

Se colectaron muestras de agua de dos estanques de la granja de cultivo de camarón Organic Shrimp, S.A. de C.V. (Melitón Albañez, Baja California Sur, México). Dichos estanques se eligieron debido a la presencia de florecimientos microalgales y con el fin de obtener cepas de bacterias nativas del cultivo de *L. vannamei*. Las muestras se tomaron a la entrada y salida de los estanques, así como, en dos muelles tanto del extremo izquierdo como del derecho.

6.6.1.2 Sistemas heterotróficos de cultivo de camarón

Las muestras de agua se tomaron de cultivos heterotróficos con presencia de bioflóculos bacterianos, establecidos para dicho fin en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR, S.C.

6.6.1.3 Cultivos de microalgas clorofitas con aireación sin filtración

Las muestras se tomaron de cultivos de las microalgas *Chlorella capsulata*, *Tetraselmis suecica* y *Tetraselmis chui* con aireación sin utilización de filtros, con el objetivo de promover el desarrollo de bacterias heterotróficas, que no tuvieran problema alguno para crecer junto con la microalga.

6.6.2 Aislamiento, purificación y selección de cepas bacterianas en medios selectivos

Se inocularon por triplicado 100 μ L de cada una de las muestras, a placas petri que contenían tres medios diferentes: medio marino 2216 (Zobel 1941), agar nutritivo (AN) + NaCl 2 % (w/v) y agar soya tripticasa (TSA) + NaCl 2 % (w/v). En cada una de las placas, la muestra fue distribuida de forma homogénea con triángulo de vidrio por extensión en superficie sobre el medio sólido. Todas las placas fueron incubadas a 35 °C durante un periodo de 72 h observando diariamente el desarrollo de crecimiento bacteriano.

Posteriormente se seleccionaron las cepas de bacterias con morfología colonial diferente que crecieron en las placas con los tres medios antes mencionados. De cada una, se tomó una asada abundante de biomasa bacteriana y se inocularon por triplicado en 50 mL de caldo selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934; Sol. Stock Carbono (180 g mL⁻¹ C₆H₁₂O₆) 106 mL, Sol. Stock Nitrógeno (132.1g mL⁻¹ (NH₄)₂SO₄) 16 mL, Sol. Stock Fósforo (136.09 g mL⁻¹ KH₂PO₄) 1 mL, KCl 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, MnSO₄·H₂O 0.004 g, FeSO₄·7H₂O 0.002 g, NaCl 20 g, Extracto de levadura 0.5 g y Agar 20 g. El pH se ajustó a 7.5 con NaOH 1M después de autoclave),

para detectar el crecimiento de cepas con mayor capacidad de desarrollo basadas en la asimilación de P, NH_4^+ y carbohidratos. Los matraces fueron incubados a 35 °C con agitación constante (110 rpm) durante 48 h.

Aquellos que presentaron turbidez por crecimiento bacteriano se seleccionaron para posteriormente purificar las cepas utilizando la técnica de estría cruzada en placas petri con medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934). Dicha purificación se realizó hasta observar en la placa un solo tipo de morfología colonial, la anterior se llevó a cabo con el uso de un estereoscopio (VMT 1x, 4x Mod 296709) y por medio de tinción gram se realizó la clasificación morfológica celular de las colonias de bacterias puras y aisladas.

6.6.3 Evaluación de la actividad amilolítica y solubilización de fosfatos

Con el fin de observar si las cepas de bacterias aisladas y caracterizadas morfológicamente que crecieron en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), podían crecer en medios saturados de almidón y poseían actividad extracelular amilasa, se prepararon por triplicado, placas petri con el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), el cual, se modificó disminuyendo 100 veces la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y la concentración del extracto de levadura (0.025 g L^{-1}). Además se agregó almidón comercial (Maizena) al 1 % para obtener un medio saturado. Las placas se inocularon con 15 μL de suspensiones bacterianas (de cada una de las cepas) en solución salina estéril al 2 % (w/v), ajustadas a D.O. 1.0 ($\lambda= 540 \text{ nm}$) y se incubaron durante 24 h y 48 h a 35 °C. Las placas donde se observó crecimiento bacteriano se revelaron con una solución de Lugol al 20 % para corroborar la presencia de halos de solubilización de almidón.

Aunado a lo anterior, con el fin de observar dichas cepas de bacterias eran capaces de solubilizar fosfatos, se utilizó el medio propuesto por Vázquez-Correa (1996) ($C_6H_{12}O_6$ 10 g, $Ca_3(PO_4)_2$ 5g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, KCl 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g, NaCl 20 g, Extracto de levadura 0.5 g y Agar (2%) 20 g. El pH se ajustó a 7.5 con NaOH 1M después de autoclave), específico para la selección de bacterias halotolerantes a NaCl y/o marinas solubilizadoras de fosfatos. Las placas con dicho medio se inocularon con 15 μ L de suspensiones bacterianas (de cada una de las cepas) en solución salina estéril al 2 % (w/v), ajustadas a D.O. 1.0 ($\lambda = 540$ nm), se incubaron durante 24 h y 48 h a 35 °C y se observó la presencia de halos de solubilización de fosfatos.

6.6.4 Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias heterótrofas mediante bioensayos de cultivo en presencia de extractos microalgales

Las pruebas de inhibición, se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Ördög *et al.* (2004), con el fin de evaluar si los extractos de las células de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* tenían efecto alguicida contra las cepas de bacterias heterotróficas que crecieron en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934) y que mostraron producción de amilasas así como, cualidades para solubilizar fosfatos.

6.6.4.1 Cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Se crecieron 4 cultivos al 10 % (v/v) de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975), con aireación y suministro de CO_2 cada hora (15 mL min^{-1}) durante 4 d a una temperatura de 25 ± 2 °C e intensidad luminosa de 54.6 μ mol fotón $m^{-2} s^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 $h_{oscuridad}$. Lo anterior para obtener cultivos densos de cada una de las microalgas. Los botones celulares se recuperaron por centrifugación (Centrifuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) de acuerdo con

lo propuesto por Arredondo y Voltolina (2007). Se lavaron dos veces con formato de NH_4^+ 0.5 M y la biomasa obtenida se liofilizó (Lyo-Centre Virtis 3.5L DBTZL).

6.6.4.2 Extractos de la biomasa proveniente de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Para obtener los extractos evaluados en esta prueba, se utilizó 1 g de la biomasa liofilizada de cada una de las microalgas, a la que se le agregó 30 mL de Etanol absoluto grado HPLC (Sigma) y se dejó reposar durante 2 h. Transcurrido el tiempo, las suspensiones celulares se centrifugaron en condiciones particulares para cada una de las microalgas (*C. capsulata*: 20 min, 2100 rpm, 4 °C; *T. suecica* y *T. chui*: 17 min, 1100 rpm, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces.

El sobrenadante obtenido (60 mL) se separó en dos matraces con un volumen de 30 mL cada uno y los extractos se secaron con un rotavapor en condiciones de vacío a 35 °C (IKA® RV 05 basic / SELF-Cleaning dry vacuum system™ Model 2026 / Baño de recirculación con control de temperatura VWR 13271-086). Posteriormente los extractos secos, se resuspendieron, uno en 4 mL de Etanol absoluto grado HPLC y el otro en 4 mL de una mezcla Metanol 50 % / Tris 0.1 M (pH 7.5) (200 µL / 800 µL), ambos esterilizados por filtración (Fall Acrodis® Syringe filter w / 0.2 µm Supor® Membrane Sterile). Los extractos se mantuvieron bajo refrigeración en frascos ámbar para su posterior uso.

6.6.4.3 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano

Para estas pruebas se utilizaron sensidiscos embebidos con 15 µL de los extractos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*. Se usaron también sensidiscos embebidos con 15 µL de Etanol absoluto grado HPLC estéril como control negativo y sensidiscos embebidos con 15 µL de Cloranfenicol estéril (Sigma) (450 µg/sensidisco; Dimayuga *et al.* 1998). Todos los sensidiscos preparados se colocaron sobre una charola de acero inoxidable estéril y se

dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar durante 1 h para asegurar la evaporación de los diferentes solventes.

Aunado a lo anterior, se inocularon por triplicado 100 μ L de las suspensiones en solución salina estéril al 2 % (w/v), ajustadas a D.O. 1.0 ($\lambda= 540$ nm), de cada una de las bacterias mencionadas al comienzo de este apartado, en placas con el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934).

En cada una de las placas, la muestra fue distribuida de forma homogénea con triangulo de vidrio por extensión en superficie sobre el medio sólido y se colocaron los sensidiscos con los diferentes extractos y los controles (Figura 2).

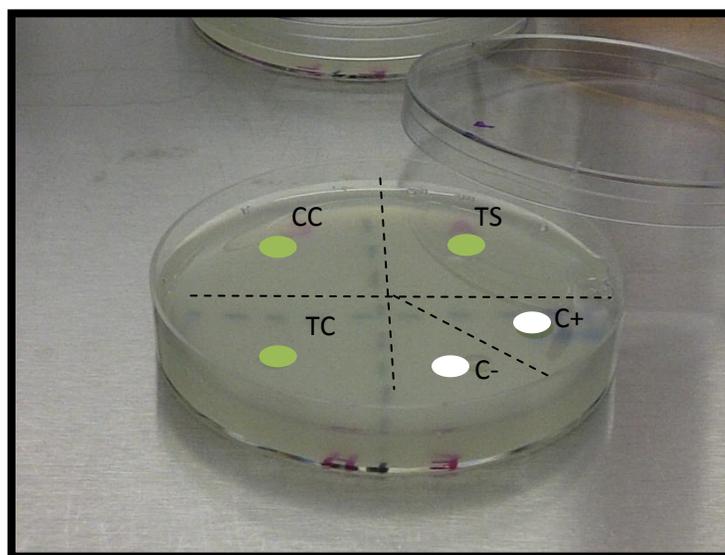


Figura 2.- Distribución de los sensidiscos embebidos con los diferentes extractos utilizados para las pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano.

Todas las placas se incubaron por 24 h a 35 °C y las cepas de bacterias heterotróficas que presentaron halos de inhibición debido al efecto de los extractos de las microalgas, se descartaron y solo se seleccionaron aquellas cepas de bacterias que presentaron crecimiento a pesar de la presencia de los diferentes extractos utilizados.

6.6.5 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de las bacterias heterotróficas seleccionadas

Se realizó la extracción del DNA utilizando el Fast DNA® SPIN Kit for soil (MP Biomedicals) a los diferentes morfotipos de bacterias que presentaron crecimiento en presencia de extractos de los cultivos de las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*.

El DNA fue purificado con el kit Gene-clean (MP Biomedicals) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. La concentración y pureza del DNA fue calculada con un nanofotómetro (Nanofotómetro UV/Vis espectrofotómetros, Implen), mientras que su calidad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la identificación de las bacterias se amplificó un fragmento correspondiente a la región V3/V4 del 16 sRNA, utilizando para ello los oligos 120F (actggcggacgggtgagtaa) y 518R (cgtattaccgcggtctgctgg). La amplificación se llevó a cabo en volúmenes de 25 μ L conteniendo 100 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 μ M de cada oligo, 0.2 mM de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa en 20 mM de Tris/HCl (pH 9.0). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min; treinta ciclos desnaturalizando a 95 °C por 1 min, alineando a 55 °C por 1 min y extendiendo a 72 °C por 1 min 30 seg y un ciclo a 72 °C por 10 min como paso final.

Los productos obtenidos en la reacción de PCR se purificaron empleando el kit QUIAquick (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener la secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados, los productos se enviaron a la compañía GENEWIZ, Inc. (New Jersey, USA). Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron comparándolas con las existentes en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD USA), utilizando la plataforma BLASTn, aplicando la matriz BLOSUM62. Como criterio para validar las identidades, se utilizó el estadístico $e \leq 0.000001$ y un porcentaje de identidad superior al 97%.

6.6.6 Conservación de las cepas de bacterias heterotróficas seleccionadas e identificadas a nivel molecular

Se tomó una asada abundante de biomasa bacterial de cada una de las diferentes cepas purificadas que resultaron seleccionadas de la prueba de inhibición de crecimiento y se inocularon en 5 mL de caldo selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934). Los tubos se incubaron durante 24 h a 35 °C con agitación constante (110 rpm).

Posteriormente en tubos de criopreservación, se mezclaron 400 µL de cada uno de los cultivos bacterianos con 400 µL de Glicerol 30 % estéril por triplicado y se guardaron en un ultracongelador a -80 °C para asegurar su criopreservación.

6.7 Microalgas candidatas para procesos de ficorremediación

6.7.1 Cepas utilizadas

Las cepas de microalgas marinas utilizadas en este estudio, se adquirieron de tres colecciones diferentes: *Chlorella capsulata* (UTEX LB 2074), *Tetraselmis suecica* (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE), *Tetraselmis chui* (Instituto de Investigaciones Oceanológicas-Universidad Autónoma de Baja California, IIO-UABC). Cada una de las cepas fue reactivada en medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975); se mantuvieron en cultivos estáticos al 10 % (v/v) con una temperatura de 25 ± 2 °C e intensidad luminosa de $54.6 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 h_{oscuridad}, durante 5 d para obtener densidades celulares de 1.0×10^6 cel mL⁻¹. Se realizó el recuento celular siguiendo la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina (2007) en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer utilizando el microscopio Olympus BX51 en objetivo 40 X / 0.75 UPlanFI, todas las cepas fueron mantenidas en cultivos estáticos hasta su posterior uso. Para este estudio se seleccionaron especies de microalgas clorofitas, puesto que no tienen

limitaciones de silicatos en los procesos de reciclamiento de aguas residuales marinas de origen acuícola provenientes de sistemas de bajo recambio.

6.7.2 Aislamiento y purificación de la flora bacteriana asociada a las cepas de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Se realizaron preparaciones en fresco de las microalgas marinas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con el fin de determinar el grado de pureza y movilidad de las células y se observó que las microalgas no se encontraban axénicas debido a la presencia de cepas bacterianas, por lo tanto, se procedió con el aislamiento de las mismas.

Se crecieron cultivos al 10 % (v/v) de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975), en las mismas condiciones de incubación antes mencionadas. Se inocularon por triplicado 100 µL de cada cultivo microalgal, a placas petri que contenían tres medios diferentes: medio marino 2216 (Zobel 1941), AN + NaCl 2 % (w/v) y TSA + NaCl 2 % (w/v). En cada una de las placas, la muestra fue distribuida de forma homogénea con triángulo de vidrio por extensión en superficie sobre el medio sólido. Todas las placas fueron incubadas a 35 °C durante un periodo de 48 h observando si había crecimiento bacteriano.

A la par y por triplicado, se tomaron muestras de 50 mL de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* para iniciar el proceso de purificación. Las células de microalgas contenidas en dichas muestras, se centrifugaron y lavaron con solución salina estéril al 2 % (w/v) de acuerdo con lo propuesto por Arredondo y Voltolina (2007). El botón celular se recuperó y resuspendió en 5 mL de solución salina estéril al 2 % (w/v), se hicieron frotis en fresco para observar el estado de las células microalgales y para observar presencia/ausencia de carga bacteriana después de los lavados. De cada suspensión se tomaron 100 µL que se inocularon por triplicado en placas petri con medio marino 2216 (Zobel 1941), AN + NaCl 2 % (w/v) y TSA + NaCl 2 % (w/v). Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C, se observó crecimiento y las morfologías coloniales obtenidas se

compararon bajo observación en estereoscopio, con aquellas de las placas inoculadas con los cultivos iniciales de microalgas.

El resto de la suspensión con las células de microalgas lavadas, se sonicaron (Ultrasonic Branson B200) durante 4 min y se hicieron frotis en fresco para corroborar lisis celular. Posteriormente, se inocularon 100 μ L de cada suspensión microalgal por triplicado en placa por extensión de superficie en los tres medios antes mencionados. Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C, se observó crecimiento y las diferentes morfologías coloniales se compararon con aquellas de las placas inoculadas con los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* iniciales y con las morfologías coloniales que aparecieron en las placas inoculadas con los cultivos de las diferentes microalgas después de haberse hecho los lavados.

Lo anterior se llevó a cabo con el fin de observar si las cepas de bacterias aisladas al comienzo de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* podrían ser o no cepas de bacterias endófitas o solo cepas de bacterias que se encontraban al exterior de su pared celular.

Posteriormente se seleccionaron las cepas de bacterias con morfología colonial diferente que crecieron en las placas con los tres medios. De cada una, se tomó una asada abundante de biomasa bacteriana y se inocularon por triplicado en 50 mL de caldo selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), para detectar el crecimiento de cepas con mayor capacidad de desarrollo basadas en la asimilación de P, NH_4^+ y carbohidratos.

Los matraces fueron se incubaron durante 48 h a 35 °C con agitación constante (110 rpm). Aquellos que presentaron turbidez por crecimiento bacteriano, se seleccionaron para posteriormente, purificar las cepas bacterianas utilizando la técnica de estría cruzada en placas petri con medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934). Dicha purificación se realizó hasta observar un solo tipo de morfología colonial en la placa y por medio de tinción gram se realizó la clasificación morfológica celular de las colonias de bacterias puras y aisladas.

6.7.3 Tratamientos evaluados para la purificación de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

6.7.3.1 Antibiogramas

Se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento de acuerdo con los métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas (CLSI 2009). Utilizando la técnica de sensidiscos (Dimayuga *et al.* 1998), se probaron 6 antibióticos diferentes: Ampicilina 10 µg (AMP), Tetraciclina 30 µg (TE) (Merck), Trimetoprim/Sulfametoxazol 1.25 / 23.75 µg (SXT), Cloranfenicol 30 µg (CLOR), Gentamicina 10 µg (GM) y Ciprofloxacina 5 µg (CIP) (Sigma).

Los morfotipos bacterianos obtenidos del aislamiento de cepas de bacterias de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, se inocularon por triplicado en placas petri con medio Mueller-Hinton Normal utilizando la técnica de extensión de superficie masiva. Los sensidiscos embebidos con cada uno de los antibióticos antes mencionados, se colocaron en las placas inoculadas las cuales, se incubaron durante 24 h a 35 °C para posteriormente, observar si había crecimiento bacteriano o efecto inhibitorio por la acción de los antibióticos.

6.7.3.2 Evaluación de gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina y su mezcla para eliminar la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Con base en los resultados obtenidos de los antibiogramas, se seleccionaron 3 antibióticos que resultaron positivos en la inhibición del crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*. Se evaluaron 2 concentraciones (200 y 250 µg mL⁻¹) de gentamicina (GM), cloranfenicol (CLOR) (Sigma-Aldrich), tetraciclina (TE) (Merck) y una mezcla de los anteriores utilizando concentraciones de 32 µg mL⁻¹ GM, 500 µg mL⁻¹ CLOR y 12 µg mL⁻¹ TE, respectivamente.

En cada uno de los casos se partió de soluciones stock (10 mg mL^{-1}) que fueron esterilizadas por filtración (Fall Acrodis[®] Syringe filter w / $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ Supor[®] Membrane Sterile) y mantenidas bajo refrigeración en frascos ámbar.

Para esta evaluación se utilizaron por triplicado, cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975) con una densidad celular inicial de $1.5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$, a los que se les aplicaron cada uno de los antibióticos y la mezcla respectivamente. Se contó también con cultivos sin antibióticos que se fungieron como control.

Los matraces fueron incubados durante 4 d a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación constante (110 rpm) e intensidad luminosa de $54.6 \text{ }\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo $12 \text{ h}_{\text{luz}} / 12 \text{ h}_{\text{oscuridad}}$. Al quinto día se agregaron los antibióticos y después de 4 h y 8 h de haberlos aplicado, se tomaron por triplicado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de cada tratamiento y de cada cepa de microalga; los cuales, fueron inoculados por extensión de superficie en placas petri con medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975). Las placas se incubaron durante 24 - 48 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ para observar si la variación en la temperatura afectaba el crecimiento de las cepas de bacterias.

6.7.3.3 Evaluación de gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, vancomicina, neomicina y su mezcla para eliminar la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Para esta evaluación se modificó la metodología propuesta por Azma *et al.* (2010) ya que se utilizó acetato de sodio como fuente de carbono en vez de glucosa; lo anterior con objeto de incrementar la biomasa de microalgas (Arredondo y Voltolina, 2007). Se partió de soluciones stock (10 mg mL^{-1}) de cada uno de los antibióticos a evaluar: gentamicina (GM), cloranfenicol (CLOR), kanamicina (KM), neomicina (NM), vancomicina (VM) (Sigma), tetraciclina (TE) (Merck), además de una solución stock con la mezcla de NM + VM ($10 \text{ mg mL}^{-1} + 5 \text{ mg mL}^{-1}$). Todas las soluciones se esterilizaron por filtración (Fall

Acrodis[®] Syringe filter w / 0.2 μm Supor[®] Membrane Sterile) y se mantuvieron bajo refrigeración en frascos ámbar.

Como inóculos se utilizaron cultivos con alta densidad celular de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975), de los cuales se tomaron 7.5 mL que se centrifugaron en condiciones particulares para cada una de las microalgas con el fin de recuperar el botón celular (*C. capsulata*: 20 min, 2100 rpm, 4 °C; *T. suecica* y *T. chui*: 17 min, 1100 rpm, 4 °C). El botón se resuspendió en 7.5 mL de medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + acetato de sodio 0.04 % (w/v); se agregaron 150 μL de las soluciones stock de cada antibiótico, respectivamente y los 42 tubos se incubaron durante 10 d a 25 ± 2 °C con agitación orbital constante (100 rpm). La mitad de ellos se mantuvieron con luz directa (intensidad luminosa de $54.6 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 h_{oscuridad}) y el resto de los tubos solo recibieron luz ambiental. Cada prueba se realizó por duplicado.

Durante 5 d, cada 8 h los tubos con las células de las tres microalgas evaluadas se centrifugaban en las condiciones antes mencionadas, se eliminaba el sobrenadante y se agregaban de nuevo 7.5 mL de medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + acetato de sodio 0.04 % (w/v), además de 150 μL de las soluciones stock de cada antibiótico, respectivamente. Lo anterior se continuó durante 5 d más pero las centrifugaciones y cambio de medio se hicieron cada 12 h.

Con el fin de observar si había efecto inhibitorio de los antibióticos sobre el crecimiento de la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, se realizaron dos plaqueos. El primero se hizo después de 5 d de tratamiento y el segundo, al final del experimento (10 d). En cada uno de ellos se tomaron 100 μL de muestra (sobrenadante antes de hacer el cambio de medio con antibiótico) que se inocularon por triplicado utilizando la técnica de extensión de superficie en placas petri con medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + acetato de sodio 0.04 % (w/v). Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C y se observó si había crecimiento bacteriano.

6.7.4 Aislamiento de las cepas de bacterias persistentes de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* después del tratamiento con diferentes antibióticos y centrifugación

Se tomaron muestras de las cepas bacterianas que aparecieron en el plaqueo final (10 d) después del tratamiento de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con GM, CLOR, KM, NM, VM, TE y la mezcla de NM + VM más centrifugación. El aislamiento se llevó a cabo utilizando la técnica de estría cruzada en placas petri con medio marino 2216 (Zobel 1941), dicha purificación se realizó hasta observar en la placa un solo tipo de morfología colonial y por medio de tinción gram se realizó la clasificación morfológica celular de los morfotipos coloniales de bacterias puras y aisladas.

6.7.5 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de la flora bacteriana de acompañamiento de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Se realizó la extracción del DNA utilizando el Fast DNA® SPIN Kit for soil (MP Biomedicals) a los diferentes morfotipos de bacterias aislados de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* y a los aislamientos obtenidos de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* después de su tratamiento con GM, CLOR, KM, NM, VM, TE y la mezcla de NM + VM más centrifugación.

El DNA fue purificado con el kit Gene-clean (MP Biomedicals) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. La concentración y pureza del DNA fue calculada con un nanofotómetro (Implen), mientras que su calidad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Para la identificación de las bacterias se amplificó un fragmento correspondiente a la región V3/V4 del 16 sRNA, utilizando para ello los oligos 120F (actggcggacgggtgagtaa) y 518R (cgtattaccggctgctgg). La amplificación se llevó a cabo en volúmenes de 25 μ L conteniendo 100 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 μ M de cada oligo, 0.2 mM de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa en 20 mM de Tris/HCl (pH 9.0).

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min; treinta ciclos desnaturalizando a 95 °C por 1 min, alineando a 55 °C por 1 min y extendiendo a 72 °C por 1 min 30 seg y un ciclo a 72 °C por 10 min como paso final.

Los productos obtenidos en la reacción de PCR se purificaron empleando el kit QUIAquick (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener la secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados, los productos se enviaron a la compañía GENEWIZ, Inc. (New Jersey, USA). Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron comparándolas con las existentes en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD USA), utilizando la plataforma BLASTn, aplicando la matriz BLOSUM62. Como criterio para validar las identidades, se utilizó el estadístico $e \leq 0.000001$ y un porcentaje de identidad superior al 97%.

6.7.6 Conservación de las cepas de bacterias heterotróficas seleccionadas e identificadas a nivel molecular

De cada una de las diferentes cepas de bacterias que resultaron de la prueba de inhibición de crecimiento utilizando diferentes antibióticos más centrifugación provenientes de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, se tomó una asada abundante de biomasa bacteriana que se inoculó en tubos con 5 mL de caldo marino 2216 (Zobel 1941), los tubos se incubaron durante 24 h a 35 °C con agitación constante (110 rpm).

Posteriormente en tubos de criopreservación, se mezclaron 400 µL de cada uno de los cultivos bacterianos con 400 µL de Glicerol 30 % estéril por triplicado y se guardaron en un ultracongelador a -80 °C para asegurar su criopreservación.

6.7.7 Evaluación de la actividad extracelular amilasa y solubilización de fosfatos de la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

6.7.7.1 Actividad Amilolítica

Con el fin de observar si las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* poseen actividad amilolítica, se prepararon placas petri conteniendo un medio mineral enriquecido con almidón basado en lo propuesto por Redfield (1934) modificado como se muestra a continuación: 0.5 g KNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g CaCl₂, 0.002 g FeCl₃, 10 g NaCl, 10 g Almidón comercial, 1 g Glucosa, 0.025 g Extracto de levadura, 15 g Agar, el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 1M después de autoclave.

Las placas se inocularon con una pequeña estría cerrada de cada cepa bacteriana por triplicado y se incubaron durante 24 h a 35 °C. Las placas que mostraron crecimiento bacteriano se revelaron con una solución de Lugol al 20 % para observar la presencia de halos de solubilización de almidón.

6.7.7.2 Solubilización de Fosfatos

Esta prueba se realizó con el fin de observar si las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* eran capaces de solubilizar fosfatos, por lo que se utilizó el medio propuesto por Nautiyal (1999) (5 g MgCl₂·6H₂O, 0.25 g MgSO₄·7H₂O, 0.2 g KCl, 5 g NaCl, 0.1 g (NH₄)₂SO₄, 5 g Hidroxiapatita, 20 g Glucosa, 0.025 g Extracto de levadura, 15 g Agar).

Las placas con dicho medio se inocularon por triplicado con una pequeña estría cerrada de cada cepa bacteriana y se incubaron durante 24 h a 35 °C; se observó la presencia de halos de solubilización.

6.7.8 Pruebas de antagonismo entre los componentes de la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

Esta evaluación se realizó para saber si alguna de las cepas identificadas pertenecientes a la flora bacteriana de las microalgas presentaba efecto inhibitorio en el crecimiento de cualquiera de ellas mismas. Como inóculos se utilizaron cultivos de las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* crecidas (48 h, 35 °C, 110 rpm) en caldo marino 2216 (Zobel 1941), lavados con solución salina estéril 2 % (w/v) y ajustados a D.O. 1.0 ($\lambda = 540$ nm).

A la par, se inocularon por triplicado placas con medio marino 2216 (Zobel 1941) con las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* utilizando el método de estría cerrada para obtener cultivos densos (*Placas A*). Dichas placas se incubaron durante 48 h a 35 °C; de cada placa se tomaron muestras con un sacabocados (5 mm diámetro, acero inoxidable) esterilizado por flama en mechero para su uso posterior en la prueba.

Aunado a lo anterior, se inocularon con las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* por triplicado, placas con medio marino 2216 (Zobel 1941) utilizando el método de estría cerrada para obtener cultivos densos (*Placas B*). Se incubaron durante 24 h a 35 °C y de ellas se tomó biomasa bacteriana que se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril 2% (w/v) para obtener suspensiones utilizadas en la prueba.

Por último, utilizando el método de estría cerrada, se inocularon con las suspensiones de las cepas de bacterias provenientes de las *Placas B*, triplicados de placas con medio marino 2216 (Zobel 1941) (*Placas C*). En estas placas, también se colocaron los bocados obtenidos de las *Placas A* para permitir el contacto célula a célula de las cepas de bacterias. Las *Placas C* se incubaron durante 24 h a 4 °C para favorecer la difusión de los exudados celulares. Posteriormente se sacaron del refrigerador, se incubaron durante 24 h a 35 °C y se registró la presencia de halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Como controles,

se utilizaron placas con medio marino 2216 (Zobel 1941) a las que sólo se les pusieron los bocados de las diferentes cepas bacterianas

6.7.9 Evaluación del crecimiento de la flora bacteriana presente en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) modificado con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono

Con esta prueba se buscó la combinación de diferentes fuentes tanto de carbono como de nitrógeno que permitieran el crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en el medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975).

Como fuentes de nitrógeno se utilizaron: NaNO_3 , NaNO_2 , NH_4NO_3 (Sigma) y la mezcla de las tres anteriores conservando la concentración de nitrógeno original del medio mineral estéril F/2 propuesta por Guillard y Ryther (1962) y Guillard (1975). Las fuentes de carbono utilizadas, acetato de sodio (Merck) y glucosa (Sigma) se añadieron al medio al 1 % (w/v).

Como inóculos se utilizaron cultivos ajustados a D.O. 1.0 ($\lambda = 540 \text{ nm}$) de las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* crecidas (48 h, 35 °C, 110 rpm) en caldo marino 2216 (Zobel 1941). En tubos con 5 mL de los diferentes medios evaluados, se inocularon 100 μL de los cultivos mencionados por triplicado; los tubos se incubaron inclinados hasta observar crecimiento bacteriano (turbidez) durante 96 h a 25 ± 2 °C, con agitación orbital (120 rpm).

Al final del periodo de incubación se tomaron muestras de 1 mL de cada tratamiento y se registró la absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$) utilizando un espectrofotómetro HACH DR2700.

6.7.10 Evaluación del crecimiento de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂ con y sin acetato de sodio 1 %

Esta evaluación se realizó con la finalidad de observar el crecimiento de las tres cepas de microalga *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* en el medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) utilizando NaNO₂ como fuente de nitrógeno y agregando o no al mismo, acetato de sodio 1 % (w/v) como fuente de carbono orgánico.

Se utilizaron cultivos de 300 mL de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, por triplicado. En el caso de *C. capsulata* los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 1.0×10^6 cel mL⁻¹; para *T. suecica* y *T. chui* la densidad celular inicial fue de 2.0×10^5 cel mL⁻¹. Los matraces se incubaron durante 9 d a 25 ± 2 °C, con agitación orbital (110 rpm) e intensidad luminosa de $54.6 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 h_{oscuridad}.

Se realizaron recuentos celulares diarios siguiendo la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina (2007) utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer. La tasa de crecimiento se calculó durante la fase exponencial de los cultivos utilizando la siguiente fórmula (Guillard 1973):

$$(1) \quad k = \log_2 (N_1/N_0) / (t_1/t_0)$$

Donde k es la tasa de crecimiento por día, t_0 el tiempo al inicio de la fase exponencial (días), N_0 el número de células de microalga al comienzo de la fase exponencial (cel mL⁻¹) y N_1 el número de células de microalga al final (t_1).

6.7.11 Evaluación del crecimiento de *C. capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻ con diferentes porcentajes de acetato de sodio

Al observar que la presencia y concentración de acetato de sodio en el medio tenía efecto sobre el crecimiento de las microalgas, se decidió probar un gradiente de concentraciones de dicha fuente de carbono para obtener la concentración, que beneficiara el incremento de la biomasa microalgal y no el de las bacterias presentes en los cultivos puesto que, después de tratar a *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con los diferentes antibióticos permanecieron tres morfologías bacterianas diferentes en los cultivos de las tres microalgas.

Para esta evaluación, solo se utilizó a *C. capsulata* ya que en los ensayos previos, fue en los cultivos de la misma, donde el efecto negativo de la fuente de carbono sobre su crecimiento fue más evidente.

Para esta prueba se utilizó el medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) utilizando NaNO₂ como fuente de nitrógeno y siete diferentes porcentajes de acetato de sodio (0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1 % w/v) que se agregaron al medio respectivamente.

Se utilizaron cultivos de 300 mL de *C. capsulata*, por triplicado con una densidad celular inicial de 1.1×10^6 cel mL⁻¹. Los matraces se incubaron durante 7 d a 25 ± 2 °C, con agitación orbital (110 rpm) e intensidad luminosa de $54.6 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 h_{oscuridad}.

Se realizaron recuentos celulares diarios siguiendo la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina (2007). La tasa de crecimiento se calculó durante la fase exponencial de los cultivos utilizando la ecuación (1) antes descrita.

6.7.12 Evaluación del crecimiento de *C. capsulata* en presencia de su flora bacteriana

Esta prueba se realizó con el fin de evaluar el efecto del componente bacteriológico aislado e identificado de los cultivos de *C. capsulata* (CC) sobre su crecimiento y sobre la asimilación de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-} en el medio de cultivo. Se utilizó el medio mineral estéril F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) con NaNO_2 como fuente de nitrógeno así como el mismo medio pero enriquecido con acetato de sodio 0.04 % (w/v).

Los tratamientos evaluados se describen en la Tabla III; dichos tratamientos, son las diferentes combinaciones de *C. capsulata* con las 5 cepas de bacterias (AM, ML, MA, BM y MS) aisladas de su cultivo, así como los tiempos de inoculación de las mismas (T_0 , T_4).

Tabla III.- Tratamientos utilizados para la evaluación del crecimiento de *C. capsulata* en presencia de su flora bacteriana.

Tratamiento	Combinación
(0)	CC
(1)	CC+[AM+ML+MA] T_4
(2)	CC+BM T_4
(3)	CC+MS T_4
(4)	CC+[BM+MS+AM+ML+MA] T_4
(5)	CC+[BM+MS+AM+ML+MA] T_0
(6)	CC+[BM+MS+AM+ML+MA] T_0 + acetato de sodio 0.04 % (w/v)

CC: *Chlorella capsulata*; BM: *Bacillus megaterium*; MS: *Marinobacter salsuginis*; MA: *Marinobacter alkaliphilus*; AM: *Alteromonas macleodii*; ML: *Muricauda lutimaris*. T0 y T4: Tiempo de inoculación de las diferentes bacterias a los cultivos de *C. capsulata*.

En el caso de la flora bacteriana, se utilizaron como inóculos, cultivos de las cepas de bacterias aisladas (AM, ML, MA, BM y MS) de los cultivos de *C. capsulata* crecidas (48 h, 35 °C, 110 rpm) en caldo marino 2216 (Zobel 1941), las cuales, se lavaron con solución salina estéril 2 % (w/v) y se ajustaron a D.O. 1.0 ($\lambda = 540$ nm). Con respecto a *C. capsulata* se utilizaron cultivos de 150 mL, por triplicado con una densidad celular inicial de 1.0×10^6 cel mL⁻¹.

Los matraces se incubaron durante 12 d a 25 ± 2 °C, con agitación orbital (110 rpm) e intensidad luminosa de $54.6 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo 12 h_{luz} / 12 h_{oscuridad}. A los tratamientos del (1) al (4) después de 4 d de incubación, se les agregó 150 μL de las suspensiones de bacterias según fuese el tratamiento. Este volumen representa el 1 % del volumen final del cultivo, el cual se dividió entre el número de cepas de bacterias presentes en los tratamientos en cuestión, siendo el mismo volumen agregado para cada cepa bacteriana.

En el caso del tratamiento (5) las bacterias fueron agregadas desde el comienzo de experimento, al igual que al tratamiento (6) solo que para éste, el medio fue enriquecido con acetato de sodio. El tratamiento (0) no fue inoculado con cepas bacterianas ni enriquecido con acetato pues fungió como control.

Diariamente hasta el final de la evaluación (12 d) se realizaron recuentos celulares de *C. capsulata* siguiendo la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina (2007), la tasa de crecimiento se calculó durante la fase exponencial de los cultivos utilizando la ecuación (1) antes descrita.

Adicionalmente, se tomaron muestras de cada tratamiento (50 mL) al inicio, al cuarto día (cuando se agregaron las bacterias) y al final del experimento para cuantificar en un autoanalizador equipado con automuestreo (Lachat Quick Chem-8000) la variación de la concentración de NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- (Valderrama 1981) y PO_4 (Strickland y Parsons 1972; Greenberg *et al.* 2005) en el medio.

Por último para confirmar la presencia de bacterias agregadas en los cultivos, al final del experimento, se tomó 1 mL de cada tratamiento y se realizaron diluciones seriadas. Alícuotas de 100 μL se inocularon por triplicado utilizando la técnica de extensión de superficie en placas petri con medio marino 2216 (Zobel 1941). Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C y se registró el valor de UFC mL^{-1} .

6.7.13 Análisis estadístico

En todos los experimentos, los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad. Para evaluar la influencia del acetato de sodio sobre la tasa de crecimiento y densidad celular de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, a cada serie de datos se le realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples.

Para evaluar la influencia de las diferentes combinaciones de bacterias sobre la tasa de crecimiento y la densidad celular de *C. capsulata*, a cada serie de datos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples.

Por último, se realizó un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto tanto de los tratamientos como del tiempo de inoculación de las bacterias sobre la concentración de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} en el medio. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA™ 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) y las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$.

Por último, con el fin de evaluar la ecoeficiencia en el uso del nitrógeno y fósforo en sistemas de cultivo experimental de *L. vannamei* con el uso de la asociación microalga-bacteria heterotrófica en sistemas de fitorremediación, se realizaron las siguientes actividades:

6.8 Bioensayo del cultivo experimental de *L. vannamei* utilizando asociaciones microalga-consorcio bacteriano para procesos de ficorremediación

Durante 32 d se llevó a cabo dicho bioensayo con objeto de evaluar la asimilación de nutrientes residuales de P y N generados del cultivo de *L. vannamei* por parte de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* así como, tres de las cepas de microalgas mayormente utilizadas como alimento en acuicultura (*Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*) en conjunto con un consorcio microbiano utilizado en la industria (Acuicultura Mahr S.A. de C.V., Baja California Sur, México).

Para este bioensayo se utilizaron postlarvas de *L. vannamei* con un peso inicial de 30 mg que fueron alimentadas cuatro veces por día con una dieta comercial de 30 % de proteína (VIMIFOS, S.A. de C.V., México) con la cantidad de alimento correspondiente al 10 % de la biomasa del acuario.

Se tuvieron tres réplicas por cada tratamiento (Tabla IV) asignadas completamente al azar en 24 acuarios de 50 L. Cada acuario contenía 15 organismos que se mantuvieron bajo condiciones de cultivo controladas (temperatura 30 ± 0.5 °C, oxígeno disuelto $>4\text{mg L}^{-1}$, salinidad 38 UPS y fotoperiodo $12\text{h}_{\text{luz}}/12\text{h}_{\text{oscuridad}}$) las cuales, eran verificadas cada tercer día.

El peso de los organismos se registró al comienzo del experimento, a la mitad y al final del mismo para calcular el peso final, la tasa de crecimiento y el porcentaje de supervivencia.

Diariamente se inoculaba a los acuarios 1 L (1.5×10^6 cel mL^{-1}) del cultivo de las diferentes microalgas (*C. capsulata*, *T. suecica*, *T. chui*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*) y cada tercer día se inoculaban 4 mL del consorcio microbiano.

Adicionalmente, cada tercer día se tomaron muestras de 50 mL de cada tratamiento para cuantificar en un autoanalizador equipado con automuestreo (Lachat Quick Chem-8000) la variación de la concentración de NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- (Valderrama 1981) y PO_4^{-3} (Strickland y Parsons 1972; Greenberg *et al.* 2005) en el medio.

Tabla IV.- Tratamientos evaluados en el experimento del cultivo experimental de *L. vannamei* utilizando asociaciones microalga-bacteria heterotrófica para procesos de fitorremediación.

Tratamiento
Control (solo alimento)
Consortio microbiano
<i>CC</i> + CM
<i>TS</i> + CM
<i>TC</i> + CM
<i>IG</i> + CM
<i>PL</i> + CM
<i>CHC</i> + CM

CC: Chlorella capsulata; TS: Tetraselmis suecica; TC: Tetraselmis chui; IG: Isochrysis galbana; PL: Pavlova lutheri; CHC: Chaetoceros calcitrans; CM: Consortio microbiano.

Solo en el caso de los acuarios control (solo alimento) se realizaba recambio de agua (80% d⁻¹), en los acuarios restantes no se utilizó ningún porcentaje de recambio puesto que se evaluó un sistema de aireación (skimmer y cuadro de tubos de pvc con orificios), que permitía que las microalgas se elevaran a la superficie y junto con los restos de alimento formaran biopelículas que podían ser retiradas fácilmente de los sistemas de cultivo o ser consumidas por los camarones dentro del acuario (Figura 3).

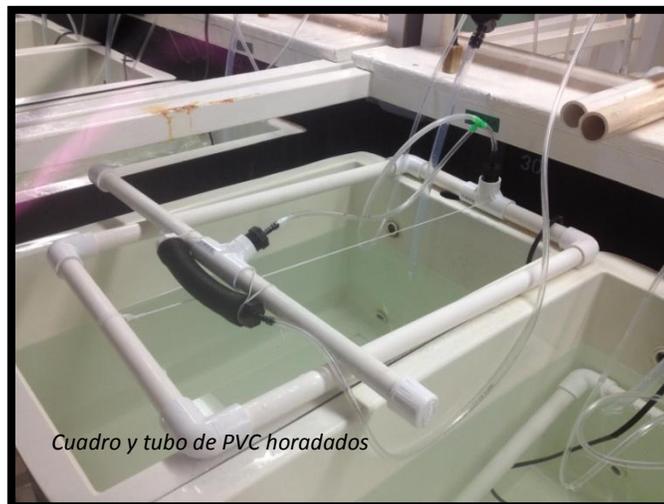


Figura 3.- Sistema de aireación que genera el burbujeo para la formación de biopelículas en los sistemas de cultivo de *L.vannamei*.

6.8.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad; para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos evaluados sobre la concentración de P y N en el agua residual, se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples. Para evaluar la influencia de la combinación de las diferentes microalgas y el consorcio microbiano sobre el crecimiento y supervivencia de *L. vannamei*, a cada serie de datos se le realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de agrupamiento de Tuckey para comparaciones múltiples. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA™ 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) y las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados de las actividades derivadas de la caracterización del agua residual del cultivo de *L. vannamei* a partir de la cantidad del contenido proteico de las dietas experimentales:

7.1 Análisis químico proximal, contenido energético y humedad de las seis dietas experimentales basadas en fuentes de proteína animal y vegetal

En la Tabla V, se muestran los resultados del análisis químico proximal, contenido de energía y humedad de las seis dietas experimentales (DAV y DV) y de la dieta comercial (DC), utilizadas en los bioensayos de retención proteica y liberación de nutrientes.

Tabla V. Composición proximal (media \pm DS), humedad, energía y contenido de nitrógeno y fósforo de las seis dietas experimentales para *L. vannamei* basadas en proteína vegetal y animal.

Composición proximal (g Kg ⁻¹ ms)	DAV _(B)	DAV _(M)	DAV _(A)	DV _(B)	DV _(M)	DV _(A)	DC
Proteína	244.1 \pm 2.20	338.3 \pm 1.2	414.3 \pm 3.4	256.9 \pm 1.7	352.0 \pm 3.2	373.4 \pm 3.2	406.2 \pm 2.5
Lípidos	64.3 \pm 0.2	64.6 \pm 1.5	66.4 \pm 1.6	64.2 \pm 0.9	64.1 \pm 2.7	62.9 \pm 0.5	47.9 \pm 3.1
Fibra	5.7 \pm 0.6	7.7 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5	10.2 \pm 0.9	13.4 \pm 0.8	28.7 \pm 1.3	22.6 \pm 3.9
Cenizas	71.1 \pm 0.3	91.5 \pm 0.9	107.6 \pm 0.00	46.7 \pm 0.3	58.9 \pm 0.3	67.1 \pm 0.1	85.7 \pm 0.4
ELN	614.9	498.0	403.8	622.1	511.5	467.9	437.6
Humedad (%)	5.58 \pm 1.30	4.94 \pm 0.7	5.40 \pm 2.3	6.83 \pm 1.8	6.51 \pm 3.1	5.90 \pm 1.8	9.98 \pm 0.6
Energía (Kcal)	4.68 \pm 0.003	4.75 \pm 0.03	4.77 \pm 0.01	4.77 \pm 0.01	4.82 \pm 0.03	5.03 \pm 0.07	4.65 \pm 0.01
Fósforo (gP kg ⁻¹ dieta _{ms})	11.86 \pm 0.01	15.12 \pm 0.26	17.65 \pm 0.07	4.74 \pm 0.06	5.77 \pm 0.27	6.83 \pm 0.15	9.40 \pm 0.28
Nitrógeno (gN kg ⁻¹ dieta _{ms})	39.05 \pm 0.35	54.12 \pm 0.19	66.28 \pm 0.54	41.11 \pm 0.27	56.32 \pm 0.51	59.75 \pm 0.51	64.99 \pm 0.40

DAV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; DAV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; DAV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; DV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; DV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; DV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; ms: materia seca.

7.2 Evaluación de la concentración de las diferentes formas de P y N residuales

En ambos bioensayos de liberación de nutrientes, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de PT, PID y PP. En los tres casos, la concentración aumentó de acuerdo con el nivel de proteína sin importar la fuente proteica utilizada en las dietas (Tabla VI). La variación en la fuente de proteína utilizada, el nivel proteico o el tamaño de los camarones no tuvo efecto sobre la concentración de POD ya que, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$). Tanto en BLN_1 como en BLN_2 , se observó que la mayor parte del fósforo se encontraba como PP y los valores más altos se detectaron en las muestras de agua donde los organismos fueron alimentados con la dieta $DAV_{(A)}$ (BLN_1 : $0.604 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$; BLN_2 : $0.623 \pm 0.12 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabla VI.- Concentración (mg L^{-1} ; media \pm DS) de las diferentes formas de fósforo (orgánico, inorgánico y particulado) en el agua residual del cultivo de *L. vannamei* alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.

	DC	$DAV_{(B)}$	$DAV_{(M)}$	$DAV_{(A)}$	$DV_{(B)}$	$DV_{(M)}$	$DV_{(A)}$
BLN_1							
PT	0.421 ± 0.15^b	0.307 ± 0.14^{ab}	0.362 ± 0.18^{ab}	0.736 ± 0.06^c	0.153 ± 0.02^a	0.173 ± 0.03^{ab}	0.203 ± 0.03^{ab}
PID	0.020 ± 0.01^{ab}	0.025 ± 0.01^{abc}	0.038 ± 0.01^{bc}	0.042 ± 0.01^c	0.011 ± 0.00^a	0.011 ± 0.00^a	0.023 ± 0.01^{ab}
POD	0.057 ± 0.01^a	0.098 ± 0.07^a	0.131 ± 0.07^a	0.089 ± 0.03^a	0.071 ± 0.02^a	0.079 ± 0.03^a	0.095 ± 0.03^a
PP	0.343 ± 0.16^b	0.183 ± 0.15^{bc}	0.193 ± 0.20^{bc}	0.604 ± 0.04^c	0.069 ± 0.01^a	0.081 ± 0.02^a	0.084 ± 0.01^{ab}
BLN_2							
TP	0.481 ± 0.13^a	0.505 ± 0.09^a	0.779 ± 0.05^b	0.967 ± 0.15^b	0.325 ± 0.05^a	0.446 ± 0.06^a	0.495 ± 0.12^a
DIP	0.003 ± 0.01^a	0.035 ± 0.02^a	0.010 ± 0.01^a	0.134 ± 0.10^b	0.016 ± 0.02^a	0.009 ± 0.01^a	0.002 ± 0.00^a
DOP	0.160 ± 0.05^a	0.153 ± 0.01^a	0.203 ± 0.02^{ab}	0.208 ± 0.05^{ab}	0.176 ± 0.03^a	0.217 ± 0.04^{ab}	0.265 ± 0.03^b
PP	0.316 ± 0.12^a	0.315 ± 0.06^a	0.565 ± 0.07^b	0.623 ± 0.12^b	0.132 ± 0.05^a	0.219 ± 0.08^a	0.224 ± 0.10^a

PT: Fósforo total; PID: Fósforo inorgánico disuelto; POD: Fósforo orgánico disuelto; PP: Fósforo particulado; $DAV_{(B)}$: dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; $DAV_{(M)}$: dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; $DAV_{(A)}$: dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; $DV_{(B)}$: dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; $DV_{(M)}$: dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; $DV_{(A)}$: dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; BLN: Bioensayo de liberación de nutrientes. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Con respecto a la liberación de nitrógeno, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de NT y NID en ambos bioensayos en todos los tratamientos (Tabla VII). La mayoría del nitrógeno residual se encontró como NH_4^+ y los valores más altos se detectaron en las muestras de agua, donde los organismos fueron alimentados con dietas de alto contenido proteico sin importar la fuente de proteína utilizada: $\text{DAV}_{(A)}$ (BLN_1 : $1.498 \pm 0.06 \text{ mg L}^{-1}$; BLN_2 : $2.575 \pm 0.66 \text{ mg L}^{-1}$) y $\text{DV}_{(A)}$ (BLN_1 : $1.530 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$; BLN_2 : $3.032 \pm 0.43 \text{ mg L}^{-1}$). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores de NO_2^- y NO_3^- entre los tratamientos en ninguno de los experimentos (Tabla VIII).

Tabla VII.- Concentración (mg L^{-1} ; media \pm DS) de las diferentes formas de nitrógeno (orgánico, inorgánico y particulado) en el agua residual del cultivo de *L. vannamei* alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.

	DC	DAV _(B)	DAV _(M)	DAV _(A)	DV _(B)	DV _(M)	DV _(A)
BLN₁							
NT	1.816 \pm 0.27 ^a	1.606 \pm 0.44 ^a	2.803 \pm 0.37 ^{abcde}	2.831 \pm 0.03 ^{abcde}	1.805 \pm 0.78 ^a	2.334 \pm 0.67 ^{ab}	2.624 \pm 0.58 ^{abcd}
NID	0.830 \pm 0.15 ^{ab}	0.410 \pm 0.31 ^a	1.310 \pm 0.21 ^{bc}	1.570 \pm 0.06 ^{bc}	0.782 \pm 0.29 ^{ab}	1.140 \pm 0.26 ^{abc}	1.587 \pm 0.17 ^{bc}
NOD	0.526 \pm 0.13 ^a	0.714 \pm 0.20 ^a	0.914 \pm 0.46 ^a	1.071 \pm 0.45 ^a	0.744 \pm 0.52 ^a	0.766 \pm 0.43 ^a	0.432 \pm 0.35 ^a
NP	0.460 \pm 0.24 ^a	0.482 \pm 0.29 ^a	0.579 \pm 0.53 ^a	0.318 \pm 0.22 ^a	0.379 \pm 0.20 ^a	0.428 \pm 0.18 ^a	0.212 \pm 0.42 ^a
Urea	0.002 \pm 0.00 ^a	0.002 \pm 0.00 ^a	0.002 \pm 0.00 ^a	0.003 \pm 0.00 ^a	0.001 \pm 0.00 ^a	0.002 \pm 0.00 ^a	0.002 \pm 0.00 ^a
BLN₂							
NT	3.803 \pm 0.31 ^{cdef}	2.398 \pm 0.68 ^{abc}	3.897 \pm 0.23 ^{def}	4.919 \pm 0.80 ^{fg}	3.379 \pm 0.94 ^{bcd}	4.135 \pm 0.13 ^{ef}	5.770 \pm 0.59 ^g
NID	1.898 \pm 0.33 ^{cd}	0.928 \pm 0.27 ^{ab}	1.581 \pm 0.11 ^{bc}	2.616 \pm 0.66 ^{de}	1.487 \pm 0.64 ^{bc}	1.982 \pm 0.23 ^{cd}	3.072 \pm 0.43 ^e
NOD	0.568 \pm 0.15 ^a	0.837 \pm 0.58 ^a	0.969 \pm 0.07 ^a	1.002 \pm 0.26 ^a	0.737 \pm 0.25 ^a	0.915 \pm 0.37 ^a	1.190 \pm 0.52 ^a
NP	1.336 \pm 0.28 ^a	1.004 \pm 0.31 ^a	1.347 \pm 0.12 ^a	1.301 \pm 0.43 ^a	1.154 \pm 0.11 ^a	1.238 \pm 0.22 ^a	1.508 \pm 0.60 ^a
Urea	0.003 \pm 0.00 ^a	0.003 \pm 0.00 ^a	0.004 \pm 0.00 ^a	0.004 \pm 0.00 ^a	0.003 \pm 0.00 ^a	0.004 \pm 0.00 ^a	0.004 \pm 0.00 ^a

NT: Nitrógeno total; NID: Nitrógeno inorgánico disuelto; NOD: Nitrógeno orgánico disuelto; NP: Nitrógeno particulado; $\text{DAV}_{(B)}$: dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; $\text{DAV}_{(M)}$: dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; $\text{DAV}_{(A)}$: dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; $\text{DV}_{(B)}$: dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; $\text{DV}_{(M)}$: dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; $\text{DV}_{(A)}$: dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; BLN: Bioensayo de liberación de nutrientes. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla VIII.- Concentración (mg L^{-1} ; media \pm DS) de los componentes (NH_4^+ , NO_3^- y NO_2^-) del nitrógeno inorgánico disuelto en el agua residual del cultivo de *L. vannamei* alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.

	DC	DAV _(B)	DAV _(M)	DAV _(A)	DV _(B)	DV _(M)	DV _(A)
BLN₁							
NH₄⁺	0.774 \pm 0.16 ^{ac}	0.328 \pm 0.26 ^c	1.247 \pm 0.21 ^{ab}	1.498 \pm 0.06 ^b	0.758 \pm 0.30 ^{ac}	1.069 \pm 0.28 ^{ab}	1.530 \pm 0.16 ^b
NO₃	0.053 \pm 0.01 ^a	0.039 \pm 0.03 ^a	0.058 \pm 0.02 ^a	0.066 \pm 0.01 ^a	0.023 \pm 0.02 ^a	0.055 \pm 0.04 ^a	0.054 \pm 0.02 ^a
NO₂	0.003 \pm 0.00 ^a	0.050 \pm 0.09 ^a	0.005 \pm 0.00 ^a	0.006 \pm 0.00 ^a	0.001 \pm 0.00 ^a	0.015 \pm 0.02 ^a	0.003 \pm 0.00 ^a
BLN₂							
NH₄⁺	1.847 \pm 0.34 ^{abc}	0.890 \pm 0.21 ^a	1.538 \pm 0.12 ^{ab}	2.575 \pm 0.66 ^{cd}	1.455 \pm 0.65 ^{ab}	1.935 \pm 0.24 ^{bc}	3.032 \pm 0.43 ^d
NO₃	0.041 \pm 0.01 ^a	0.030 \pm 0.01 ^a	0.032 \pm 0.01 ^a	0.032 \pm 0.02 ^a	0.026 \pm 0.01 ^a	0.038 \pm 0.02 ^a	0.031 \pm 0.01 ^a
NO₂	0.009 \pm 0.00 ^a	0.008 \pm 0.00 ^a	0.011 \pm 0.00 ^a	0.008 \pm 0.00 ^a	0.006 \pm 0.00 ^a	0.009 \pm 0.00 ^a	0.009 \pm 0.00 ^a

NH₄⁺: Amonio; NO₃: Nitratos; NO₂: Nitritos; DAV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; DAV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; DAV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; DV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; DV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; DV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; BLN: Bioensayo de liberación de nutrientes. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P < 0.05).

7.3 Retención de P y N

Los valores de la retención de P, en los tres niveles de proteína evaluados y con el uso de las dietas DV (DV_(B): 18.59 %, DV_(M): 17.17 % y DV_(A): 15.29 %) fueron significativamente (P<0.05) más altos que los valores obtenidos al utilizar las dietas DAV (DAV_(B): 7.92 %, DAV_(M): 7.75 % y DAV_(A): 5.31 %). La retención de N varió en forma significativa (P<0.05) en los tres niveles de proteína evaluados. Ambas tanto la retención de P como la de N, disminuyeron conforme aumentó el nivel proteico en la dieta sin importar la fuente de proteína utilizada (Tabla IX).

Tabla IX.- Contenido y retención de fósforo y nitrógeno (media \pm DS) por parte de *L. vannamei* alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.

	DC	DAV _(B)	DAV _(M)	DAV _(A)	DV _(B)	DV _(M)	DV _(A)
Contenido de P en la biomasa de <i>L. vannamei</i> (g P kg camarón⁻¹)	1.95 \pm 0.07 ^{ab}	1.88 \pm 0.13 ^{ab}	2.34 \pm 0.18 ^b	1.87 \pm 0.10 ^{ab}	1.76 \pm 0.0 ^a	2.01 \pm 0.06 ^{ab}	1.93 \pm 0.2 ^{ab}
Contenido de N en la biomasa de <i>L. vannamei</i> (g N kg camarón⁻¹)	28.50 \pm 0.00 ^c	25.51 \pm 0.00 ^a	26.00 \pm 0.00 ^c	24.70 \pm 0.00 ^b	25.49 \pm 0.00 ^a	29.26 \pm 0.00 ^f	27.23 \pm 0.00 ^d
Retención de P (%)	10.39 ^b	7.92 ^{ab}	7.75 ^{ab}	5.31 ^a	18.59 ^d	17.17 ^{cd}	15.29 ^c
Retención de N (%)	21.93 ^b	32.66 ^e	24.02 ^d	18.63 ^a	31.00 ^f	25.98 ^e	22.79 ^c

DAV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; DAV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; DAV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; DV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; DV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; DV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.4 Efecto de la fuente de proteína utilizada en las dietas experimentales sobre los parámetros de producción de *L. vannamei*

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la supervivencia de *L. vannamei* entre los diferentes tratamientos. Por el contrario, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la tasa de crecimiento (DAV_(A): 0.68 \pm 0.12 g semana⁻¹, DV_(A): 0.70 \pm 0.08 g semana⁻¹) y en el peso final (DAV_(A): 9.49 \pm 1.35 g, DV_(A): 9.62 \pm 0.82 g) entre los tratamientos. Lo anterior se relacionó con el incremento del nivel de proteína en las dietas para ambas fuentes de proteína (Tabla X).

Tabla X.- Parámetros de producción (media \pm DS) de *L. vannamei* alimentado con seis dietas experimentales y una dieta comercial.

	DC	DAV _(B)	DAV _(M)	DAV _(A)	DV _(B)	DV _(M)	DV _(A)
Tasa de crecimiento (g semana⁻¹)	0.66 \pm 0.14 ^d	0.41 \pm 0.02 ^a	0.48 \pm 0.04 ^b	0.68 \pm 0.12 ^d	0.58 \pm 0.14 ^c	0.64 \pm 0.07 ^d	0.70 \pm 0.08 ^d
Peso final (g)	9.39 \pm 1.57 ^c	6.51 \pm 0.26 ^a	7.23 \pm 0.48 ^b	9.49 \pm 1.35 ^c	8.43 \pm 1.57 ^c	9.12 \pm 0.77 ^c	9.62 \pm 0.89 ^c
Supervivencia (%)	83.3 \pm 0.0 ^a	70.8 \pm 15.9 ^a	66.6 \pm 13.6 ^a	75.0 \pm 9.6 ^a	83.3 \pm 19.2 ^a	79.1 \pm 15.9 ^a	87.5 \pm 8.3 ^a

DAV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína animal y vegetal; DAV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína animal y vegetal; DAV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína animal y vegetal; DV_(B): dieta con nivel de proteína bajo basada en proteína vegetal; DV_(M): dieta con nivel de proteína medio basada en proteína vegetal; DV_(A): dieta con nivel de proteína alto basada en proteína vegetal; Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

A continuación se muestran los resultados de las actividades derivadas de la selección de la asociación microalga-bacteria heterotrófica que de acuerdo con la caracterización de las aguas residuales y sus capacidades de remoción de nutrientes, fuera la más apropiada para procesos de biorremediación:

7.5 Bacterias heterotróficas con potencial para procesos de biorremediación

7.5.1 Cepas de bacterias heterotróficas nativas de: sistemas de cultivo de *L. vannamei*, sistemas heterotróficos de cultivo de camarón y cultivos de *C. capsulata* *T. suecica* y *T. chui* con aireación sin filtración

De los tres sistemas de muestreo elegidos, se aislaron en total 92 diferentes morfotipos coloniales de bacterias. De los cuales, 26 crecieron en el medio 2216 (Zobel 1941), 31 en AN + NaCl 2 % y 35 en TSA + NaCl 2 % (Figura 4). Al evaluar el crecimiento de dichas cepas bacterianas en el medio selectivo enriquecido basado en la

relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), solo 30 de los diferentes morfotipos bacterianos crecieron en ese medio.



Figura 4.- Cepa de bacteria aislada de Sistemas de cultivo *L. vannamei* (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) que presentó crecimiento tanto en el medio AN + NaCl 2 %, como en el medio selectivo basado en la relación Redfield.

7.5.2 Actividad amilolítica y solubilización de fosfatos

Al evaluar la capacidad amilolítica de los 30 diferentes morfotipos bacterianos que crecieron en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), se observaron halos de asimilación en 18 de los morfotipos bacterianos (Figura 5) y 12 de los morfotipos no presentaron crecimiento en el medio utilizado para esta prueba. Cabe mencionar que los resultados no variaron con el incremento en el tiempo de incubación (Tablas XI y XII). En cuanto a la solubilización de PO_4^{-3} solo se observaron halos de digestión en 3 de los morfotipos bacterianos (Figura 6).

Tabla XI.- Evaluación de la capacidad amilolítica (24 h) de los diferentes morfotipos bacterianos que presentaron crecimiento en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934).

Colonia	Origen	Crecimiento a las 24 h	Actividad extracelular amilasa (halo)	Diámetro del halo (cm)
A	1	+	+	1.8
C		+	+	1.5
D		+	+	1.9
F		+	+	1.6
G		+	+	1.6
H		+	+	1.3
K		---	---	---
L		---	---	---
M		+	+	1.4
N		---	---	---
R		+	+	1.7
c	2	---	---	---
d		+	+	1.9
e		+	+	1.5
f		+	+	1.7
g		---	---	---
i		+	+	1.7
j		---	---	---
m		---	---	---
n		---	---	---
ñ		---	---	---
p		---	---	---
q	---	---	---	
3	3	+	+	1.7
4		+	+	1.6
5		+	+	1.6
6		---	---	---
7		+	+	1.5
8		+	+	1.7
13		+	+	1.6

1: Sistemas de cultivo *L. vannamei* (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México); 2: Sistemas heterotróficos de cultivo de *L. vannamei* (Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR); 3: Cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con aireación sin filtración.

Tabla XII.- Evaluación de la capacidad amilolítica (48 h) de los diferentes morfotipos bacterianos que presentaron crecimiento en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934).

Colonia	Origen	Crecimiento a las 24 h	Actividad extracelular amilasa (halo)	Diámetro del halo (cm)
A	1	+	+	1.8
C		+	+	1.5
D		+	+	1.9
F		+	+	1.6
G		+	+	1.6
H		+	+	1.3
K		---	---	---
L		---	---	---
M		+	+	1.4
N		---	---	---
R		+	+	1.7
c	2	---	---	---
d		+	+	1.9
e		+	+	1.5
f		+	+	1.7
g		---	---	---
i		+	+	1.7
j		---	---	---
m		---	---	---
n		---	---	---
ñ		---	---	---
p		---	---	---
q	---	---	---	
3	3	+	+	1.7
4		+	+	1.6
5		+	+	1.6
6		---	---	---
7		+	+	1.5
8		+	+	1.7
13	+	+	1.6	

1: Sistemas de cultivo *L. vannamei* (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México); 2: Sistemas heterotróficos de cultivo de *L. vannamei* (Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR); 3: Cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con aireación sin filtración.

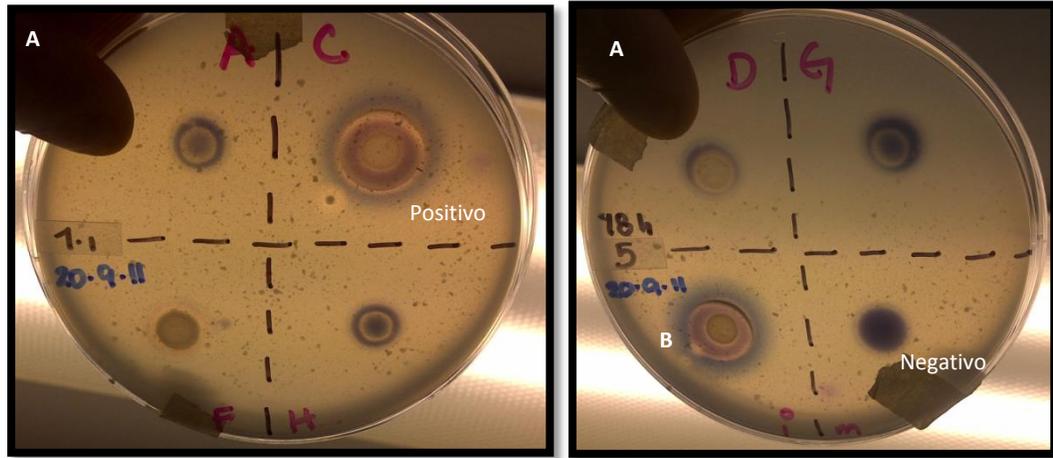


Figura 5.- Cepas de bacterias aisladas de: (A) sistemas de cultivo *L. vannamei* (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) y (B) sistemas heterotróficos de cultivo de *L. vannamei* (Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR) que resultaron positivas a la evaluación de la capacidad amilolítica.

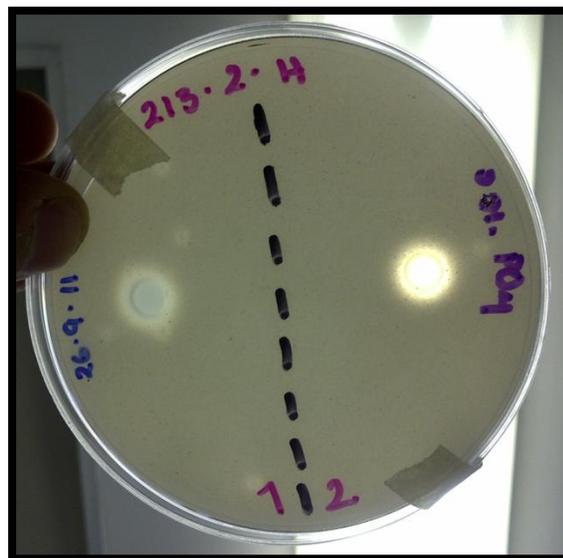


Figura 6.- Cepas de bacterias aisladas de cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con aireación sin filtración que resultaron positivas a la evaluación de la solubilización de fosfatos.

7.5.3 Inhibición del crecimiento bacteriano por acción de extractos microalgales

Al evaluar los extractos obtenidos de los cultivos de las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* sobre el crecimiento de los 30 diferentes morfotipos bacterianos que crecieron en el medio selectivo enriquecido basado en la relación Redfield 106C:16N:1P (Redfield 1934), se observó que el crecimiento de 10 cepas de bacterias fue inhibido por los extractos de las tres microalgas, que el crecimiento de 4 cepas de bacterias fue inhibido por al menos un extracto microalgal, que 5 de las cepas de bacterias resultaron resistentes al cloranfenicol y que solo 11 cepas de bacterias crecieron sin importar la presencia de los extractos de ninguna de las tres microalgas (Figura 7). Las cepas que resultaron inhibidas por los extractos microalgales, así como aquellas que resultaron resistentes al cloranfenicol se descartaron.

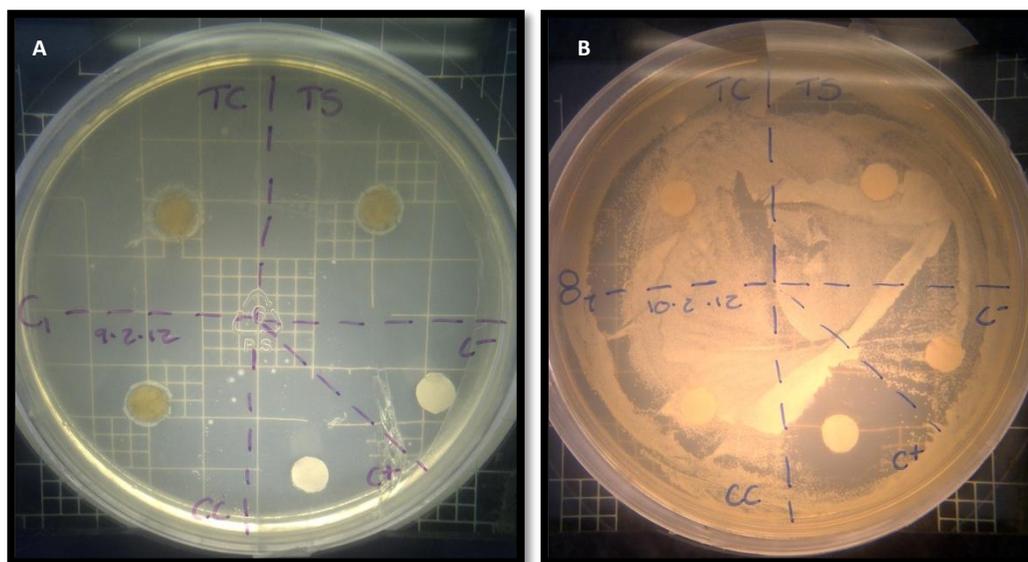


Figura 7.- Cepas de bacterias aisladas de: (A) sistemas de cultivo *L. vannamei* (Organic Shrimp, S.A. de C.V., Melitón Albañez, B.C.S., México) y (B) cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con aireación sin filtración que no fueron inhibidas por extractos microalgales.

7.5.4 Identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA de las bacterias heterotróficas seleccionadas

La identificación molecular se realizó a las 11 cepas de bacterias que no fueron inhibidas por los extractos de las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* y que además presentaron capacidad para solubilizar fosfatos y actividad amilolítica. Al realizar las comparaciones de las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, los aislamientos mostraron fuerte similitud con 5 especies de bacterias diferentes: *Rheinheimera aquimaris*, *Kocuria rosea*, *Pseudomonas mendocina*, *Micrococcus luteus* y *Enterococcus faecium* (Tabla XIII).

Tabla XIII.- Identificación molecular de los morfotipos de bacterias no inhibidas por los extractos de las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*.

Aislamiento	Morfología	Gram	Código de acceso	Nombre bacteria	<i>e</i>	% identidad
C	Bacilos	-	JQ905090.1	<i>Rheinheimera aquimaris</i>	0	98
D	Cocos	+	HQ696417.1	<i>Kocuria rosea</i>	0	99
G	Bacilos	-	CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	97
H	Bacilos	-	CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	99
D	Bacilos	-	JX102498.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	99
7	Cocos	+	HQ322375.1	<i>Kocuria rosea</i>	0	99
8	Cocos	+	FR749855.1	<i>Micrococcus luteus</i>	0	100
13	Bacilos	-	JF905443.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	99
Sol PO ₄ ⁻³ -a	Cocos	+	CP003583.1	<i>Enterococcus faecium</i>	0	99
Sol PO ₄ ⁻³ -b	Cocos	+	CP003583.1	<i>Enterococcus faecium</i>	0	99
Sol PO ₄ ⁻³ -c	Cocos	+	JQ800335.1	<i>Enterococcus faecium</i>	0	99

7.6 Microalgas candidatas para procesos de biorremediación

7.6.1 Flora bacteriana perteneciente a los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

7.6.1.1 Aislamiento, purificación e identificación molecular por secuenciación del 16S rDNA

Siete morfotipos coloniales diferentes de bacterias fueron aislados de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*. De los cuales 6 cepas se caracterizaron celularmente como bacilos gram negativos y solo 1 de los morfotipos fue bacilos gram positivos. Al realizar las comparaciones de las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, los aislamientos mostraron fuerte similitud con tres especies de bacterias diferentes: *Bacillus megaterium* (BM), *Marinobacter salsuginis* (MS) y *Marinobacter alkaliphilus* (MA) (Tabla XIV).

Al realizar los antibiogramas, los diámetros más grandes de los halos de inhibición sobre el crecimiento de las cepas de bacterias se obtuvieron con el uso de CLOR, GM y TE, los cuales al ser evaluados *in vivo* en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* utilizando 200 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no inhibieron el crecimiento de las células bacterianas presentes en dichos cultivos. Cabe mencionar que al utilizar la mezcla de los tres antibióticos, la disminución en la densidad celular bacteriana fue mayor más no lo suficiente como para eliminar por completo las bacterias presentes.

Como resultado de la evaluación de la combinación de antibióticos y centrifugación de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* se observó inhibición en el crecimiento de cepas bacterianas después de 5 d de tratamiento. Lo anterior para *T. suecica* en los tratamientos con y sin luz directa donde se aplicaron CLOR, GM y KM y para *T. chui* en los tratamientos con y sin luz directa donde se aplicaron GM, KM y NM. La mezcla de NM + VM inhibió el crecimiento de células bacterianas en los cultivos de las tres microalgas en los tratamientos con y sin luz directa. Después de 10 d se observó nuevamente la presencia de las células de bacterias en casi todos los tratamientos con excepción de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* tratados con la mezcla de NM + VM con y sin luz directa.

Cabe mencionar que al recuperar las células de las tres microalgas e inocularlas en medio mineral estéril F/2 + acetato de sodio 0.04 % después de 4 d de incubación los cultivos se tornaron turbios, lo que indicaba nuevamente presencia de bacterias.

El incremento en la biomasa de las tres microalgas al utilizar el acetato de sodio, fue evidente solo en los cultivos tratados con KM, VM, NM y la mezcla de NM + VM que recibieron luz directa, en especial aquellos con *C. capsulata*. En el caso de *T. chui*, hubo pérdida de biomasa al eliminar el sobrenadante después de la centrifugación ya que estas microalgas poseen vacuolas de gas que permiten que se eleven a la superficie del medio.

Al final del experimento (10 d) se observaron en el microscopio, frotis en fresco de las células de *T. suecica* y *T. chui* que recibieron luz directa; dichas células, presentaban mayor movimiento en comparación con las células de los cultivos que no recibieron luz. Las células de *C. capsulata* a lo largo de toda la evaluación se observaron con su morfología normal.

De los dos plaques realizados posterior al tratamiento con antibióticos, se obtuvieron 42 aislados con morfología colonial diferente. Al realizar la tinción gram se observó que todos presentaban morfología celular en forma de bacilo y tinción gram negativa. Los cuales, al realizar la identificación molecular y comparar las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, se observó fuerte similitud con las especies de bacterias: *Marinobacter alkaliphilus* (MA), *Alteromonas macleodii* (AM) y *Muricauda lutimaris* (ML) (Tabla XIV). Es importante mencionar que dicho resultado se observó de forma persistente a lo largo de los diferentes aislados procedentes de los cultivos tanto de *C. capsulata*, como de *T. suecica* y *T. chui*.

Tabla XIV.- Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*.

Aislamiento	Morfología	Gram	Código de acceso	Nombre bacteria	e	% identidad
CC1 ₂	Bacilos	-	JQ799108.1	<i>Marinobacter salsuginis</i>	0	99
CC16 ₂	Bacilos	-	JQ286002.1	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	0	99
CC16 ₁₄	Bacilos	-	CP003873.1	<i>Alteromonas macleodii</i>	0	99
CC16 ₁₀	Bacilos	-	GQ505255.1	<i>Muricauda lutimaris</i>	0	99
TS1	Bacilos	-	JQ799108.1	<i>Marinobacter salsuginis</i>	0	99
TS2	Bacilos	+	JQ835985.1	<i>Bacillus megaterium</i>	0	99
TS15 ₂₂	Bacilos	-	GQ505255.1	<i>Muricauda lutimaris</i>	0	99
TS15 ₂₁	Bacilos	-	CP003873.1	<i>Alteromonas macleodii</i>	0	99
TS16 ₁₇	Bacilos	-	JN202613.1	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	0	99
TC3 ₂	Bacilos	-	JN202614.1	<i>Marinobacter salsuginis</i>	0	99
TC15 ₁	Bacilos	-	JN202613.1	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	0	99
TC15 ₂	Bacilos	-	CP003873.1	<i>Alteromonas macleodii</i>	0	99
TC15 ₇	Bacilos	-	GQ505255.1	<i>Muricauda lutimaris</i>	0	99

CC: *Chlorella capsulata*; TS: *Tetraselmis suecica*; TC: *Tetraselmis chui*.

7.6.1.2 Capacidad amilolítica, capacidad para solubilizar fosfatos (PO_4^{-3}) y pruebas de inhibición

Al evaluar la capacidad amilolítica de las cepas de bacterias *B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris*, solo *M. salsuginis* y *M. alkaliphilus* resultaron positivas a dicha prueba (Figura 8). Con respecto a la prueba para solubilizar fosfatos, solo se observaron halos de solubilización en las placas inoculadas con *B. megaterium*. Al realizar las pruebas de inhibición de crecimiento entre las 5 cepas de bacterias aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* no se observó inhibición de crecimiento por ninguna y tampoco entre ninguna de las 5 cepas de bacterias evaluadas (Figura 9).

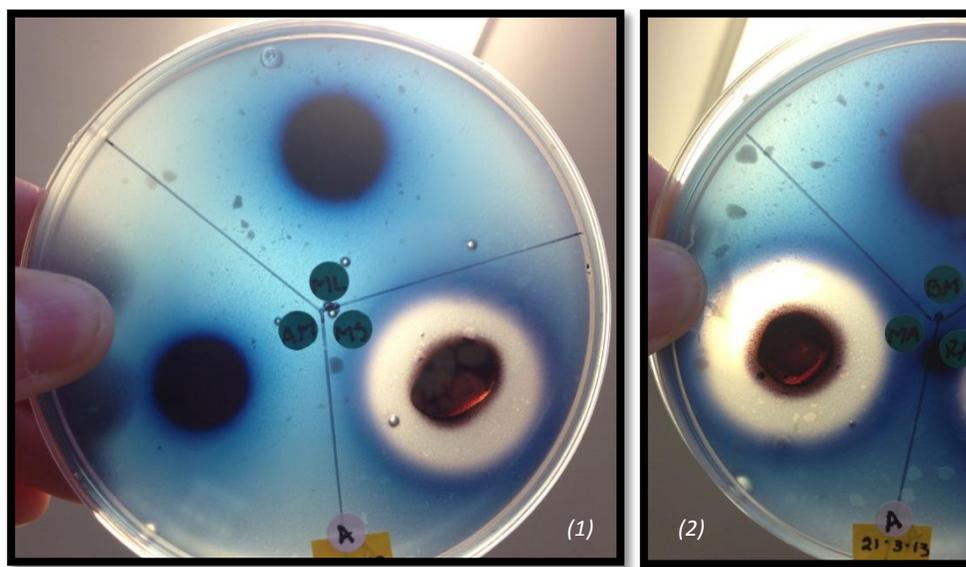


Figura 8.- Cepas de bacterias *Marinobacter salsuginis* (1) y *Marinobacter alkaliphilus* (2) que resultaron positivas en la evaluación de la capacidad amilolítica.

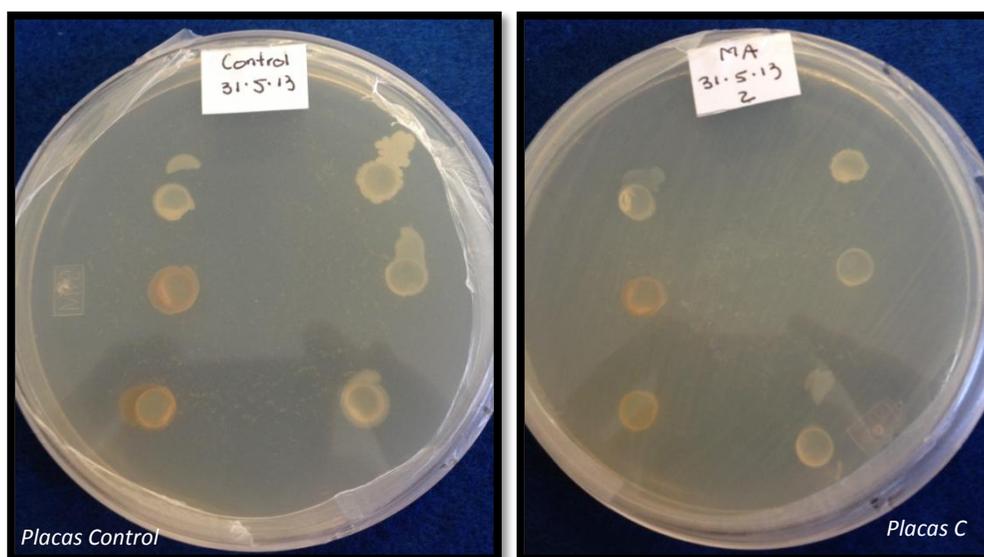


Figura 9.- Placas control con medio marino 2216 (Zobel 1941) sin inoculación de cepas bacterianas y placas inoculadas con suspensiones bacterianas y bocados con cultivos de bacterias utilizadas para las pruebas de inhibición de crecimiento.

7.6.1.3 Crecimiento en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono

Cambiar la fuente de nitrógeno y no enriquecer la composición del medio mineral estéril F/2 con alguna fuente de carbono, no tuvo impacto en el desarrollo bacteriano, puesto que ninguna de las cepas evaluadas (*B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris*) crecieron en dichos medios. Solo se observó crecimiento de *B. megaterium* al utilizar glucosa como fuente de carbono y nitritos, amonio y la mezcla $\text{NaNO}_3 + \text{NaNO}_2 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ como fuente de nitrógeno; las cinco cepas restantes no crecieron en dichas combinaciones. De forma contraria, cuando el medio mineral estéril F/2 se enriqueció con acetato de sodio la fuente de nitrógeno si tuvo impacto sobre el crecimiento de las bacterias, siendo F/2 + NO_2^- + acetato de sodio la combinación que resultó en mejores densidades celulares de las cinco cepas de bacterias evaluadas (*B. megaterium*: 0.92 ± 0.01 ; *M. alkaliphilus*: 1.16 ± 0.05 ; *M. salsuginis*: 1.12 ± 0.06 ; *A. macleodii*: 0.82 ± 0.08 ; *M. lutimaris*: 0.40 ± 0.01).

7.6.2 Cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*

7.6.2.1 Crecimiento en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO_2^- con y sin acetato de sodio 1 %

Agregar acetato de sodio como fuente de carbono a los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, afecta el desempeño de las microalgas. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar el crecimiento de *C. capsulata* puesto que, el cultivo sin acetato alcanzó una concentración celular cuatro veces mayor (16.9×10^6 cel mL^{-1}) que el cultivo enriquecido con acetato (4.8×10^6 cel mL^{-1}). De igual forma se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el crecimiento de *T. chui* ya que se obtuvo una mayor densidad celular en los cultivos sin acetato (1.4×10^6 cel mL^{-1}) que en aquellos enriquecidos con dicha fuente de carbono (1.0×10^6 cel mL^{-1}).

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el crecimiento de *T. suecica* en los medios antes mencionados. Utilizar nitritos (NO_2^-) en el medio mineral estéril F/2 como fuente de nitrógeno favorece el crecimiento de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* (Figuras 10, 11 y 12).

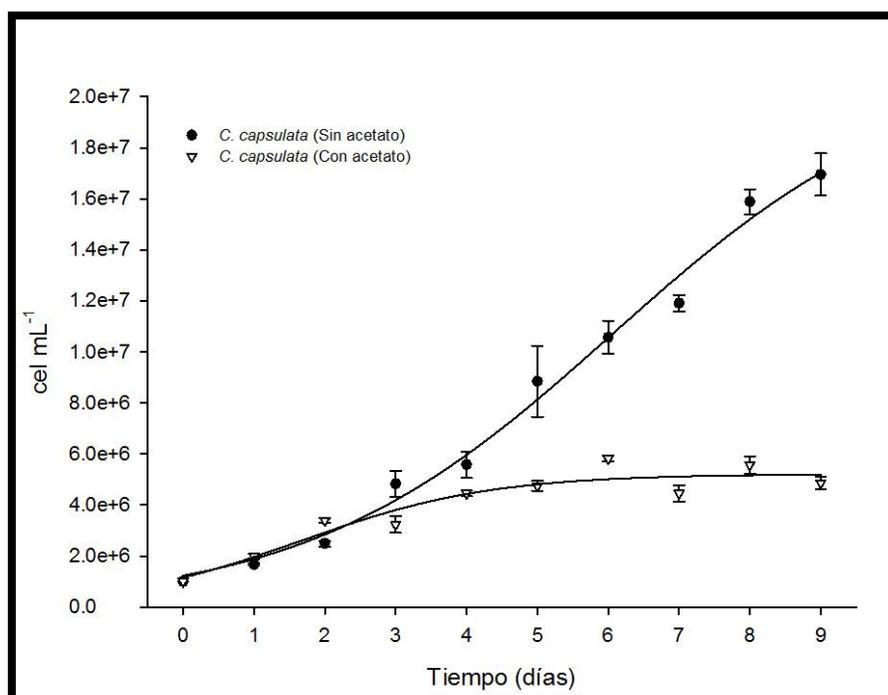


Figura 10.- Curvas de crecimiento de *Chlorella capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO_2^- con y sin acetato 1 %.

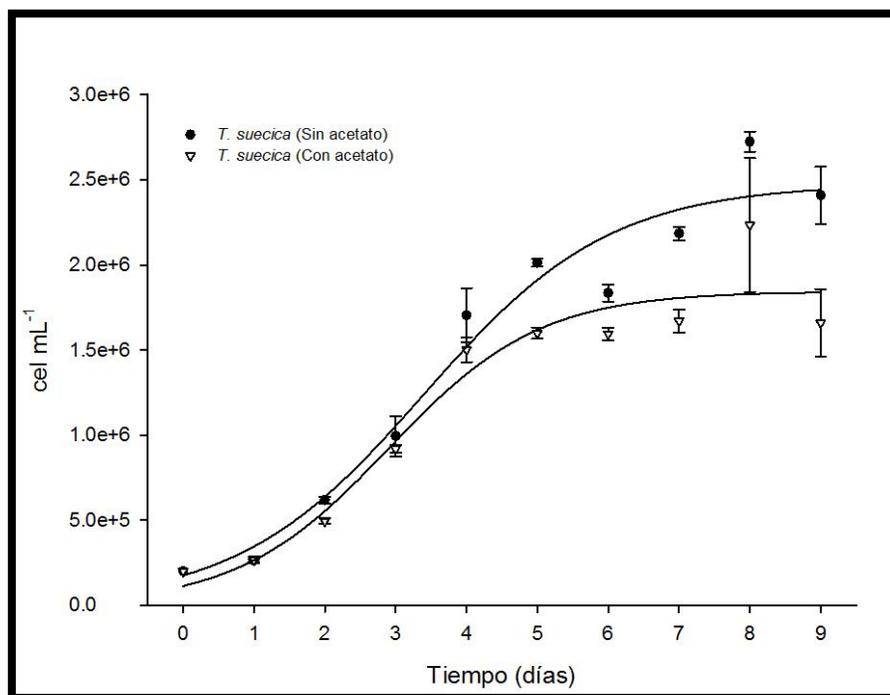


Figura 11.- Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO_2^- con y sin acetato 1 %.

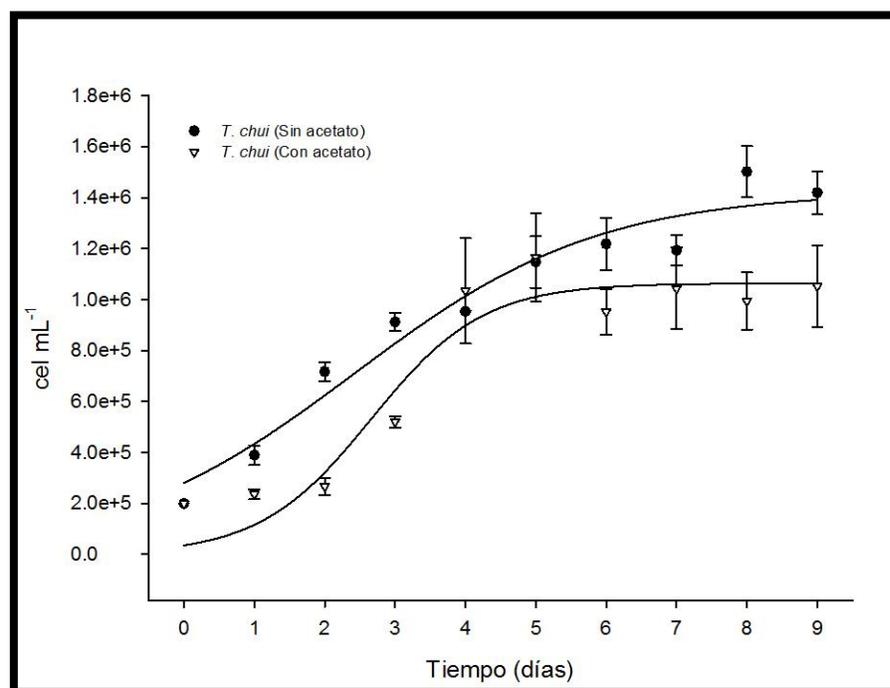


Figura 12.- Curvas de crecimiento de *Tetraselmis chui* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO_2^- con y sin acetato 1 %.

7.6.2.2 Crecimiento de *C. capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) enriquecido con diferentes concentraciones de acetato de sodio

Se probaron 7 concentraciones diferentes de acetato de sodio y se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las tasas de crecimiento de *C. capsulata* a lo largo de los tratamientos evaluados, ya que la densidad celular de la microalga disminuyó conforme aumentó el porcentaje de acetato de sodio en el medio (Figura 13). Lo anterior fue evidente al enriquecer el medio con 0.4, 0.8 y 1.0 % de acetato de sodio pues fue en dichos tratamientos, donde se observaron los valores más bajos tanto en la densidad celular como en la tasa de crecimiento (Tabla XV).

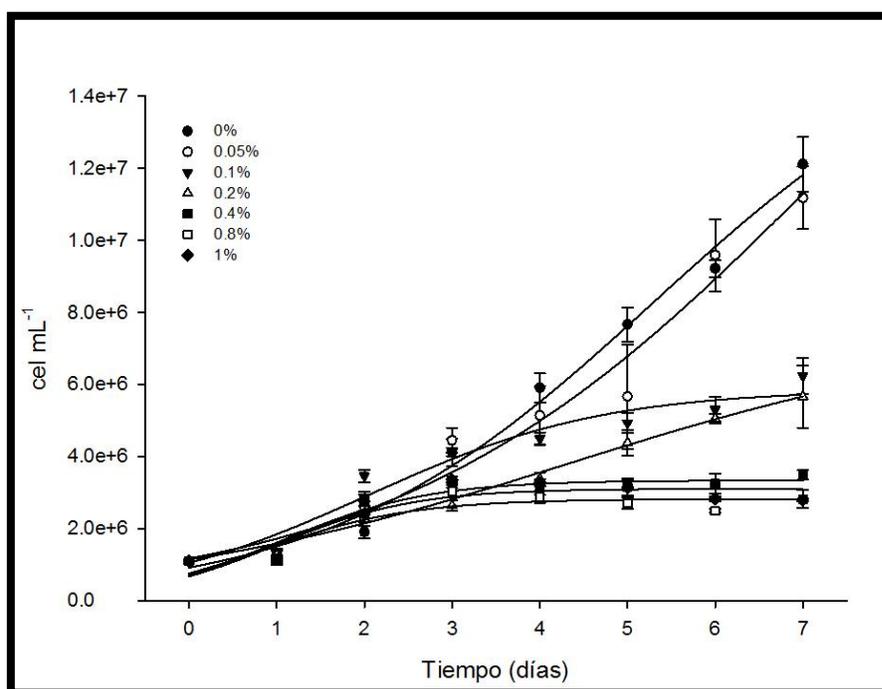


Figura 13.- Curvas de crecimiento de *Chlorella capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO_2^- enriquecido con diferentes porcentajes de acetato de sodio.

Tabla XV.- Tasa de crecimiento y concentración celular (media \pm DS) del cultivo de *Chlorella capsulata* en el medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻, enriquecido con acetato de sodio.

Porcentajes de acetato de sodio (%) (w/v)	K (d ⁻¹)	Densidad celular* (células mL ⁻¹)
0	0.54 \pm 0.08 ^c	12.1 \times 10 ^{6c}
0.05	0.42 \pm 0.01 ^c	11.1 \times 10 ^{6bc}
0.1	0.17 \pm 0.05 ^{ab}	6.2 \times 10 ^{6abc}
0.2	0.28 \pm 0.06 ^b	5.6 \times 10 ^{6ab}
0.4	0.07 \pm 0.04 ^a	3.4 \times 10 ^{6a}
0.8	0.06 \pm 0.03 ^a	2.8 \times 10 ^{6a}
1.0	0.05 \pm 0.05 ^a	2.7 \times 10 ^{6a}

*Concentración celular máxima alcanzada después de 7 d de tratamiento. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (P < 0.05).

7.6.2.3 Evaluación del crecimiento y asimilación de nutrientes de *C. capsulata* en presencia de su flora bacteriana

No se observaron diferencias significativas (P>0.05) en la densidad celular de *C. capsulata* en los tratamientos 0 al 5 durante los primeros 4 d de cultivo (Figura 14), lo anterior antes de inocular las diferentes combinaciones de bacterias (8.5 \times 10⁶, 7.5 \times 10⁶, 8.1 \times 10⁶, 7.0 \times 10⁶, 7.0 \times 10⁶, 7.0 \times 10⁶ cel mL⁻¹). Por el contrario, en el tratamiento 6 si se observó un efecto de la combinación de *B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris* y acetato de sodio sobre el crecimiento de *C. capsulata* (5.7 \times 10⁶ cel mL⁻¹). De igual forma, una vez inoculadas las bacterias en los cultivos de *C. capsulata*, no se observaron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos 0, 1, 2, y 3.

En el caso particular de los tratamientos 4 y 5, inocular la combinación de las 5 cepas de bacterias en los cultivos de *C. capsulata*, ya fuese después de 4 d de incubación (Tratamiento 4) o al comienzo del experimento (Tratamiento 5) no generó diferencias significativas ($P > 0.05$) en la tasa de crecimiento ni en la densidad celular final de *C. capsulata* (Tabla XVI). Se observó un efecto positivo sobre el crecimiento de *C. capsulata* al enriquecer los cultivos con la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* (24.9×10^6 cel mL⁻¹) y al adicionar al cultivo *B. megaterium* (22.3×10^6 cel mL⁻¹).

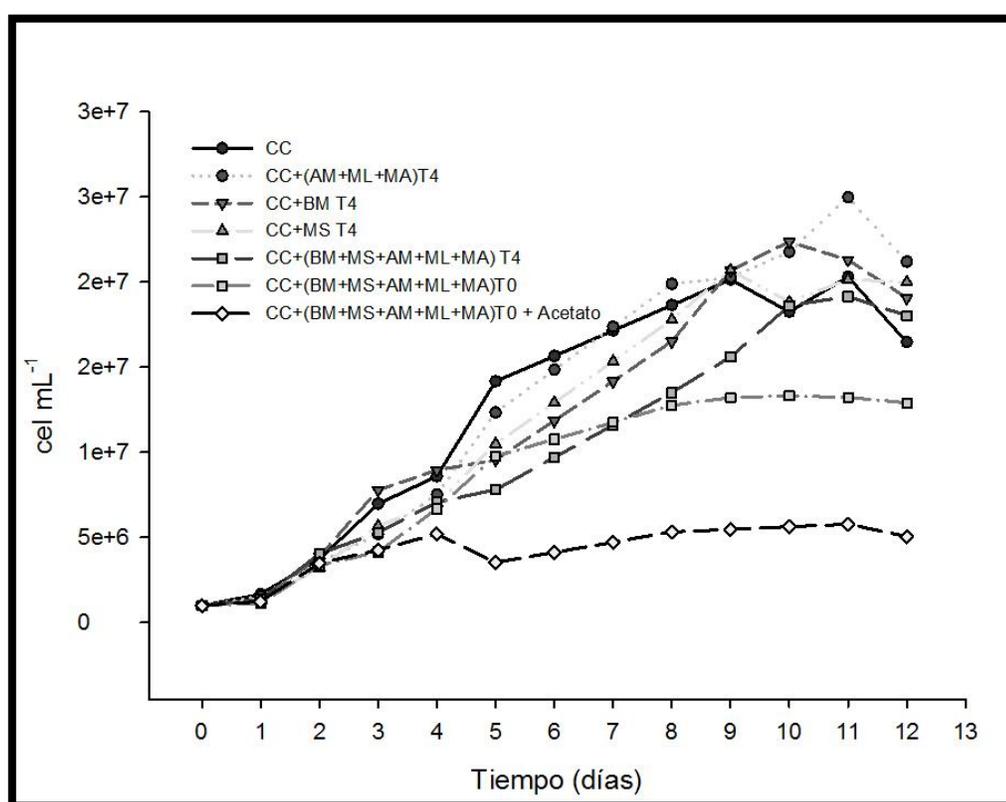


Figura 14.- Curvas de crecimiento de *Chlorella capsulata* en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻ en presencia de su flora bacteriana. CC: *Chlorella capsulata*; BM: *Bacillus megaterium*; MS: *Marinobacter salsuginis*; MA: *Marinobacter alkaliphilus*; AM: *Alteromonas macleodii*; ML: *Muricauda lutimaris*; T0 y T4: Tiempo de inoculación de las diferentes bacterias a los cultivos de *C. capsulata*.

Tabla XVI.- Tasa de crecimiento y concentración celular (media \pm DS) del cultivo de *Chlorella capsulata* en presencia de su flora bacteriana en medio F/2 (Guillard y Ryther 1962; Guillard 1975) + NO₂⁻.

Tratamiento	K (d ⁻¹)	*Densidad celular (células mL ⁻¹)	**UFC mL ⁻¹
0 CC	0.31 \pm 0.04 ^a	20.3 \times 10 ^{6a}	3.8 \times 10 ⁷
1 CC+[AM+ML+MA] _{T4}	0.34 \pm 0.02 ^a	24.9 \times 10 ^{6a}	3.4 \times 10 ⁷
2 CC+BM _{T4}	0.31 \pm 0.04 ^a	22.3 \times 10 ^{6a}	5.4 \times 10 ⁷
3 CC+MS _{T4}	0.35 \pm 0.07 ^a	20.7 \times 10 ^{6a}	7.1 \times 10 ⁷ .
4 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T4}	0.25 \pm 0.06 ^a	19.1 \times 10 ^{6a}	3.3 \times 10 ⁷
5 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T0}	0.26 \pm 0.01 ^a	13.3 \times 10 ^{6a}	2.5 \times 10 ⁷
6 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T0} + acetato de sodio 0.04 % (w/v)	0.09 \pm 0.01 ^b	5.7 \times 10 ^{6b}	4.5 \times 10 ⁷

CC: *Chlorella capsulata*; BM: *Bacillus megaterium*; MS: *Marinobacter salsuginis*; MA: *Marinobacter alkaliphilus*; AM: *Alteromonas macleodii*; ML: *Muricauda lutimaris*. *Concentración celular máxima alcanzada después de 12 d de tratamiento. ** Conteo bacteriano realizado después de 12 d de tratamiento. Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (P < 0.05).

Al realizar el análisis de la concentración de NO₂⁻ antes de poner las bacterias, no se observaron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos 0, 1, 2 y 3, ni entre el tratamiento 4 y 5, independientemente que éste último tuvo inoculadas las cinco bacterias desde el comienzo del experimento. Se observaron diferencias significativas en la asimilación de NO₂⁻ (P<0.05) al combinar las cinco cepas de bacterias y el acetato de sodio en los cultivos de *C. capsulata*. Después de 12 d de cultivo, los valores más altos en la concentración de NO₂⁻ se observaron en los tratamientos 5 y 6 (176.83 \pm 71.99; 282.67 \pm 19.14 μ M NO₂⁻). Se observó también cierta reducción en la concentración de dicho nutriente utilizando la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* (63.03 \pm 47.14 μ M NO₂⁻) y en el caso donde solo se inoculó *M. salsuginis* (81.5 \pm 8.79 μ M NO₂⁻).

La menor concentración de NO_2^- se obtuvo con el uso de *B. megaterium* ($15.04 \pm 14.32 \mu\text{M NO}_2$). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos evaluados en la concentración del NH_4^+ en el medio.

En cuanto a la asimilación de NO_3^- se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos antes y después de inocular las bacterias (Tabla XVII). La mayor asimilación de NO_3^- se obtuvo utilizando *B. megaterium* ($1.21 \pm 0.78 \mu\text{M NO}_3^-$), seguida de la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* ($1.78 \pm 2.03 \mu\text{M NO}_3^-$).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la concentración de fósforo ya que la cantidad de dicho nutriente suministrada al medio, fue rápidamente consumida por *C. capsulata*.

Tabla XVII.- Concentración (μ ; media \pm DS) de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} en los cultivos de *Chlorella capsulata* adicionados con las cepas de bacterias aisladas.

Tratamiento	NH_4^+		NO_2^-		NO_3^-		PO_4^{-3}	
	4 d	12 d	4 d	12 d	4 d	12 d	4 d	12 d
0 CC	0.89 \pm 0.06 ^a	1.41 \pm 0.23 ^a	560.67 \pm 40.81 ^d	114.25 \pm 92.19 ^{ab}	68.00 \pm 69.3 ^a	5.80 \pm 1.31 ^b	0.42 \pm 0.35 ^{ab}	0.23 \pm 0.06 ^{ab}
1 CC+[AM+ML+MA] _{T4}	0.91 \pm 0.03 ^a	1.51 \pm 0.12 ^a	588.00 \pm 28.35 ^d	63.03 \pm 47.14 ^{ab}	24.00 \pm 5.29 ^a	1.78 \pm 2.03 ^b	0.13 \pm 0.07 ^a	0.42 \pm 0.08 ^{ab}
2 CC+BM _{T4}	1.00 \pm 0.11 ^a	1.41 \pm 0.05 ^a	577.33 \pm 15.01 ^d	15.04 \pm 14.32 ^a	44.00 \pm 2.00 ^a	1.21 \pm 0.78 ^b	0.13 \pm 0.08 ^a	0.28 \pm 0.05 ^{ab}
3 CC+MS _{T4}	1.17 \pm 0.40 ^a	1.58 \pm 0.27 ^a	564.00 \pm 53.74 ^d	81.50 \pm 8.79 ^{ab}	37.00 \pm 4.24 ^a	1.87 \pm 1.55 ^b	0.24 \pm 0.06 ^{ab}	0.41 \pm 0.22 ^{ab}
4 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T4}	1.04 \pm 0.09 ^a	1.58 \pm 0.13 ^a	602.00 \pm 20.00 ^d	127.5 \pm 82.31 ^{ab}	48.67 \pm 4.62 ^a	6.00 \pm 3.50 ^b	0.15 \pm 0.05 ^{ab}	0.40 \pm 0.18 ^{ab}
5 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T0}	1.37 \pm 0.20 ^a	1.45 \pm 0.19 ^a	622.00 \pm 17.09 ^d	176.83 \pm 71.99 ^{bc}	50.00 \pm 6.93 ^a	4.20 \pm 4.20 ^b	0.18 \pm 0.07 ^{ab}	0.46 \pm 0.16 ^{ab}
6 CC+[BM+MS+AM+ML+MA] _{T0} + acetato de sodio 0.04 % (w/v)	1.90 \pm 0.36 ^a	1.87 \pm 0.32 ^a	490.67 \pm 30.29 ^d	282.67 \pm 19.14 ^c	22.67 \pm 2.31 ^a	4.00 \pm 3.00 ^b	0.09 \pm 0.02 ^a	0.56 \pm 0.06 ^a

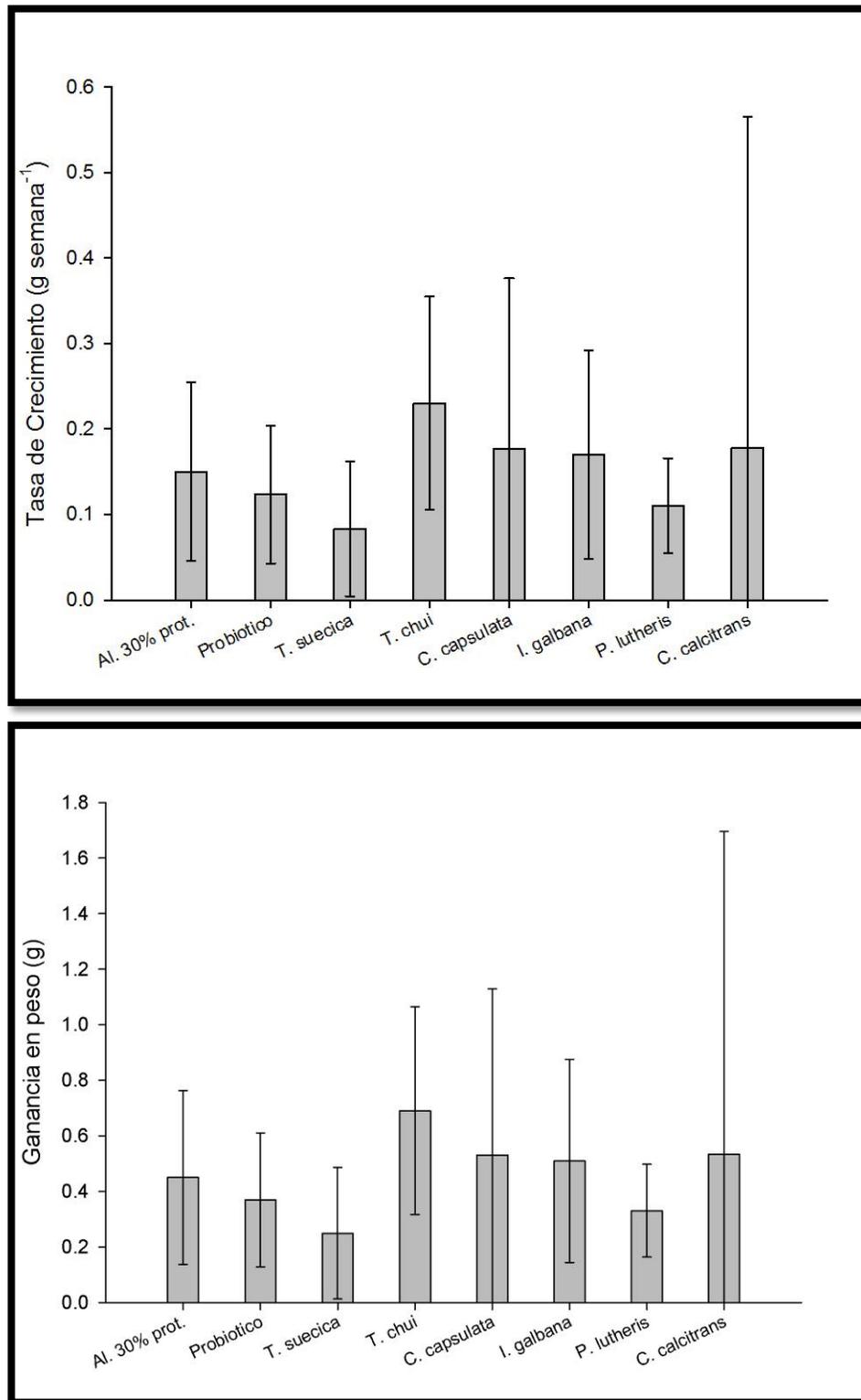
CC: *Chlorella capsulata*; BM: *Bacillus megaterium*; MS: *Marinobacter salsuginis*; MA: *Marinobacter alkaliphilus*; AM: *Alteromonas macleodii*; ML: *Muricauda lutimaris*. Para los tratamientos 1 al 5 las concentraciones iniciales de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} en el medio fueron de: 4.61, 770, 188 y 32.3 μM ; en el caso del tratamiento 6 las concentraciones iniciales de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} en el medio fueron de: 5.95, 900, 112 y 4.83 μM . Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por último, se muestran los resultados de las actividades derivadas de la evaluación de la asimilación de residuales de N y P en sistemas de cultivo experimental de *L. vannamei* con el uso de la asociación microalga-bacteria heterotrófica en sistemas de ficorremediación:

7.7 Cultivo experimental de *L. vannamei* utilizando asociaciones microalga-consorcio bacteriano para procesos de ficorremediación

7.7.1 Efecto de las diferentes combinaciones microalga-consorcio microbiológico sobre los parámetros de producción de *L.vannamei*

No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos sobre la tasa de crecimiento y el peso final de *L.vannamei*. Los tratamientos con mejores tasas de crecimiento y peso final fueron: *T. chui* + consorcio microbiano (CM) (0.230 ± 0.05 g semana⁻¹; 0.722 ± 0.15 g), *C. calcitrans* + CM (0.178 ± 0.16 g semana⁻¹; 0.568 ± 0.47 g) y *C. capsulata* + CM (0.177 ± 0.08 g semana⁻¹; 0.566 ± 0.24 g) (Figuras 15 y 16). Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de *L.vannamei*, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos, *C. capsulata* + CM fue el tratamiento donde se obtuvo el valor más alto de supervivencia (95.56 ± 7.70 %) (Figura 17).



Figuras 15 y 16.- Tasa de crecimiento (g semana⁻¹) y ganancia en peso (g) de *L. vannamei* durante 32 d en cultivos experimentales enriquecidos con la combinación de diferentes microalgas y un consorcio microbiano.

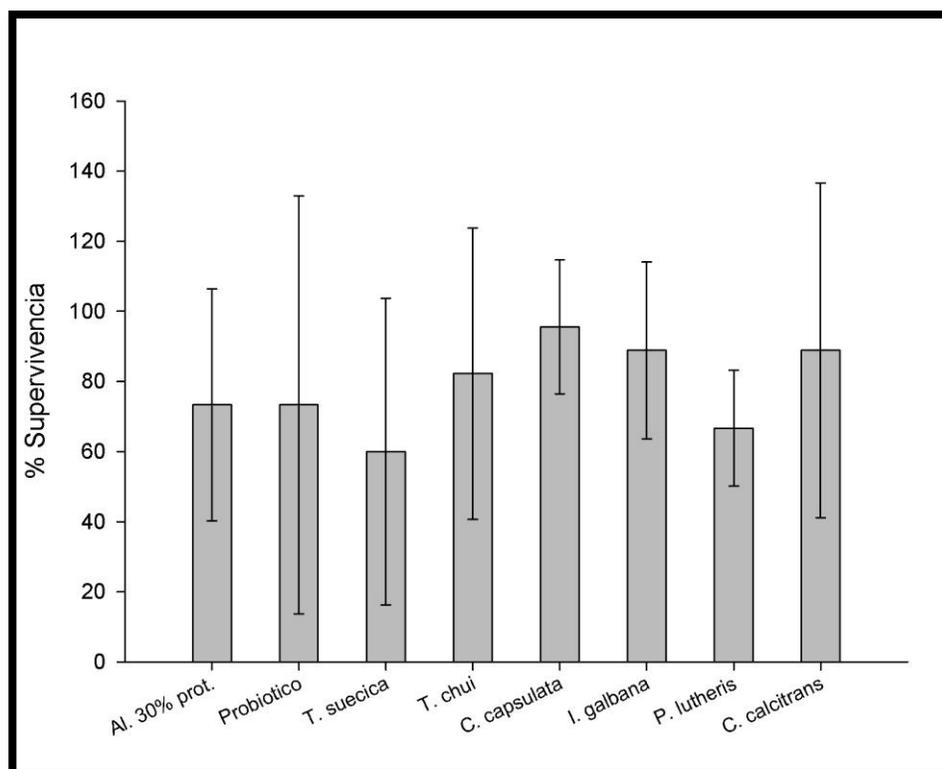


Figura 17.- Supervivencia de *L. vannamei* después de 32 d en cultivos experimentales enriquecidos con la combinación de diferentes microalgas y un consorcio microbiano.

7.7.2 Evaluación de la concentración de N y P residuales

Al realizar el análisis de la concentración de NO_2^- , no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. La concentración de dicho residual se incrementó en forma considerable a lo largo de los 32 d experimentales; la concentración más alta de NO_2^- se obtuvo en las muestras de agua donde se aplicó la combinación *C. capsulata* + CM ($440.00 \pm 154.16 \mu\text{M NO}_2^-$) y la más baja donde solo se aplicó CM ($215.00 \pm 50.48 \mu\text{M NO}_2^-$). De igual forma, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos al evaluar la concentración de NH_4^+ , teniendo como valor más bajo después de 32 d, $1.40 \pm 0.98 \mu\text{M NH}_4^+$ al utilizar la combinación *T. chui* + CM.

No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración de NO_3^- . Al analizar la concentración de PO_4^{-3} , se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos y utilizando solamente el consorcio microbiano se obtuvo el valor más bajo: $20.20 \pm 17.96 \mu\text{M PO}_4^{-3}$. En los acuarios donde se utilizaron las microalgas *C. capsulata*, *T. chui*, *I. galbana* y *C. calcitrans* en conjunto con el consorcio microbiano se observó un incremento en la concentración de PO_4^{-3} al término del bioensayo (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Concentración (μ ; media \pm DS) de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} en los cultivos experimentales de *L. vannamei* adicionados con diferentes combinaciones de microalga más consorcio microbiano.

Tratamiento	NH_4^+		NO_2^-		NO_3^-		PO_4^{-3}	
	T_0	T_{30}	T_0	T_{30}	T_0	T_{30}	T_0	T_{30}
Control (solo alimento)	3.03 \pm 0.99	1.76 \pm 0.34 ^a	18.67 \pm 14.99	2.29 \pm 1.50 ^a	670.92 \pm 72.44	4.43 \pm 5.33 ^a	36.65 \pm 4.79	11.52 \pm 8.46 ^a
Consortio microbiano	8.08 \pm 8.98	1.78 \pm 1.49 ^a	0.52 \pm 0.07	215.00 \pm 50.48 ^a	726.01 \pm 176.44	153.67 \pm 119.98 ^a	40.84 \pm 6.14	20.20 \pm 17.96 ^{ab}
CC + CM	4.07 \pm 1.60	1.81 \pm 0.61 ^a	2.02 \pm 1.60	440.00 \pm 154.16 ^a	564.21 \pm 486.63	85.00 \pm 50.03 ^a	30.73 \pm 24.74	36.92 \pm 7.07 ^{ab}
TS + CM	5.22 \pm 2.58	2.15 \pm 0.72 ^a	31.78 \pm 50.43	249.00 \pm 111.26 ^a	770.61 \pm 188.73	123.67 \pm 59.65 ^a	46.45 \pm 4.14	29.08 \pm 6.75 ^b
TC + CM	4.68 \pm 0.41	1.40 \pm 0.98 ^a	11.60 \pm 18.80	325.33 \pm 84.03 ^a	227.73 \pm 357.44	60.67 \pm 60.08 ^a	14.79 \pm 18.25	31.25 \pm 4.07 ^{ab}
IG + CM	5.64 \pm 3.44	1.90 \pm 1.62 ^a	1.37 \pm 1.20	281.67 \pm 14.77 ^a	443.96 \pm 432.68	73.67 \pm 81.59 ^a	21.86 \pm 15.84	36.08 \pm 3.04 ^{ab}
PL + CM	4.75 \pm 2.02	11.12 \pm 15.22 ^a	3.65 \pm 4.81	293.67 \pm 76.51 ^a	766.33 \pm 108.68	138.00 \pm 85.44 ^a	41.65 \pm 4.55	25.59 \pm 1.94 ^{ab}
CHC + CM	4.95 \pm 3.37	1.96 \pm 0.03 ^a	2.30 \pm 1.45	322.33 \pm 114.84 ^a	513.47 \pm 442.03	82.33 \pm 35.50 ^a	32.27 \pm 23.81	39.24 \pm 7.35 ^{ab}

CC: *Chlorella capsulata*; TS: *Tetraselmis suecica*; TC: *Tetraselmis chui*; IG: *Isochrysis galbana*; PL: *Pavlova lutheri*; CHC: *Chaetoceros calcitrans*; CM: Consortio microbiano (Acuacultura Mahr S.A. de C.V., B.C.S., México). T_0 , T_{30} : Concentración correspondiente al inicio y final del bioensayo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Diferentes formas residuales de P y retención de P en la biomasa de *L.vannamei*

Actualmente el P que proviene del agua residual del cultivo de *L. vannamei*, es considerado como una de las fuentes de contaminación más importante para los cuerpos de agua adyacentes a las granjas productoras de camarón (Xiao-Yi y Yu-Feng 2010). Sugiura *et al.* (2006) reportaron que el exceso de P en las dietas comerciales así como su bajo nivel de asimilación por parte de los organismos, pueden ser algunas de las principales razones de dicha contaminación debido a que, aproximadamente el 84 % del P que entra al sistema, queda atrapado en sedimentos de los estanques, en compuestos orgánicos y en productos de degradación asociados con la biomasa de organismos marinos (Ruíz-Fernández 2005).

La inclusión de harina de pescado en alimentos balanceados para camarón es uno de los factores que afecta en forma considerable el contenido del PP en el agua residual puesto que contiene niveles relativamente altos de P ($16.7 - 42.1 \text{ mg g}^{-1}$) debido a la cantidad contenida en los huesos. En contraste, el contenido de P en la pasta de soya es relativamente bajo y aproximadamente dos terceras partes del mismo está presente como fitatos (Yoo *et al.* 2005). En ambos bioensayos de liberación de nutrientes (BLN₁ y BLN₂) la concentración del PP aumentó con el nivel de proteína y fue mayor que el POD en el caso de las dietas que contenían harina de pescado (DAV) en los tres niveles proteicos evaluados (Tabla VI). Lo anterior, pudo ser causado por el hecho que la mayor parte del P en las dietas DAV se encontrara como hidroxapatita y fosfato tricálcico o como fitatos en el caso de las dietas DV y dichos compuestos no son fácilmente asimilados por organismos acuáticos (Yoo *et al.* 2005).

Cuando la harina de pescado fue sustituida por la pasta de soya, la concentración de PP y POD fue muy similar en ambos bioensayos de liberación de nutrientes; mientras que al alimentar a los organismos con las dietas DAV se observaron concentraciones de POD más elevadas que con el uso de las dietas DV. El fósforo inorgánico en el agua puede estar contenido en las partículas de sedimento suspendidas o como fosfato soluble (Boyd 1995), en este trabajo de investigación los valores del PID aumentaron con respecto al nivel de

proteína sin importar la fuente proteica utilizada en las dietas. Aunado a lo anterior, se observó que dicha forma residual conforma una pequeña fracción del PT, en comparación con el PP y el POD. Los valores más altos de POD se encontraron con el uso de la dieta DV_(A) (BLN₁= 0.23 ± 0.27 mg L⁻¹, BLN₂= 0.27 ± 0.03 mg L⁻¹ POD).

En ambos bioensayos de liberación, la concentración de PT aumentó con respecto al nivel de proteína sin importar la fuente proteica utilizada y se observaron diferencias significativas (P<0.05) entre los tres niveles de proteína evaluados. Dicho incremento se debió al incremento del fósforo orgánico ya fuese en su forma disuelta o particulada, siendo esta última, la forma mayoritaria encontrada en el agua residual. Yu-Hong *et al.* (2011) concluyeron que la sustitución de harina de pescado por pasta de soya impacta en forma positiva la calidad del agua ya que disminuye la cantidad de residuales de fósforo. El PT fue significativamente mayor (P<0.05) en todos los niveles de proteína al utilizar harina de pescado en comparación con las dietas donde dicho insumo fue sustituido por la pasta de soya (de 2 a 3 veces aproximadamente).

El fósforo además de ser un nutriente esencial para el crecimiento de los animales acuáticos (Hua y Bureau 2006) es también una fuente importante de contaminación. Por esta razón, es necesario el desarrollo de alimentos balanceados que sean amigables con el ambiente y que no repercutan en forma negativa sobre el crecimiento y supervivencia de los organismos acuáticos. En cultivos intensivos de camarón solo el 13 % del P contenido en el alimento es incorporado al organismo (Xia *et al.* 2004). Shimoda *et al.* (2005) reportaron que entre el 11 y 15 % de P fue recuperado en la biomasa de *L. vannamei*; de igual forma Thakur y Lin (2003) reportaron un rango similar (10.5 - 12.8 %) para *Penaeus monodon*. Lo anterior concuerda con lo reportado en este trabajo solo para el caso de los organismos alimentados con la dieta comercial (DC), ya que se obtuvo un porcentaje de retención de P del 10.39 %. Sin embargo para el resto de los tratamientos la retención de P evaluada en la biomasa de *L. vannamei* se encuentra fuera de dichos rangos (5.31 - 18.59 %). La retención de P en los organismos disminuyó conforme aumentó el nivel de proteína sin importar la fuente de proteína utilizada y fue significativamente mayor (P<0.05) en los tres niveles al

utilizar proteína de origen vegetal que en las dietas que incluían harina de pescado (2 a 3 veces aproximadamente).

8.2 Diferentes formas residuales de N y retención de N en la biomasa de *L.vannamei*

La generación de residuales de N y P en condiciones post-alimenticias controladas, comprende al menos seis complejos de residuales integrados por formas de N y P orgánicas e inorgánicas, particuladas y solubles. Dichas formas pueden variar en forma significativa con los niveles de proteína en las dietas y con el tamaño de los organismos (Calderón-Flores 2007). Montoya *et al.* 2002 evaluaron la producción de las diferentes formas de N empleando dietas con tres niveles de proteína (15, 25 y 35 %) y concluyeron que la concentración del NID aumenta con el nivel de proteína contenido en las dietas. Lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo, ya que los valores más altos de la concentración del NID se observaron con el uso de las dietas DAV_(A) y DV_(A). El nitrógeno inorgánico es una fracción importante del nitrógeno presente en los estanques de producción de las granjas camaroneras y está conformado en su mayoría, por NH₄⁺ seguido por NO₃⁻ y NO₂⁻ (Montoya *et al.* 2002), lo cual coincide con los resultados aquí obtenidos ya que la mayoría del NID se encontró en forma de NH₄⁺ (N catabólico).

Gran parte del NH₄⁺ excretado se origina del catabolismo de aminoácidos y existe una cantidad adicional producida por reacciones que involucran a las bases púricas y pirimídicas (Claybrook 1983). Sin embargo el NH₄⁺ derivado de la vía uricolítica se considera como una pequeña contribución del total excretado en comparación con la producción predominante originada por la degradación de los aminoácidos (Weihrauch *et al.* 2004). En sistemas de acuicultura intensiva existen tres vías para la conversión del NH₄⁺: (a) asimilación y remoción fotoautotrófica por medio de algas y/o microalgas, (b) conversión de NH₄⁺ en NO₂⁻ y NO₃⁻ por medio de bacterias que oxidan al NH₄⁺ y bacterias nitrificantes, y, (c) conversión del NH₄⁺ en biomasa bacteriana por medio de bacterias heterotróficas (James *et al.* 2006). Una asimilación eficiente de NH₄⁺ requiere una relación N:P por debajo de 16 (Redfield 1934); el valor de la relación NT:PT obtenido en este

estudio fue cercano a 16, sin embargo, el valor de la relación $\text{NH}_4^+:\text{PID}$ fue mucho mayor que 16 lo que implica un reto en el desarrollo de alimentos balanceados orientados hacia el reciclamiento de NH_4^+ residual. Para un reciclaje eficiente del NH_4^+ residual es necesaria la conversión del PP (que es la forma mayoritaria) en PID, ya que ésta es la forma requerida para la asimilación de dicha fuente nitrogenada.

Pérez-Velázquez *et al.* (2008) evaluaron la variación en la concentración del NOD utilizando dietas experimentales con 25, 30, 35 y 40 % de proteína y concluyeron que con el uso de alimentos con altos niveles de proteína la concentración del NOD fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los tratamientos. En el presente estudio, se observó una tendencia al aumento en la concentración del NOD en muestras de agua donde *L. vannamei* fue alimentado con las dietas DAV. El nitrógeno orgánico disuelto, constituye al grupo mayoritario de compuestos nitrogenados en aguas residuales del cultivo de *L. vannamei* (Jackson *et al.* 2003); además, representa una fracción del alimento parcialmente digerido que permanece en el agua en forma de aminas, amidas, aminoácidos libres y péptidos de menos de 50 aminoácidos (Burford y Williams 2001). El conocimiento acerca de esta fracción nitrogenada es limitado debido a las considerables dificultades metodológicas asociadas a su análisis (Bronk *et al.* 2000). Aunque la concentración de urea aumentó con el nivel de proteína tanto en las dietas DAV como en las dietas DV, estos cambios no fueron significativos ($P > 0.05$) como para concluir que las altas concentraciones del NOD se deben a la presencia de la urea en el agua residual generada de la alimentación de *L. vannamei* con las diferentes dietas experimentales.

Al analizar la fracción particulada de nitrógeno (NP), se observó que dicho residual fue significativamente ($P < 0.05$) menor con el uso de las dietas DV que al utilizar las dietas con harina de pescado. El nitrógeno orgánico disuelto es el producto principal de la descomposición del NP por parte de los microorganismos (Dirk *et al.* 2007); por lo tanto, utilizar dietas que generen bajas concentraciones de residuales particulados, así como una buena cantidad de nutrientes residuales disueltos resulta en efluentes apropiados para procesos de ficorremediación y con esto elevar tanto la calidad del agua de cultivo como la recuperación de nutrientes residuales. Yu-Hong *et al.* (2011) concluyeron que reemplazar la

harina de pescado por pasta de soya incrementa la excreción de N. De igual forma, en los bioensayos de liberación de nutrientes, la concentración del NT incrementó con respecto al nivel de proteína sin importar la fuente proteica utilizada en las dietas experimentales, así como también, se observó un aumento en el valor de las relaciones $\text{NH}_4^+:\text{PID}$ y $\text{NT}:\text{PT}$ cuando la harina de pescado fue sustituida por la pasta de soya.

Al analizar el porcentaje de retención de N en la biomasa de *L. vannamei*, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre DC y los tres niveles de proteína evaluados en las dietas DAV. La mejor retención de N (32.66 %) se obtuvo con el uso de la dieta $\text{DAV}_{(B)}$ lo cual, concuerda con lo reportado en la literatura (Magallón-Barajas 2006). Los camarones son considerados organismos con baja capacidad de conversión de alimento y se ha reportado que del total del alimento suministrado al sistema de cultivo, el 15 % no es consumido, el 20 % se pierde en las heces fecales, el 48 % se pierde como metabolitos y solo el 17 % se incorpora al músculo del camarón (Srnivasa-Rao *et al.* 2000). En este trabajo de investigación, el contenido de N en la biomasa de *L. vannamei* varió en forma significativa de acuerdo con el nivel de proteína y con la fuente proteica utilizada en las dietas evaluadas.

8.3 Efecto de la sustitución de la harina de pescado por pasta de soya sobre los parámetros de producción

La sustitución de harina de pescado por pasta de soya contribuyó en forma significativa ($P < 0.05$) a la retención de P sin afectar ni a la retención de N ni a ninguno de los parámetros de producción, lo anterior, como resultado del experimento de retención proteica. Mucha de la investigación sobre nutrición de camarón se ha enfocado en el mejoramiento de las formulaciones para minimizar la lixiviación de nutrientes de los alimentos y así, mejorar los porcentajes de retención de P y N (Burford y Williams 2001). Por lo tanto, el estudio sobre el reciclamiento de nutrientes residuales del cultivo de *L. vannamei* y la optimización en la formulación de alimentos balanceados permitirán mejorar en forma significativa la retención de nutrientes, así como la disminución de la

concentración de P y N residuales en los cuerpos de agua adyacentes a los sistemas de cultivo.

Debido a los altos costos y a la demanda que la harina de pescado tiene para consumo de organismos terrestres y/o acuáticos, se han evaluado diferentes alternativas proteicas como sustituto de dicho insumo en la elaboración de alimentos balanceados (Ye *et al.* 2010). Galicia-González (2009) y Roy *et al.* (2009), concluyeron que el uso de proteína de origen vegetal representa a menudo una fuente de proteína económica y nutricional debido a su bajo precio y calidad consistente. Browdy *et al.* (2006) sustituyeron la harina de pescado por una mezcla de proteínas vegetales orgánicas certificadas y obtuvieron 91 % de supervivencia además de no observar diferencias significativas ($P > 0.05$) en el peso final entre los organismos alimentados con dietas basadas en proteína vegetal y aquellos alimentados con dietas que contenían harina de pescado. Por otra parte, Roy *et al.* (2009) sustituyeron la harina de pescado por harina de chícharo en dietas para *L. vannamei* y obtuvieron 96.7 % de supervivencia y diferencias significativas ($P < 0.05$) en el peso final puesto que, los organismos alimentados con las dietas basadas en harina de chícharo crecieron 0.28 g más que aquellos alimentados con dietas que contenían harina de pescado. En este trabajo, los organismos alimentados con la dieta DV_(A) aumentaron su biomasa 0.23 g más que los alimentados con la dieta DC y 3.1 g más que aquellos alimentados con la dieta DAV_(A).

Estudios realizados por Biswas *et al.* (2007) y Yu-Hong *et al.* (2011) sostienen que es posible sustituir hasta un 60 % la harina de pescado con mezclas de fuentes proteicas vegetales en dietas para *Penaeus monodon* y *Oncorhynchus mykiss*, sin afectar en forma significativa ni el crecimiento ni el factor de conversión alimenticia (FCA). Álvarez *et al.* (2007) evaluaron cinco niveles de sustitución de la harina de pescado (46, 59, 75, 88 y 100 %) por pasta de soya y obtuvieron porcentajes de supervivencia del 90 %; aunado a lo anterior, concluyeron que la pasta de soya puede sustituir a la harina de pescado hasta en un 75 % puesto que, el crecimiento de *Litopenaeus schmitti* fue pobre al ser alimentado con dietas donde la harina de pescado fue sustituida al 100 %. En este trabajo, la sustitución de la harina de pescado por la mezcla de pasta de soya, harina de trigo y un pequeño

porcentaje de harina de calamar afectó en forma significativa ($P < 0.05$) el peso final de *L. vannamei* puesto que los organismos alimentados con las dietas DV alcanzaron tallas más grandes que aquellos alimentados con las dietas DAV; el peso final más alto (9.62 ± 0.9 g) se obtuvo con el uso de la dieta DV_(H).

Durante las 11 semanas correspondientes al bioensayo de retención proteica, se observó que en los acuarios donde se probaron las DAV, en especial el caso de DAV_(B), había en forma constante residuos de alimento; comportamiento que fue opuesto en los acuarios donde se probaron las DV. Siendo los camarones organismos quimiosensoriales, la inclusión de atractantes y/o estimulantes en la dieta es importante para asegurar la ingesta del alimento. Ciertos aminoácidos (Gly, Arg, Glu, Ala), la betaina, los nucleótidos, los ácidos orgánicos y la taurina son reconocidos como los principales estimulantes alimenticios (Shi-Yen y Ben-Shuan 2003). Las fuentes de proteína de origen animal contienen en mayor cantidad compuestos que estimulan la ingesta de alimentos en el camarón en comparación con las fuentes de proteína vegetal. Por esta razón las DV se complementaron con un pequeño porcentaje de harina de calamar, que además de ser considerada buena fuente de proteína, también es buen attractante para el camarón (D'Abramo *et al.* 1997).

8.4 Bacterias heterotróficas aisladas con propósitos de ficorremediación

Al realizar la identificación molecular a las 11 cepas de bacterias que no fueron inhibidas por los extractos de las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* y que además presentaron capacidad para solubilizar fosfatos y actividad amilolítica, así como, las comparaciones de las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, los aislamientos mostraron fuerte similitud con 5 especies de bacterias diferentes: *Rheinheimera aquimaris*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas mendocina*, *Enterococcus faecium* (Tabla XIII).

El género *Rheinheimera* fue propuesto por Brettar *et al.* 2002; además, reportaron que dicho género comprende reconocidas especies como: *Rheinheimera baltica* (Brettar *et al.* 2002), *Rheinheimera pacifica* (Romanenko *et al.* 2003) y *Rheinheimera perlucida* (Brettar *et al.* 2006). Análisis filogenéticos basados en la secuencias de nucleótidos del 16S rDNA muestran que dicho género pertenece a la clase Gammaproteobacteria (Brettar *et al.* 2002, 2006; Romanenko *et al.* 2003).

Recientemente, Yoon *et al.* (2007) aislaron e identificaron cepas aisladas de agua marina del Mar Este en Corea, las cuales resultaron ser *Rheinheimera aquimaris*. De igual forma, en este estudio una de las cepas aisladas del agua marina proveniente de los estanque de cultivo de *L. vannamei* mostró fuerte similitud con la cepa *Rheinheimera aquimaris*. *Rheinheimera aquimaris* puede aparecer en forma de bacilos o cocos gram negativos, no produce esporas y presenta motilidad debido a un solo flagelo polar, su crecimiento óptimo se da a una temperatura de 30 a 37 °C y pH 7.0 a 8.0 con presencia o ausencia de NaCl en el medio de cultivo (aproximadamente hasta 8 % w/v) y utiliza D-Xilosa, metil a-Dmanosida, D-trehalosa, almidón, glucógeno, acetato, succinato y piruvato como fuente de carbono Yoon *et al.* (2007).

En este estudio, *Rheinheimera aquimaris* creció con presencia de NaCl (2 % w/v) en el medio de cultivo y al realizar las pruebas para evaluar la capacidad amilolítica fue una de las 18 cepas de bacterias que resultaron positivas a dicha evaluación. Lo anterior concuerda con lo reportado con Ghasemi *et al.* (2010) donde aislaron e identificaron a *Rheinheimera aquimaris* de un lago hipersalino además de probar que dicha cepa bacteriana posee la capacidad para producir amilasas.

Por su parte *Kocuria rosea* es una bacteria aeróbica, perteneciente al género *Micrococcus* que fue reclasificada en 1995 dentro del género *Kocuria* (Stackebrandt *et al.* 1995). Son cocos gram positivos, halotolerantes que no presentan movimiento, su crecimiento se da en un amplio rango de temperatura (4 a 43 °C) con presencia o ausencia de NaCl en el medio de cultivo (aproximadamente hasta 15 % w/v), reduce nitratos y utiliza glucosa, lactosa, manosa y sucrosa como fuente de carbono (Seung-Bum *et al.* 2004). Ha sido objeto de

estudios en relación a la estructura y propiedades del pigmento carotenoide que esta produce (Chattopadhyay *et al.* 1997; Ugers y Cooney 1968) y como método biológico para la degradación de harina de plumas de aves de corral (Coello *et al.* 2000). Lo anterior concuerda con lo obtenido en esta investigación con relación a la evaluación de la actividad amilolítica puesto que *Kocuria rosea* resultó positiva a dicha prueba.

Micrococcus luteus posee habilidades inusuales para el tratamiento de desechos: degrada contaminantes orgánicos tóxicos y presenta tolerancia a los metales (Sandrin y Maier 2003). A menudo, se ha encontrado en suelos contaminados con derrames de petróleo y lodos; *M. luteus* degrada hidrocarburos y compuestos olefínicos (Zhuang *et al.* 2003), utiliza bifenilo como fuente de carbono y degrada ftalatos (Eaton 1982). Alberga un plásmido capaz de degradar malationa y clorpirifos (Guha *et al.* 1997), posee la capacidad para biabsorber estroncio (Faison *et al.* 1990) y en menor grado plomo, níquel y zinc (Lo *et al.* 2001). *M. luteus* es capaz de sobrevivir durante largos periodos en ambientes con condiciones extremas de temperatura y limitaciones de nutrientes sin formar esporas como estructuras de supervivencia (Greenblatt *et al.* 2004).

Por su parte, *Pseudomonas mendocina* ha sido utilizada en procesos de biorremediación y en la oxidación del benceno para la producción de compuestos intermediarios (fenol, catecol y 1, 2, 3-Trihidroxibenceno) de relevancia industrial (Tao *et al.* 2004). Está reportado que metaboliza tolueno como fuente de carbono (Yen *et al.* 1991) y alginato a partir de glucosa y fructuosa (Anderson *et al.* 1987; Sengha *et al.* 1989).

En este trabajo las cepas de bacterias identificadas como *M. luteus* y *P. mendocina* resultaron positivas a la prueba de producción de amilasas.

8.5 Microalgas candidatas para procesos de ficorremediación y su comportamiento en presencia de una fuente de carbono y su flora bacteriana de acompañamiento

Es bien sabido que las microalgas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* son de origen marino (Baldauf 2003), que han sido utilizadas como alimento en acuicultura

(Hemaiswarya *et al.* 2011; Sivakumar *et al.* 2011; Tulli *et al.* 2012), además que presentan factores de crecimiento para diferentes cepas bacterianas (Grossart 1999), crecen bajo condiciones de cultivo heterotrófico (Azma *et al.* 2010) y que junto con las bacterias, crean un sistema biológico eficiente en la utilización de nutrientes (Lopez-Thompson *et al.* 2002).

Sin embargo poco se sabe acerca de la flora bacteriana que acompaña a dichos cultivos y de las interacciones que entre ellas se producen. Durante este estudio, al tratar de obtener cultivos axénicos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* utilizando los antibióticos CLOR, GM, TE y su mezcla en diferentes concentraciones (200 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), solo se observó una disminución en la carga bacteriana conforme aumentó la concentración y la cantidad de antibióticos en el medio, lo cual no fue suficiente para eliminar por completo las cepas de bacterias presentes.

De dicha evaluación se obtuvieron 7 morfotipos coloniales diferentes, los cuales, al realizar la identificación molecular y comparar las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, se observó fuerte similitud con las especies de bacterias: *Bacillus megaterium*, *Marinobacter salsuginis* y *Marinobacter alkaliphilus* (Tabla XIV).

Al evaluar la combinación de procesos de centrifugación con una mayor diversidad de antibióticos (GM, CLOR, KM, NM, VM, TE, NM + VM) para la obtención de cultivos axénicos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, solo se obtuvo inhibición en el crecimiento de las cepas bacterianas después de 5 d de tratamiento. Lo anterior para *T. suecica* en los tratamientos con y sin luz directa donde se aplicaron CLOR, GM y KM y para *T. chui* en los tratamientos con y sin luz directa donde se aplicaron GM, KM y NM. La mezcla de NM + VM inhibió el crecimiento de cepas bacterianas en los cultivos de las tres microalgas evaluadas en los tratamientos con y sin luz directa.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Watanabe *et al.* (2005) ya que con el uso de inóculos de baja densidad y antibióticos como estreptomomicina, gentamicina, vancomicina, penicilina y pimamicina, lograron obtener cultivos axénicos de *Chlorella sorokiniana* los cuales permanecieron axénicos después de 30 días de cultivo.

En la presente investigación, al recuperar las células “axénicas” de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* tratadas con la mezcla de NM + VM e inocularlas en medio mineral estéril F/2 enriquecido con acetato de sodio, después de 4 días de incubación los cultivos se tornaron turbios lo que indicaba la presencia nuevamente de bacterias. Dicha situación también se observó en lo reportado por Grossart y Simon (2007), puesto que los cultivos axénicos que utilizaron también mostraron presencia de bacterias casi al término de su experimento.

Con lo anterior puede concluirse que para el caso particular de esta investigación, aún trabajando en ambientes y con materiales completamente estériles, el efecto de los antibióticos suministrados más la centrifugación sobre el crecimiento de las bacterias, mientras éstas se encontraban en contacto con las microalgas, fue bacteriostático en vez de inhibitorio. Lo cual, resultó de forma inversa al evaluar el efecto de los antibióticos en medio sólido al realizar los antibiogramas puesto que en ese caso, la inhibición en el crecimiento de las diferentes cepas de bacterias fue completa. Ha sido demostrado que la inhibición en condiciones *in vitro* de bacterias no necesariamente corresponde con algún efecto inhibitorio significativo bajo condiciones de cultivo (Gram *et al.* 2001).

La combinación de los diferentes antibióticos más la centrifugación, no afectó de forma significativa el crecimiento de las microalgas, pero si se observó pérdida de flagelos en el caso de *T. suecica* y *T. chui* y con ello, pérdida en la motilidad de las células.

Lo anterior, además de daños en la pared celular, se observó al tratar las células con tetraciclina puesto que el medio de los tubos donde se suplementó luz directa se tornó rojo, al igual que sucedió en la investigación realizada por Azma *et al.* (2010). En un principio se pensó que dicho cambio en la coloración, se debía a que bajo condiciones de estrés las microalgas pueden liberar pigmentos (Pan *et al.* 2001); lo anterior se descartó pues tal cambio en la coloración, se observó al exponer a la luz un tubo control sólo con el medio utilizado más tetraciclina y al hecho de que los carotenoides son insolubles en agua (Ong y Tee 1992).

La reaparición de bacterias en los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, pudo deberse al incremento en la biomasa de las microalgas y/o a la presencia de bacterias

endófitas. De los dos plaqueos realizados al final de esta prueba, se obtuvieron 42 aislados con morfología colonial diferente. Al realizar la tinción gram se observó que todos eran bacilos gram negativo, los cuales, al realizar la identificación molecular y comparar las secuencias de nucleótidos con las de la base de datos de la NCBI, se observó fuerte similitud con las cepas de bacterias: *Marinobacter alkaliphilus*, *Alteromonas macleodii* y *Muricauda lutimaris* (Tabla XIV). Es importante mencionar que dicho resultado se observó de forma persistente a lo largo de los diferentes aislados procedentes de los cultivos tanto de *C. capsulata*, como de *T. suecica* y *T. chui*.

B. megaterium es una bacteria gram positiva, no patógena principalmente aeróbica y formadora de esporas que ha sido encontrada en diversos hábitats como suelos, agua marina, sedimentos, miel, peces y alimentos secos entre otros. Crece fácilmente en más de 62 fuentes diferentes de carbono y ha sido utilizada en la industria por más de 50 años ya que posee gran variedad de enzimas (Kim 2003), no presenta proteasas alcalinas externas (Vary *et al.* 2007), solubiliza fosfatos (El-Komy 2005) y es promotora de crecimiento en plantas (López-Bucio *et al.* 2009).

Por su parte *M. salsuginis* es una bacteria gram negativa, halófila moderada que reduce nitratos a nitrógeno bajo condiciones anaeróbicas (Antunes *et al.* 2007), ha sido aislada y evaluada en cultivos de camarón donde se han presentado blooms de microalgas dañinos, en especial de dinoflagelados como *Noctiluca scintillans*, obteniendo como resultado la inhibición del crecimiento de la misma después de dos días de inoculación y un incremento del 23 al 87% en la supervivencia de *L. vannamei* sin presentar efectos dañinos sobre su crecimiento o condiciones fisiológicas (Keawtawee *et al.* 2011; 2012).

M. alkaliophilus es una bacteria gram negativa, alcalifílica, mesófila de origen marino (Takai *et al.* 2005) la cual, posee gran capacidad de desnitrificación y ha sido probada en aguas residuales marinas (Osaka *et al.* 2008; Yoshie *et al.* 2006). De igual forma, *M. lutimaris* es una bacteria gram negativa, sin movimiento de origen marino que es considerada como nueva especie del género *Muricauda* (Yoon *et al.* 2008); hasta la fecha no se tienen reportes sobre su uso.

Por su parte *A. macleodii* es una gamma proteobacteria de origen marino distribuida ampliamente en aguas templadas o tropicales (López-Pérez *et al.* 2012). Su efecto como probiótico ha sido probado en sistemas de cultivo de larvas de *Perna canaliculus* obteniendo mejoras en los porcentajes de supervivencia de las larvas cuando los cultivos fueron expuestos a contaminación por *Vibrio sp.* y *V. splendidus* (Kesarcodi-Watson *et al.* 2010; 2012).

Aunado a lo anterior al realizar la evaluación de la capacidad amilolítica de las cepas, solo *M. salsuginis* y *M. alkaliphilus* resultaron positivas a dicha prueba y en la prueba para solubilizar fosfatos, solo se observaron halos de solubilización en las placas inoculadas con *B. megaterium*, confirmando lo reportado por El-Komy (2005).

Al evaluar el crecimiento de las cinco cepas de bacterias (*B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *M. lutimaris* y *A. macleodii*) aisladas de los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* modificando la fuente de nitrógeno del medio mineral estéril F/2, se observó que lo anterior no tuvo impacto en el desarrollo de ninguna de las cepas puesto que, sin importar la fuente de nitrógeno evaluada, no se obtuvo crecimiento bacteriano.

En cambio al utilizar la combinación de glucosa como fuente carbono, ya fuese nitritos (NO_2^-), amonio (NH_4^+) o la mezcla $\text{NaNO}_3 + \text{NaNO}_2 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ como fuente de nitrógeno solo se observó crecimiento de *B. megaterium*. De forma contraria cuando el medio mineral estéril F/2 se enriqueció con acetato de sodio la fuente de nitrógeno si tuvo un impacto sobre el crecimiento de las cinco bacterias, puesto que al utilizar la combinación de F/2 + NO_2^- + acetato de sodio se observaron los valores más altos de absorbancia: *B. megaterium*: 0.92 ± 0.01 , *M. alkaliphilus*: 1.16 ± 0.05 , *M. salsuginis*: 1.12 ± 0.06 , *A. macleodii*: 0.82 ± 0.08 , *M. lutimaris*: 0.40 ± 0.01 .

En el caso de *M. salsuginis* y *M. alkaliphilus* la diferencia en el crecimiento utilizando nitratos (NO_3^-) como fuente de nitrógeno fue muy pequeña (0.90 ± 0.01 , 0.83 ± 0.03) al comparar dichos valores con aquellos obtenidos con el uso de NO_2^- , lo cual fue opuesto para *B. megaterium*, *A. macleodii* y *M. lutimaris* ya que los valores de absorbancia fueron

más bajos utilizando NO_3^- como fuente de nitrógeno en vez de NO_2^- (0.68 ± 0.05 , 0.29 ± 0.03 y 0.19 ± 0.02).

Es bien sabido que los iones amonio (NH_4^+) son la forma de nitrógeno mayormente asimilada por las microalgas seguida por los NO_3^- y la urea (Chen *et al.* 2012). Lo anterior se debe a que la microalga requiere menor cantidad de energía para tomar el NH_4^+ , a que su forma es más reducida que la de los NO_3^- y al hecho de que no es acumulado a nivel celular sino almacenado al sistema a través de una reacción de unión a la membrana celular (Klochenko *et al.* 2003). Aparentemente los NO_3^- son asimilados por la microalga mediante el uso de un sistema de transporte que se cree es dependiente de ATP más que de un gradiente electroquímico, por lo tanto, la asimilación de NH_4^+ depende en menor manera de la temperatura al contrario de la asimilación de NO_3^- (Stewart 1980).

En esta investigación se comprobó que formas nitrogenadas como los NO_2^- , a pesar de no ser la elección de nitrógeno más común de las microalgas, fue bien asimilada por *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui*, obteniendo densidades celulares de 16.9×10^6 , 2.4×10^6 y 1.4×10^6 cel mL^{-1} , respectivamente (Figuras 10, 11 y 12).

Enriquecer los cultivos de *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* con acetato de sodio como fuente carbono, afectó el desempeño de las microalgas puesto que, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), al comparar las tasas de crecimiento de las células de *C. capsulata* cultivadas en medio mineral estéril F/2 + NO_2^- con aquellas cultivadas en el medio mineral estéril F/2 + NO_2^- + acetato de sodio 0.04 % (0.41 ± 0.01 , 0.18 ± 0.03 d^{-1}). Lo anterior fue evidente puesto que el cultivo sin acetato alcanzó una concentración celular final de 16.9×10^6 cel mL^{-1} , mientras que el cultivo enriquecido solo alcanzó una concentración celular de 4.8×10^6 cel mL^{-1} (Figura 10). Al comparar las tasas de crecimiento de *T. suecica* (0.67 ± 0.16 , 0.57 ± 0.04 d^{-1}), no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

En forma general, es sabido que el tamaño de las microalgas es inversamente proporcional a su tasa de crecimiento la cual, incrementa en cierto rango con la temperatura (Sayegh y Montagnes 2011). Acorde a lo anterior, en cultivos donde no hubo enriquecimiento con

acetato de sodio la tasa de crecimiento de *C. capsulata* ($0.41 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$) fue mayor que la de *T. chui* ($0.19 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$). La presencia de acetato de sodio en el medio solo tuvo efecto positivo sobre la tasa de crecimiento de *T. chui* ($0.80 \pm 0.18 \text{ d}^{-1}$). Cabe mencionar que los cultivos enriquecidos con acetato de sodio, en especial aquellos de *C. capsulata*, se tornaron turbios favoreciendo el crecimiento bacteriano obteniendo con esto, tanto bajas tasas de crecimiento como bajas densidades celulares finales al realizar la comparación con los cultivos sin acetato de sodio ($0.18 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$, $4.8 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$).

Es frecuente notar que cierto tratamiento proporciona concentraciones celulares significativamente mayores, pero no existen diferencias importantes en la producción de biomasa; asimismo, se puede registrar incremento de biomasa, aún cuando la concentración celular permanezca constante (Arredondo y Voltolina 2007).

Hernández-Espinosa (1999) evaluó el crecimiento de la microalga *Pavlova lutheri* cultivada en sistemas batch bajo condiciones autotróficas (medio F/2) y mixotróficas (medio F/2 + acetato de sodio), y observó que conforme aumentaba la concentración de acetato en el medio incrementaba también la biomasa celular. Lo anterior, no concuerda con lo obtenido en esta investigación, ya que al probar diferentes porcentajes de acetato de sodio (0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1 % w/v) en el medio mineral estéril F/2 + NO_2^- , se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las tasas de crecimiento de *C. capsulata* a lo largo de los diferentes tratamientos; puesto que, la densidad celular de la microalga disminuyó conforme el enriquecimiento de carbono orgánico en el medio aumentó (Tabla XV). Lo anterior fue evidente al enriquecer el medio con 0.4, 0.8 y 1.0 % de acetato de sodio, pues fue en dichos tratamientos, donde se observaron los valores más bajos en la densidad celular así como en la tasa de crecimiento.

En este caso, la densidad inicial de células de microalga jugó un papel importante en los cultivos enriquecidos con fuentes de carbono puesto que, al no estar axénicas, las cepas de bacterias presentes pueden competir por nutrientes y debido a que su tasa de crecimiento es mucho más rápida que la de las microalgas puede impactar en forma negativa sobre el crecimiento de las mismas.

En cualquier tipo de ambiente las cepas de microalgas se encuentran fuertemente asociadas a diferentes cepas de bacterias y las interacciones que entre ellas se producen son recíprocas (Riquelme y Avendaño 2003). Dichas interacciones comprenden, en general, cuatro tipos diferentes: (1) cuando las bacterias y microalgas forman simbiosis, donde las bacterias se benefician de los exudados microalgales y en forma recíproca, el crecimiento de las microalgas se ve favorecido por compuestos que producen las bacterias tales como nutrientes remineralizados, vitaminas y otros factores de crecimiento; (2) cuando las bacterias actúan como parásitos sobre las microalgas provocando, eventualmente, lisis y muerte de dichos hospederos, mientras que las microalgas pueden también inhibir el crecimiento de las bacterias al liberar compuestos antibióticos; (3) interacciones de comensalismo cuando las bacterias no representan peligro para la microalga, pero teniendo en cuenta que el cambio entre comensalismo y parasitismo es altamente variable con el tiempo; y (4) cuando las bacterias se encuentran pobremente asociadas con las células de microalgas y por lo tanto, compiten en forma eficiente por nutrientes (Grossart y Simon 2007).

En repetidas ocasiones ha sido reportado que los cultivos de microalgas con presencia de bacterias, crecen mejor que los cultivos axénicos (Grossart y Simon 2007; Mouget *et al.* 1995). En lo que a esta investigación concierne, al evaluar el efecto de *B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris* sobre la tasa de crecimiento de *C. capsulata*, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos 0, 1, 2, 3, 4 y 5 (Figura 14). Las diferentes combinaciones de bacterias se inocularon en los cultivos de *C. capsulata* después de 4 d de tratamiento. La inoculación se realizó de esta forma de acuerdo con el hecho que las bacterias heterotróficas contribuyen con CO₂ a las microalgas además de representar posibles fuentes de nitrógeno, fósforo y elementos traza (Jiang *et al.* 2007), de esta manera al incluirlas en los cultivos de *C. capsulata*, dicho beneficio podría resultar en un incremento en la biomasa microalgal durante su fase exponencial.

Inocular *B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris* en los cultivos de *C. capsulata* ya fuese al comienzo del experimento (Tratamiento 5) o después

de 4 d de incubación (Tratamiento 4) no generó diferencias significativas ($P > 0.05$) en la tasa de crecimiento ni en la densidad celular final de *C. capsulata* (Tabla XVI). En el único caso donde se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) fue en los cultivos de *C. capsulata* donde al comienzo del experimento se inocularon las cinco cepas de bacterias utilizando el medio mineral estéril F/2 + NO_2^- enriquecido con acetato de sodio (Tratamiento 6), ya que fue en éste, donde se observaron los valores más bajos tanto de tasa de crecimiento ($0.08 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$) como de densidad celular final ($5.7 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) de *C. capsulata* (Figura 14).

Después de 12 d de cultivo, los valores más altos de densidad celular de la microalga, se obtuvieron al utilizar la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* ($24.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) y al adicionar al cultivo *B. megaterium* ($22.3 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$). Existen investigaciones que respaldan la idea que el CO_2 producido por el componente bacteriológico es benéfico para las microalgas, mientras que otras sugieren que la cantidad de CO_2 producida por las bacterias usualmente es más baja que la cantidad requerida por la microalga (Chirac *et al.* 1985). En muchos ambientes acuáticos la fijación de C fotosintético puede estar limitada por bajos valores en la relación $\text{CO}_2:\text{O}_2$ en la fase acuosa, sin embargo, dicha relación puede incrementarse con la presencia de poblaciones de bacterias aeróbicas (McFeters *et al.* 1978) en el medio.

La tasa de crecimiento más alta se obtuvo al inocular después de 4 d a *M. salsuginis* ($0.35 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$). Se encuentra reportado que microalgas con una tasa de crecimiento rápido, producen grandes cantidades de O_2 disuelto que puede acumularse en un gradiente dentro del microambiente de las mismas. Tal acumulación puede disminuir la fijación neta de C fotosintético favoreciendo la actividad oxigenasa de la enzima Rubisco; enzima bifuncional responsable de la fijación de C inorgánico (fotosíntesis) o del consumo de O_2 en presencia de luz (fotorespiración) (Mouget *et al.* 1995). Aún cuando las microalgas pueden evitar la fotorespiración utilizando mecanismos de concentración de CO_2 , el exceso de O_2 fotosintético que ellas producen puede ser consumido por las bacterias presentes en el cultivo y expresar la actividad carboxilasa de la enzima Rubisco constituyendo con lo anterior, una mejora en el crecimiento de las células de microalga.

Meseck *et al.* (2007) reportan que al agregar un componente bacteriológico a los cultivos de *T. chui* la tasa de crecimiento fue menor ($0.35 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$) que en aquellos cultivos sin bacterias adicionadas ($0.40 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), lo cual, concuerda con nuestros resultados puesto que la tasa de crecimiento de los cultivos donde no se agregaron bacterias fue mayor ($0.31 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$) que en los tratamientos donde se agregaron las cinco bacterias tanto al inicio del experimento ($0.26 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$) como al cuarto día ($0.25 \pm 0.06 \text{ d}^{-1}$).

Por su parte, Grossart y Simon (2007) reportan que las diferentes cepas de bacterias evaluadas afectaron el crecimiento de *Thalassiosira rotula* y que los efectos específicos de cada bacteria dependen de condiciones ambientales tales como la concentración de nutrientes, vitaminas y/o metales traza, así como del cambio o sucesión de las comunidades bacterianas en el medio (Pinhassi *et al.* 2004).

Los diferentes patrones de crecimiento de *C. capsulata* (Figura 14) obtenidos en esta investigación concuerdan con lo antes mencionado puesto que las interacciones entre bacteria-microalga se modificaron de acuerdo a las cepas de bacterias presentes en cada uno de los tratamientos, al momento de inoculación de las mismas y a las condiciones del medio, en especial la concentración de nutrientes al inocular las microalgas.

De acuerdo con lo anterior, aunque los cultivos de *C. capsulata* fueron inoculados con densidades altas de bacterias (10^9 UFC mL^{-1}), es posible que la cantidad de nutrientes presentes en el medio haya repercutido en el crecimiento bacteriano puesto que en los tratamientos 0 al 5 al observar las muestras en el microscopio, no fue notable su presencia. Sin embargo, al observar las muestras del tratamiento 6 la presencia de las bacterias fue evidente.

Enriquecer el medio con una fuente externa de carbono, favoreció el crecimiento bacteriano y no así el de *C. capsulata* (Tabla XVI) al igual que lo reportado por Watanabe *et al.* (2005) donde la adición de glucosa 1% a los cultivos con mezcla de *Chlorella sorokiniana* y la cepa de hongo CSSF-1 promovió el crecimiento del hongo e inhibió en forma significativa el crecimiento de la microalga, o a lo reportado por Carlsson y Caron (2001) quienes observaron incrementos de la biomasa bacteriana en tratamientos donde agregaron

a la par glucosa y una fuente de fósforo. Se ha propuesto que los compuestos lábiles de carbono orgánico, pueden ser acumulados por las bacterias para su uso en procesos de crecimiento durante periodos con limitaciones severas de nutrientes (Cotner y Wetzel 1992), aunado a lo anterior, se ha demostrado que el crecimiento bacteriano en ecosistemas acuáticos puede estar limitado por la disponibilidad de nitrógeno y fósforo más que por la concentración de carbono orgánico (Pomeroy *et al.* 1995). Con base en dichos resultados es evidente que el balance nutricional es parte importante para el tipo de interacción entre la microalga y sus bacterias, puesto que bajo condiciones eutróficas dicha interacción se tornó competitiva en vez de simbiótica.

Existe evidencia que los blooms de microalgas pueden formar agregados, los cuales representan uno de los componentes más importantes de las partículas sedimentables de carbón orgánico (PSCO) (Simon *et al.* 2002). Partículas transparentes de exopolímeros (PTE) han sido identificadas como agentes importantes para los procesos de floculación (Passow 2002a). Diferentes estudios han mostrado que las PTE son producidas por microalgas pero también por diversas bacterias (Passow 2002b). En esta investigación, en los cultivos de *C. capsulata* donde se inocularon *B. megaterium*, *M. salsuginis*, *M. alkaliphilus*, *A. macleodii* y *M. lutimaris* y se enriqueció el medio con acetato de sodio, se observaron agregados en el fondo de los matraces.

Las microalgas eliminan la mayoría del nitrógeno inorgánico (NH_4^+ , NO_3^-) y parte de fósforo por absorción celular directa (Tam y Wong 2000; Valderrama *et al.* 2002). Cuando no existe una limitación de nutrientes en el medio el componente que presenta tasas de crecimiento mayores ya sean microalgas o bacterias, podrá utilizar mayor cantidad de nutrientes en un rango también mayor (Meseck *et al.* 2007). Los resultados obtenidos por Meseck y Smith (2004) sugieren que de haber tenido una fuente ilimitada de nutrientes en los cultivos de *T. chui* evaluados, hubieran observado una mayor asimilación de NO_3^- y PO_4^{-3} . Así como también, existen investigaciones que reportan estímulos en el crecimiento bacteriano en cultivos enriquecidos con fósforo al compararlos con cultivos no enriquecidos (Chrzanowski *et al.* 1995; Elser *et al.* 1995). En nuestro caso, al analizar la concentración de NO_2^- en los diferentes tratamientos antes de inocular las bacterias, no se

observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos 0, 1, 2 y 3, ni entre el tratamiento 4 y 5, independientemente que éste último tuvo inoculadas las cinco bacterias desde el comienzo del experimento. Por el contrario al combinar las cinco cepas de bacterias y el acetato de sodio en los cultivos de *C. capsulata* si se observaron diferencias significativas en la asimilación de NO_2^- ($P < 0.05$) en comparación con el resto de los tratamientos (Tabla XVII).

Después de 12 d de cultivo, los valores más altos en la concentración de NO_2^- se observaron en los tratamientos 5 y 6 (176.83 ± 71.99 ; $282.67 \pm 19.14 \mu\text{M NO}_2^-$). Se observó también cierta reducción en la concentración de dicho nutriente utilizando la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* ($63.03 \pm 47.14 \mu\text{M NO}_2^-$) y en el caso donde solo se inoculó *M. salsuginis* ($81.5 \pm 8.79 \mu\text{M NO}_2^-$). La menor concentración de NO_2^- al final del cultivo se obtuvo con el uso de *B. megaterium* ($15.04 \pm 14.32 \mu\text{M NO}_2^-$). Algunos estudios sugieren que en las interacciones microalga-bacteria, las bacterias son mejores para asimilar nutrientes debido a que su relación superficie-volumen es mayor, además se ha comprobado tanto en condiciones de laboratorio como en estudios de campo que las bacterias pueden competir en forma eficaz con los productores primarios por fuentes de nitrógeno y fósforo (Currie y Kalff 1984; Ree 1972).

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la concentración de NH_4^+ entre los tratamientos, ya que las diferentes combinaciones de bacterias evaluadas no tuvieron impacto sobre la asimilación de NH_4^+ en el medio, lo cual fue opuesto a lo reportado por Meseck *et al.* (2007) ya que la presencia de bacterias en los cultivos de *T. chui* incrementaron la asimilación de NH_4^+ . En el tratamiento 6, se observaron los valores más altos en la concentración de NH_4^+ tanto a los 4 d ($1.90 \pm 0.36 \mu\text{M NH}_4^+$) como a los 12 d ($1.87 \pm 0.32 \mu\text{M NH}_4^+$).

En cuanto a la asimilación de NO_3^- no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos antes de inocular las bacterias, lo cual fue opuesto al evaluar las diferentes combinaciones de bacterias después de 12 d de tratamiento. La mayor asimilación de NO_3^- se obtuvo utilizando *B. megaterium* ($1.21 \pm 0.78 \mu\text{M NO}_3^-$), seguida de

la combinación de *A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis* ($1.78 \pm 2.03 \mu\text{M NO}_3^-$) reafirmando con esto lo reportado por Antunes *et al.* (2007) y Osaka *et al.* (2008).

El fósforo es el nutriente limitante más importante para los productores primarios (Dokolil *et al.* 2000). La asimilación de fósforo rápida y de “lujo” es una cualidad que diferentes especies de *Chlorella* poseen para sintetizar y acumular polifosfatos en sus células (Aitchison y Butt 1973). En este estudio, la cantidad de fósforo suministrada al medio fue consumida rápidamente por *C. capsulata* en todos los tratamientos, puesto que, a los 4 d disminuyó de 32.3 a $0.21 \mu\text{M PO}_4^{-3}$. Lo cual, coincide con lo reportado por Wang *et al.* (2010) puesto que después de 3 d, la concentración de fósforo en el medio se redujo notablemente debido a la rápida asimilación por parte de *Chlorella* sp. Por esta razón, al inocular las bacterias en los cultivos dicho nutriente pudo haberse convertido en limitante tornando la interacción en una competencia por nutrientes puesto que la concentración final de fósforo después de 12 d de experimentación fue de $0.37 \mu\text{M PO}_4^{-3}$.

Las microalgas tienden a formar polifosfatos lo cual depende de la concentración de fósforo en el medio, la intensidad de la luz y la temperatura (Powell *et al.* 2009). En medios con concentraciones bajas de fósforo, se piensa que los polifosfatos ácidos insolubles (PAIS) constituyen una forma de almacenamiento de PO_4^{-3} (Miyachi y Miyachi 1961; Miyachi *et al.* 1964). Una vez consumidos los PO_4^{-3} del medio, los polifosfatos almacenados disminuyen rápidamente pues son utilizados por la microalga para fines de crecimiento (John y Flynn 2000). Aunque los polifosfatos ácidos solubles (PAS) son utilizados en la producción de fosfolípidos o RNA requeridos por el metabolismo, también pueden ser utilizados como formas de almacenamiento de corto plazo solo cuando las concentraciones de PO_4^{-3} en el medio son altas.

Los resultados obtenidos por Powell *et al.* (2008) sugieren que altas concentraciones de fósforo en el medio pueden permitir que las microalgas asimilen PO_4^{-3} a su máxima capacidad, tomando en cuenta, tanto intensidad lumínica como la temperatura. Adicionalmente, si se incrementa la concentración celular de la microalga podrían alcanzarse altos niveles de asimilación de fósforo biológico.

En diferentes investigaciones, comparar los valores promedio de la relación N:P requerida por las microalgas ha resultado útil para distinguir ecosistemas con limitaciones de nitrógeno de aquellos limitados por fósforo (Downing y McCauley 1992). Ecosistemas con N:P menor que el promedio requerido (16:1) son ecosistemas limitados por la concentración de nitrógeno, mientras que, ecosistemas con N:P mayor que el promedio requerido (16:1) se encuentran limitados por la concentración de fósforo en el medio (Hecky y Kilham 1988; Redfield 1934).

Carlsson y Caron (2001) reportan limitación en el crecimiento microalgal por falta de fósforo, ya que al analizar la relación N:P observaron variaciones en promedio de 62. A lo largo de esta investigación la variación en el balance N:P fue evidente ya que al comienzo, el valor era cercano a 16, después de 4 d, aumentó en forma considerable (3356) para terminar con un valor de 265, el cual, es claramente mayor que 16. Lo cual, indica que aún cuando el fósforo a nivel externo sea limitante, la rápida asimilación y almacenamiento de dicho nutriente por parte de *C. capsulata* le permitió crecer durante el resto del experimento. Lo anterior fue opuesto para el componente bacteriológico evaluado y aunque se encuentra reportado que la asimilación de PO_4^{-3} por parte de las bacterias se satura por debajo de $0.1 \mu\text{M}$ (Currie y Kalff 1984) en este caso, es claro que la concentración de fósforo en el medio no fue suficiente para favorecer su crecimiento además del de *C. capsulata*.

Utilizar los consorcios microalga-bacteria en el tratamiento de aguas residuales comprende múltiples beneficios tanto ambientales como energéticos. Por ejemplo, al compararlos con procesos convencionales donde se utilizan lodos activados, estos consorcios podrían asimilar contaminantes orgánicos y a la vez constituir fuentes de ácidos grasos, carbohidratos y proteína para ser utilizados como fuente de alimento en actividades de producción de proteína animal. Diferentes especies de microalga del género *Chlorella* han sido ampliamente aplicadas en el tratamiento de aguas residuales probando capacidad para la remoción de nitrógeno y fósforo residuales, lo cual muestra gran potencial para reemplazar procesos convencionales en la fases secundarias o terciarias del tratamiento (Wang *et al.* 2010).

8.6 Efecto de las diferentes combinaciones microalga-consorcio microbiológico sobre los parámetros de producción y la composición del agua residual del cultivo de *L. vannamei*

El fitoplancton representa la fuente de alimento más importante para los estadios larvarios de ciertos crustáceos (Preston *et al.* 1992). Especies de microalgas como *Nannochloris aculata*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella sp.*, *Tetraselmis tetrathele* y *Tetraselmis chui* han sido utilizadas como alimento en el cultivo de larvas de camarón (Duerr *et al.* 1998) y diferentes investigaciones soportan el aporte nutricional que proveen a dichos organismos (Wood *et al.* 1991).

Se ha reportado que la flora microalgal y microbiana nativa de estanques de cultivo de *L. vannamei* con cero recambio representa una fuente natural de alimento la cual, impacta en forma positiva en los costos de producción así como en la tasas de crecimiento del camarón (Othoshi *et al.* 2011).

L. vannamei posee la habilidad para utilizar la producción natural como fuente de alimento y el efecto de ésta sobre el crecimiento del camarón se encuentra bien documentado (Burford *et al.* 2004a; Decamp *et al.* 2003; Othoshi *et al.* 2001; Wasielesky *et al.* 2006). Ju *et al.* (2009) reportaron que en estanques de cultivo heterotrófico de camarón, los bioflóculos presentes jugaron un importante rol sobre la tasa de crecimiento. En el presente estudio, al alimentar durante 32 d a poslarvas de *L. vannamei* con la combinación del consorcio microbiano (CM) y la microalga *T. chui*, se observó un incremento notable en la ganancia de peso de *L. vannamei*, puesto que fue con esta combinación donde se obtuvieron los valores más altos en la tasa de crecimiento y el peso final (0.230 ± 0.05 g semana⁻¹; 0.722 ± 0.15 g), seguida de *C. calcitrans* + CM (0.178 ± 0.16 g semana⁻¹; 0.568 ± 0.47 g) y *C. capsulata* + CM (0.177 ± 0.08 g semana⁻¹; 0.566 ± 0.24 g), cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos en ninguno de los dos parámetros de producción evaluados. Lo anterior, concuerda con lo reportado por Heasman *et al.* (2000) quienes también concluyen que *T. chui* es apropiada como alimento para *Penaeus monodon*.

Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de *L.vannamei*, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$). El valor más alto de supervivencia (95.56 %), se obtuvo al utilizar la combinación *C. capsulata* + CM, estos resultados coinciden con lo reportado por Sivakumar *et al.* (2011) donde de igual forma, evaluaron la tasa de crecimiento y la supervivencia de *P. monodon* al ser alimentado con cultivos de *Chlorella sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Synechococcus sp.* y *Phormidium sp.* y como resultado obtuvieron que tanto el peso final (0.59 g) como la supervivencia (76.67 %) de *P. monodon* incrementó en forma significativa al ser alimentado con *Chlorella sp.* Lo anterior confirma el hecho que la adición de cultivos de microalgas a los sistemas de cultivo soportan el crecimiento de larvas de camarón (D'Souza *et al.* 2000, 2002).

Se encuentra reportado que especies de microalga como *Isochrysis sp.* y *Tetraselmis tetrathele*, poseen un alto valor nutricional (Okauchi *et al.* 1997; Okauchi y Hirano 1986), en este trabajo de investigación al alimentar a *L. vannamei* con la combinación *I. galbana* + CM se obtuvo un peso final de 0.546 ± 0.15 g después de 32 días de cultivo. Por el contrario al utilizar la combinación *T. suecica* + CM se obtuvieron el peso final más bajo (0.282 ± 0.10 g) y el menor porcentaje de supervivencia (60.00 %).

A lo largo de los 32 d experimentales, la concentración de las diferentes formas residuales de N se mantuvieron dentro de los rangos reportados para el cultivo de *L. vannamei* (Lin y Chen, 2001; 2003). En el caso del NH_4^+ y NO_2^- , no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$), lo cual concuerda con lo reportado por Baloi *et al.* (2013) quienes también evaluaron el cultivo de *L. vannamei* en sistemas con presencia de bioflóculos bacterianos y no observaron diferencias entre los tratamientos evaluados.

De acuerdo con lo reportado por Cohen *et al.* (2005) bajas concentraciones de NO_2^- significan la completa oxidación del NH_4^+ a NO_3^- ; lo anterior, corresponde a lo observado al comienzo de este bioensayo en donde se tuvieron bajas concentraciones de NO_2^- y altas concentraciones de NO_3^- (Tabla XVIII). Estudios donde se ha evaluado la calidad del agua en sistemas con cero recambio reportan también bajas concentraciones de NO_2^- y NH_4^+ (Ray *et al.* 2010; Vinatea *et al.* 2010; Wasielesky *et al.* 2006) debido a la asimilación por

parte de la comunidad bacteriana presente en los sistemas de cultivo (Ebeling *et al.* 2006). En este trabajo a lo largo del periodo experimental, se observó un incremento en la concentración de NO_2^- y fue en las muestras de agua donde se aplicó la combinación *C. capsulata* + CM donde se observó el valor más alto ($440.00 \pm 154.16 \mu\text{M NO}_2^-$). Mientras que en los acuarios donde solo se aplicó CM se observó el valor más bajo ($215.00 \pm 50.48 \mu\text{M NO}_2^-$); al realizar el análisis de la concentración de NO_2^- , no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos.

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la concentración de NO_3^- . Al comienzo del bioensayo los valores de la concentración de dicho residual eran muy altos y en todos los tratamientos se observó un efecto benéfico puesto que la concentración disminuyó en forma considerable al final del experimento (Tabla XVIII). Las bajas concentraciones de NO_3^- observadas en donde se aplicaron las combinaciones *T. chui* + CM ($60.67 \pm 60.08 \mu\text{M NO}_3^-$) e *I. galbana* + CM ($73.67 \pm 81.59 \mu\text{M NO}_3^-$) pueden deberse a las bajas concentraciones de NH_4^+ disponibles (1.40 ± 0.98 y $1.90 \pm 1.62 \mu\text{M NH}_4^+$ respectivamente) para la oxidación de dicho compuesto por las bacterias presentes en el consorcio microbiano. Lo anterior pudo ser resultado de la asimilación del NH_4^+ por parte de las microalgas pues de acuerdo con Holl *et al.* (2011) en sistemas de cultivos intensivo de *L. vannamei* con presencia de bioflóculos, el NH_4^+ es la fuente preferida de N inorgánico por parte de las microalgas.

Al analizar la variación en la concentración de PO_4^{3-} , se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos y utilizando solamente CM se obtuvo el valor más bajo: $20.20 \pm 17.96 \mu\text{M PO}_4^{3-}$. Se encuentra reportado que la concentración de P en el medio afecta significativamente la asimilación y contenido del mismo en las microalgas, lo anterior, en sistemas donde el estímulo para la rápida asimilación tanto de fosfatos como de polifosfatos es el resultado específico derivado de la limitación de dicho nutriente (Patel *et al.* 2012).

El buen desempeño de especies de microalgas marinas en la asimilación de P se debe a su evolución dentro de ambientes marinos bajo condiciones extremas y concentraciones

variables de nutrientes (Elser *et al.* 2007). En este experimento, se observó que el uso de la microalga *T. suecica* más el consorcio microbiano resultó en una buena asimilación de PO_4^{-3} , lo cual concuerda con lo reportado con Patel *et al.* (2012) en donde evaluaron el desempeño de *T. suecica* en la asimilación de dicho residual y como resultado obtuvieron porcentajes de remoción del 80 % o con lo reportado por Aslan y Kapdan (2006) quienes obtuvieron porcentajes de remoción del 78 %.

En los acuarios donde se utilizaron las microalgas *C. capsulata*, *T. chui*, *I. galbana* y *C. calcitrans* en conjunto con el consorcio microbiano, se observó un incremento en la concentración de PO_4^{-3} . Lo anterior pudo deberse a la lisis de las células de las microalgas lo cual, permitió que el P acumulado al interior de las células regresara al agua residual (Droop 1975). En general la disminución en los procesos de eliminación y/o acumulación de P en la biomasa microalgal puede explicarse con la edad de los cultivos cuando éstos, alcanzan una fase estacionaria (Martinez *et al.* 2000).

Cabe mencionar que a los acuarios control donde solo se suministraba el alimento se les hacía un recambio diario del 80 % lo cual pudo tener efecto sobre la concentración final de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{-3} , pues ésta fue considerablemente menor en comparación con el resto de los tratamientos (Tabla XVIII).

El reciente progreso realizado en el área de los cultivos super-densos o también conocidos como cultivos en suspensión (Avnimelech 2006; Hargreaves 2006), refuerza la teoría de que la producción de organismos acuáticos es posible en cultivos hiperintensivos; además de representar una tecnología de producción amigable para el ambiente puesto que se utiliza una menor extensión de terreno, la calidad de las aguas residuales mejora, la generación de efluentes disminuye en forma significativa pues las tasas de recambio son muy bajas o nulas y con esto, también se reduce la presencia de microorganismos responsables de enfermedades infecciosas. (Azim y Little 2008; Burford *et al.* 2003, 2004a; De Schryver *et al.* 2008; McAbee *et al.* 2003; McNeil 2000; Pruder 2004; Schweitzer *et al.* 2008; Sowers *et al.* 2005; Wasielesky *et al.* 2006).

9. CONCLUSIONES

- El agua residual proveniente del cultivo de *L. vannamei* con potencial para fitorremediación, se encuentra constituida principalmente por nitrógeno inorgánico disuelto (formado en su mayoría por amonio), cierta cantidad de nitrógeno orgánico disuelto y un pequeño porcentaje de fósforo disuelto tanto orgánico como inorgánico.
- La mayor parte del fósforo residual se encuentra en la fase particulada y los valores más altos se observaron en las dietas con alto porcentaje de proteína sin importar la fuente proteica utilizada. De igual forma, la concentración del fósforo total y del fósforo inorgánico disuelto aumentaron con el nivel de proteína sin importar la fuente proteica. La mayor parte del nitrógeno residual se encuentra en forma de amonio y las concentraciones de las diferentes formas residuales de nitrógeno evaluadas, aumentaron con respecto al nivel de proteína.
- Sustituir la harina de pescado por fuentes de proteína vegetal no varió en forma significativa la composición de las diferentes formas residuales de nitrógeno. Más no así para las diferentes formas de fósforo residual, ya que dicha sustitución, disminuyó su concentración en forma significativa. La sustitución de la harina de pescado por fuentes de proteína vegetal contribuyó en forma significativa tanto a la retención de nitrógeno como de fósforo, sin afectar a ninguno de los parámetros de producción evaluados (supervivencia, tasa de crecimiento y peso final).
- Las cepas de las microalgas marinas *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* se encuentran asociadas con las bacterias heterotróficas marinas *A. macleodii*, *M. lutimaris*, *M. alkaliphilus*, *M. salsuginis* y *B. megaterium*. Las primeras tres, fueron persistentes aún después de tratar a las tres cepas de microalgas con los diferentes antibióticos los cuales, pudieron inhibirlas en condiciones *in vitro* más no *in vivo*. Las dos cepas de bacterias restantes, no persistieron después del tratamiento con la combinación de procesos de centrifugación más antibióticos.

- Las diferentes cepas de bacterias aisladas e identificadas en asociación con *C. capsulata*, *T. suecica* y *T. chui* poseen la capacidad para crecer en medios minerales como el medio F/2 siempre y cuando sean enriquecidos con acetato como fuente de carbón orgánico, nitritos y fósforo inorgánico. La adición de acetato al medio de cultivo de *C. capsulata* disminuye el crecimiento de la misma, en relación a la concentración de dicha fuente de carbono. La microalga *C. capsulata* junto con las tres bacterias persistentes (*A. macleodii*, *M. lutimaris* y *M. salsuginis*) asimila rápidamente el fósforo inorgánico, más no así los nitritos, al utilizar el medio mineral F/2 con nitritos como fuente de nitrógeno.
- La reincorporación de *B. megaterium* y *M. salsuginis* no afecta el crecimiento de *C. capsulata*, solo si dichas bacterias son adicionadas después de cuatro días de cultivo, cuando las concentraciones de fósforo inorgánico disuelto son bajas; pero si mejora su desempeño en la asimilación de fosfatos y nitritos en el caso de la adición de *B. megaterium*.
- Al utilizar por separado, las combinaciones de las microalgas *T. chui*, *C. calcitrans* o *C. capsulata* junto con el consorcio microbiano evaluado en el cultivo experimental de *L. vannamei* se obtuvieron las tasas de crecimiento y peso final más altos. El mejor porcentaje de supervivencia se obtuvo con el uso de la combinación *C. capsulata* más el consorcio microbiano. La mejor asimilación de amonio se obtuvo utilizando la combinación de *T. chui* más el consorcio microbiano; la mejor asimilación tanto de nitritos como de fosfatos, se obtuvo con el uso del consorcio microbiano. Mientras que para los nitratos no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados.
- Para incrementar la eficiencia del uso de bioflóculos compuestos por microalgas más bacterias, es necesario incorporar especies de microalgas que puedan fijar altas cantidades de CO₂, que posean alta eficiencia de conversión energética con baja intensidad luminosa así como mayor asimilación de nutrientes residuales.

10. LITERATURA CITADA

- Abdeel Hamed, S.M., O.E. Hammouda. 2007. Review. Biotechnological potential uses of immobilized algae. IJAB. 9(1):183-192.
- Aitchison E.A., V.S. Butt. 1973. The relationship between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. J. Exp. Bot. 24, 497-510.
- Alvarez, J.S., A. Hernández, J. Galindo, I. Fraga, T. García, H. Villarreal. 2007. Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997) Aquac. Res. 38 (7):689-695.
- Amaya, E.A., D.A. Davis, D.B. Rose. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. Aquaculture 262, 293-401.
- Anderson, A.J., A.J. Hacking, E.A. Dawes. 1987. Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. J. Gen. Microbiol. 133, 1045-1052.
- Antunes, A., L. França, F.A. Rainey, R. Huber, M.F. Nobre, K.J. Edwards, M.S. 2007. *Marinobacter salsuginis* sp. nov., isolated from the brine-seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1035-40.
- Araujo, M.A., A.L. Lawrence. 1993. Fatty acid profiles of muscle and midgut gland from wild *Penaeus californiensis*, *P. occidentalis*, *P. setiferus*, *P. stylirostris*, and *P. vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 24(3):425-8.
- Arnold, S.J., F.E. Coman, C.J. Jackson, S.A. Groves. 2009. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. Aquaculture 293(1-2):42-48.
- Arnold, S.J., M.J. Sellars, P.J. Crocos, G.J. Coman. 2006. Intensive production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of stocking density and artificial substrates. Aquaculture 261(3):890-896.
- Arredondo B.O., D. Voltolina. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. La Paz Baja California Sur. 97p.
- Aslan S., I.K. Kapdan. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 28, 64-70.
- Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters the need for a new comprehensive approach. Aquac. Eng. 34, 172-178.

- Avnimelech, Y., G. Ritvo. 2003. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture* 220, 549-567.
- Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257-263.
- Azim, M.E., D.C. Little. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283, 29-35.
- Azma, M., M. Rosfarizan, A.R. Raha, B.A. Arbakariya. 2010. Improved protocol for the preparation of *Tetraselmis suecica* axenic culture and adaptation to heterotrophic cultivation. *The Open Biotechnol. J.* 4, 36-46.
- Baldauf, S.L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300, 1703-1706.
- Baloi, M., R. Arantes, R. Schweitzer, C. Magnotti, L. Vinatea. 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquac. Eng.* 52, 39-44.
- Becker, W. 2004. Microalgae for aquaculture, the nutritional value of microalgae for aquaculture. En: Richmond, A., (Eds.). *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Publishers. 391p.
- Beiping, T., M. Kangsen, Z. Shixuan, Z. Quicun, L.Y. Lihe. 2005. Replacement of fish meal by meat and bone meal in practical diets for the White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.* 36, 439-444.
- Biswas, P., A.K. Pal, N.P. Sahu, A.K. Reddy, S. Misra. 2007. Lysine and / or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: effects on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture* 265, 253-260.
- Boyd, C.C. 1995. *Bottom soils, sediment, and pond aquaculture*. Chapman and Hall. New York. USA. 348p.
- Bratvold, D., C.L. Browdy. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMatsTM) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195, 81-94.
- Brettar, I., R. Christen, M.G. Hofle. 2002. *Rheinheimera báltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1851-1857.

- Brettar, I., R. Christen, M.G. Hofle. 2006. *Rheinheimera perlucida* sp. nov., a marine bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from surface water of the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2177–2183.
- Brock, J.A., R.B. Gose, D.V. Lightner, K. Hasson. 1997. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. En: Flegel, T.W., McRae, I.H. (Eds.). *Diseases in asian aquaculture III*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. Philippines. 284p.
- Bronk, D.A., M.W. Lomas, P.M. Glibert, K.J. Skchukert, M.P. Sanderson. 2000. Total dissolved nitrogen analysis: comparisons between the persulfate, UV and high temperature oxidations methods. *Mar. Chem.* 69, 163-178.
- Browdy, C., D. Bratvold, A.D. Stokes, R.P. McIntosh. 2001. Perspectives of the application of closed shrimp culture systems. En: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.). *The new wave proceedings of the special session on sustainable shrimp culture*. Aquaculture. 2001. The World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA. 34p.
- Browdy, C., G. Seaborn, H. Atwood, D. Allen, T.M. Samocha, E. Wirth, J.W. Leffler. 2006. Comparison of pond production efficiency, fatty acids profiles and contaminants in *Litopenaeus vannamei* fed organic plant-based and fish-meal based diets. *J. World Aquacult. Soc.* 37(4):437-451.
- Burford, M.A., A.R. Longmore. 2001. High ammonium production from sediments in hypereutrophic shrimp ponds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 187-195.
- Burford, M.A., K. Lorenzen. 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization. *Aquaculture* 229, 129-145.
- Burford, M.A., K.C. Williams. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture* 198(15):79-93.
- Burford, M.A., M.J. Sellars, S.J. Arnold, S.J. Keys, P.J. Crocos, N.P. Preston. 2004. Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-density rearing systems. *Aquac. Res.* 35, 508-515.
- Burford, M.A., P.J. Thompson, P.R. McIntosh, R.H. Bauman, D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219, 393-411.
- Burford, M.A., P.J. Thompson, P.R. McIntosh, R.H. Bauman, D.C. Pearson. 2004a. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in high-intensity zero-exchange system. *Aquaculture* 232, 525-537.

- Cabanillas, H., J.T. Ponce, C.A. Martínez, M.C. Chávez, G.L. Ross. 2001. Comparison of the digestability of diets based on fish meal and soybean meal in *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, using different temperatures and salinities for culture. *Ciencias Marinas*, Universidad Autónoma de Baja California 27(004):577-593.
- Calderón-Flores, C. 2007. Metodología para determinar la variación de los componentes de nitrógeno y fósforo residual en relación con el nivel de proteína en alimentos suministrados a diferentes tallas juveniles de *Litopenaeus vannamei* (Boone). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Carlsson, P., D. Caron. 2001. Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnol. and Oceanogr.* 46, 108-120.
- Casillas, A.R.F., F.J. Magallón, C.F. Portillo, B. Páez-Osuna. 2006. Nutrient mass balance in semi-intensive shrimp ponds from Sonora, México using two feeding strategies: trays and mechanical dispersal. *Aquaculture* 258, 289-298.
- Chattopadhyay, M.K., M.V. Jagannadham, M. Vairamanib, S. Shivaji. 1997. Carotenoid pigments of an antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus Roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239(1):85-90.
- Chen, S.Y., L.Y. Pan, M.J. Hong, A.C. Lee. 2012. The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Bot. Stud.* 53, 125-133.
- Chirac, C., E. Casadevall, C. Largeau, P. Metzger. 1985. Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Phycol.* 21, 380-387.
- Chrzanowski, T.H., R.W. Sterner, J.J. Elser. 1995. Nutrient enrichment and nutrient regeneration stimulate bacterio-plankton growth. *Microb. Ecol.* 29, 221-230.
- Chu, C.Y., R. Liao, L. Huang, P. Lin. 2004. Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 817-825.
- Claybrook, D.L. 1983. Nitrogen metabolism. En: Mantel, A. (Ed.). *The biology of crustacean*. 5^a Edición. International Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press. New York. 163-213p.
- CLSI. 2009. Métodos para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por dilución para bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Estándar aprobado- 8^a Edición. Documento CLSI M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 100p.

- Coello, N., L. Vidal, A. Bretaña. 2000. Aislamiento de una cepa de *Kocuria rosea* degradadora de plumas de aves de corral. *Revista Científica, FVC-LUZ* 10(2):107-113.
- Cohen, J.M., T.M. Samocha, J.M. Fox, R.L. Gandy, A.L. Lawrence. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquac. Eng.* 32, 425–442.
- Cotner, J.B., R.G. Wetzel. 1992. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 37, 232-243.
- Cupertino, E.L., W. Wasielesky, R. Cavalli, P.C. Abreu. 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* 269(1-4):355-362.
- Currie, D., J. Kalff. 1984. Can bacteria out compete phytoplankton for phosphorus?. A chemostat test. *Microb. Ecol.* 10, 205-216.
- Cuzon, G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas, J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551.
- D’Abramo, L.R., D.E. Conklin, D.M. Akiyama. 1997. Crustacean Nutrition. *Advances in World Aquaculture*. 6^a Edición. Baton Rouge. Louisiana. USA. 587p.
- D’Souza, F.M.L., G.J. Kelly. 2000. Effects of a diet of a nitrogen limited algae (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture*, 181, 311-329.
- D’Souza F.M.L., R.M. Kunckey, S. Hohmann, R.C. Pendrey. 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquat. Nutr.* 8, 113-120.
- Davis, D.A., C.R. Arnold, L. McCallum. 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diets formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 8, 87-94.
- Davis, D.A., C.R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for de Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 185, 291-298.
- de-Bashan, L.E., J.P. Hernández, T. Morey, Y. Bashan. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466-474.

- de-Bashan, L.E., M. Moreno, J.P. Hernández, Y. Bashan. 2002b. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36, 2841-2948.
- de-Bashan, L.E., Y. Bashan, M. Moreno, V.K. Lebsky, J.J. Bustillos. 2002a. Increased in pigment and lipid content, lipid variety and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* When coimmobilized in alginate beads with the microalgae growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48, 514-521.
- De Schryver, P., R. Crab, T. Defoirdt, N. Boon, W. Verstraete. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.
- Decamp, O., L. Conquest, I. Forster, A.G.J. Tacon. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-exchange aquaculture production system: role of Eukaryotic microorganisms. En: Lee, C.S., O'Bryen, P. (Eds.). *Microbial approaches to the aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems*. World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA, 86p.
- Decamp, O., J. Cody, L. Conquest, G. Denaloy, A.G.J. Tacon. 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquac. Res.* 34, 345–355.
- Dimayuga, R.E., M. Virgen, N. Ochoa. 1998. Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharm. Biol.* 36, 33-43.
- Dirk, E., S. Putt, K. Teeyaporn, C. Kanit. 2007. Nitrogen dynamics in the settlement ponds of a small-scale recirculating shrimp farm (*Penaeus monodon*) in rural Thailand. *Aquac. Int.* 15, 55-66.
- Dokulil, M., W. Chen, Q. Cai. 2000. Anthropogenic impacts to large lakes in China: the Tai Hu example. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 3, 81-94.
- Downing, J.A., E. McCauley. 1992. The nitrogen:phosphorus relationship in lakes. *Limnol. and Oceanogr.* 37, 936-945.
- Droop, M.R. 1975. The nutrient status of algal cells in batch culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*
- Duerr E.O., A. Molnar, V. Sato. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds (Mini-Review). *J. Mar. Biotechnol.* 7, 65-70.
- Eaton R.W. 1982. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus sp.* strain 12B. *J. Bacteriol.* 151, 48–57.

- Ebeling, J.M., M.B. Timmons, J.J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257(1-4):346-358.
- El-Komy, H.M.A. 2005. Coimmobilization of *A. lipoferum* and *B. megaterium* for plant nutrition. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 19-27.
- Elser, J.J., L.B. Stabler, R.P. Hasset. 1995. Nutrient limitation of bacterial growth and rates of bacterivory in lakes and oceans: A comparative study. *Aquat. Microb. Ecol.* 9, 105-110.
- Elser, J.J., M.E.S. Bracken, E.E. Cleland, D.S. Gruner, W.S. Harpole, H. Hilebrand, J.T. Ngai, E.W. Seabloom, J.B. Shurin, J.E. Smith. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 10(12):1115-1211.
- Faison, B.D., C.A. Cancel, S.N. Lewis, H.I. Adler. 1990. Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3649-3656.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. Vol 8, 93p.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 196p.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 109p
- Foster, I.P., W. Dominy, L. Obaldo, A.G.J. Tacon. 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 219, 655-670.
- Galicia-González, A. 2009. Uso del cártamo (*Carthamus tinctorius*) como ingrediente en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Ghaly, A.E., M. Kamal, N.S. Mahmoud. 2005. Phytoremediation of aquaculture wastewater for water recycling and production of fish fed. *Environ. Int.* 31, 1-13.
- Ghasemi, Y. S. Rasoul-Amini, A. Ebrahiminezhad, G. Zarrini, A. Kasemi, S. Mousavi-Khorshidi, M.B. Ghoshoon, M.J.J. Raei. 2010. Halotolerant amylase production by a novel bacterial strain, *Rehinheimera aquimaris*. *Res. J. Microbiol.* 5(2):144-149.

- Gobbrelaar J.U. 2005. Algal nutrition, mineral nutrition. En: Richmond A. (Ed.). Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing. Oxford. 97p.
- Gonzalez, L.E., R.O. Cañizares, S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chrolorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresour. Technol. 60, 259-262.
- Gram, L., T. Løvold, J. Nielsen, J. Melchiorsen, B. Spanggaard. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture 199, 1-11.
- Greenberg, A.E., A.D. Eaton, E.W. Rice, R.B. Baird. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. American Public Health Association. Washington D.C. 1368p.
- Greenblatt, C.L., J. Baum, B.Y. Klein, S. Nachshon, V. Koltunova, R.J. Cano. 2004. *Micrococcus luteus* survival in amber. Microb. Ecol. 48, 120-127.
- Grossart, H. 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. Aquat. Microbiol. Ecol. 19, 1-11.
- Grossart, H.P., M. Simon. 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. Aquat. Microbiol. Ecol. 47, 163-176.
- Guha A., B. Kumari, T.C. Bora, M.K. Roy. 1997. Possible involvement of plasmids in degradation of malathion and chlorpyrifos by *Micrococcus sp.* Folia. Microbiol. 42, 574-576.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Stein JR (ed). Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge. 289-312 p.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith WL, Chanley MH (eds.). Cultures of marine invertebrate animals. Plenum Press. New York. 26-60 p.
- Guillard, R.R.L., J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8, 229-239.

- Han, I.K., J.H. Lee, X.S. Piao, L. Defa. 2001. Feeding and management system to reduce environmental pollution in swine production. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 14, 432–444.
- Hargreaves, J. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34, 344–363.
- Hary, B., B.M. Kurup, J.T. Varghese, J.W. Schrama, M.C.J. Verdegem. 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 252(2-4):248-263.
- Heasman M., J. Diemar, W.O. Conner, T. Sushames, L. Fulkes. 2000. Development of extended self-life of micro algae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks- A summary. *Aquat. Res.* 31, 637-659.
- Hecky, R.E., P. Kilham. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol. and Oceanogr.* 33, 796-822.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Ravi-Kumar, V. Ganesan, C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1737-1746.
- Hernández, C., J. Sarmiento-Pardo, B. González-Rodríguez, I. Abdo de la Parra. 2004. Replacement of fish meal with co-extruded wet tuna viscera and corn meal in diets for white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Aquac. Res.* 35, 1153-1157.
- Hernández, C., M.A. Olvera-Novoa, K. Aguilar-Vejar, B. González-Rodríguez, I. Abdo de la Parra. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 277(3-4):244-250.
- Hernández-Espinosa, D. 1999. Variabilidad bioquímica de la microalga marina *Pavlova lutheri* en condiciones autotróficas y mixotróficas en un sistema de cultivo estático. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México. Tesis de licenciatura.
- Hoffman, J.P. 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *J. Phycol.* 34, 757-763.
- Holl, C.M., C.T. Glazer, S.M. Moss. 2011. Nitrogen stable isotopes in recirculating aquaculture for super-intensive shrimp production: tracing the effects of water filtration on microbial nitrogen cycling. *Aquaculture* 311, 146–154.

- Hu, M., Y. Wang, Z. Lua, M. Zhao, B. Xiong, X. Qian, Y. Zhao. 2008. Evaluation of rendered animal protein ingredients for replacement of fish meal in practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Blach). *Aquac. Res.* 39, 1475-1482.
- Hua, K., D.P. Bureau. 2006. Modelling digestible phosphorus content of salmonid fish feeds. *Aquaculture* 254, 455-465.
- Jackson, C., N. Preston, P.J. Thompson. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture* 218, 397-411.
- James, E.M., M. Timmons, I. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257(1-4):346-358.
- Jiang, L., L. Yang, L. Xiao, X. Shi, G. Gao, B. Qin. 2007. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas sp.*). *Hydrobiologia* 581, 161-165.
- John, E.H., K.J. Flynn. 2000. Modelling phosphate transport and assimilation in microalgae; how much complexity is warranted? *Ecol. Model.* 125, 145-157.
- Joint, I., P. Henriksen, G.A. Fonnes, D. Bourne, T.F. Thinstad, B. Riemann. 2002. Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquat. Microb. Ecol.* 29, 145-159.
- Joint, I., R. Morris. 1982. The role of bacteria in the turnover of organic matter in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 20, 65-118.
- Ju, Z.Y., I.P. Forster, W.G. Dominy. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292, 237-243.
- Keawtawee, T., K. Fukami, P. Songsangjinda, P. Muangyao. 2011. Isolation and characterization of *Noctiluca*-killing bacteria from a shrimp aquaculture pond in Thailand. *Fish. Sci.* 77, 657-664.
- Keawtawee, T., K. Fukami, P. Songsangjinda. 2012. Use of *Noctiluca*-killing bacterium *Marinobacter salsuginis* strain BS2 to reduce shrimp mortality caused by *Noctiluca scintillans*. *Fish. Sci.* 78, 641-646.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, L. Gibson. 2010. *Alteromonas macleodii* 0444 and *Neptunomonas sp.* 0536, two novel probiotics for hatchery-reared Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*. *Aquaculture* 309, 49-55.

- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, L. Gibson. 2012. Performance of single and multi-strain probiotics during hatchery production of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*. *Aquaculture* 354-355, 56-63.
- Khatoon, H., F. Yusoff, S. Banerjee, M. Shariff, J.S. Bujang. 2007a. Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackishwater shrimp ponds. *Aquaculture* 273(4):470-477.
- Khatoon, H., F.M. Yusoff, S. Banerjee, M. Shariff, S. Mohamed. 2007b. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture* 271(1-4):196-205.
- Khatoon, H., S. Banerjee, F.M. Yusoff, M. Shariff. 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquac. Nutr.* 15(2):186-193.
- Khun, D.D., G.D. Boardman, A.L. Lawrence, L. Marsh, G.J. Flick. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture* 296(1-2):51-57.
- Kim, J.Y. 2003. Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol. Letters.* 25, 1445-1449.
- Klochenko, P.D., V.V. Grubinko, G.B. Gumenyuk, O.M. Arsan. 2003. Peculiarities of ammonium nitrogen assimilation in green and blue-green algae. *Hydrobiol. J.* 39, 102-108.
- Koroleff, F. 1977. Determination of urea. En: Grasshoff, K (Ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. Weinheim. 167-173p.
- Liao, W.R, J.Y. Lin, W.Y. Shieh, W.L. Jeng, R. Huang. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine *vibrios*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 440-444.
- Lightner, D.V. 1999. The Penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV. Current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.* 9, 27-52.
- Lightner, D.V., C.R. Pantoja. 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): Current status report in the biology of the etiological agent and development of diagnostic methods. En: Rocha I.P. (Ed.). *Book of abstracts of fenacam*. Natal. Brasil.

- Lim, C. 1996. Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 27(4):402-9.
- Lin, Y., J. Chen. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259, 109–119.
- Lin, Y., J. Chen. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201.
- Lo, W., M.F. Wong, H. Chua, C.K. Leung. 2001. Removal and recovery of copper (II) ions by bacterial biosorption. Appl. Biochem. Biotech. 92, 447-457.
- López-Bucio, J., J.C. Campos-Cuevas, E. Valencia-Cantero, C. Velázquez-Becerra, R. Farías-Rodríguez, L.I. Macías-Rodríguez. 2009. *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. Instituto Investigaciones Químico Biológicas, México.
- López-Pérez, M., A. Gonzaga, A.B. Martin-Cuadrado, O. Onyshchenko, A. Ghavidel, R. Ghai, F. Rodriguez-Valera. 2012. Genomes of surface isolates of *Alteromonas macleodii*: the life of a widespread marine opportunistic copiotroph. Sci. Rep. DOI: 10.1038/srep00696.
- Lopez-Thompson, F., P.C. Abreu, W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture 20, 263-278.
- Luke, A.R., A. Bordinhon, D. Sookying, D. Allen, T.W. Brown, G.N. Whittis. 2009. Demonstration of alternative feeds for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters of west Alabama. Aquac. Res. 40, 496-503.
- McAbee, B., C. Browdy, R. Rhodes, A. Stokes. 2003. The use of greenhouseenclosed raceway systems for the super-intensive production of pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. Global Aquacult. Advoc. 6 (3):40–43.
- McNeil, R. 2000. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. Global Aquacult. Advoc. 3 (3):72–76.
- McFeters, G.A., S.A. Stuart, S.B. Olson. 1978. Growth of heterotrophic bacteria and algal extracellular products in oligotrophic waters. Appl. Environ. Microbiol. 35, 383-391.

- Magallón-Barajas, F.J. 2006. Desarrollo y aplicación de una metodología, para evaluar la variabilidad de la capacidad de carga de la acuicultura de camarón, en la región del Golfo de California. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Cuba.
- Martinez, M.E., S. Sanchez, J.M. Jimenez, F. El Yousfi, L. Muñoz. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 73, 263-272.
- Meseck, S., B. Smith. 2004. How high pH's can affect the chemistry in large volume cultures of *Tetraselmis chui* (PLY429). *J. Shellfish Res.* 23, 640.
- Meseck, S.L., B.C. Smith, G.H. Wikfors, J.H. Alix, D. Kapareiko. 2007. Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *J. Appl. Phycol.* 19, 229-237.
- Miles, R.B., F.A. Chapman. 2006. The benefits of fish meal in aquaculture diets. Universidad de Florida. URL <http://www.thefishsite.com/articles/200/the-benefits-of-fish-meal-in-aquaculture-diets>
- Miyachi, S., R. Kanai, S. Mihara, S. Miyachi, S. Aoki. 1964. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 93, 625-634.
- Miyachi, S., S. Miyachi. 1961. Modes of formation of phosphate compounds and their turnover in *Chlorella* cells during the process of life cycle as studied by the technique of synchronous culture. *Plant. Cell. Physiol.* 2, 415-424.
- Montoya, R.A., A.L. Lawrence, W.E. Grant, M. Velasco. 2002. Simulation of inorganic nitrogen dynamics and shrimp survival in an intensive shrimp culture system. *Aquac. Res.* 33, 81-94.
- Moss, S.M. 2002. Dietary importance of microbes and detritus in Penaeid shrimp aquaculture. En: Lee, C.S., O'Bryen, P. (Eds.). *Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems*. World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA. 18p.
- Moss, S.M., S.M. Arce, B.J. Argue, C.A. Ootshi, F.R.O. Calderon, A.G.J. Tacon. 2001. Greening of the blue revolution: Efforts toward environmentally responsible shrimp culture. En: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds). *The new wave, proceedings of the special session on sustainable shrimp culture*. Aquaculture. 2001. The World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA. 19p.
- Moss-Komarey R. K., M. Moss-Shaun. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 35(4):536-542.

- Mouget, J.L., A. Dakhama, M.C. Lavoie, J. de la Noüe. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol. Ecol.* 18, 35-44.
- Mudrik, Z., K. Korzeniewski. 1995. Activity of heterotrophic bacteria isolated from surface microlayer and subsurface water in the Southern Baltic. *Studia i Materialy Oceanologiczne* 69, 45-50.
- Muller-Feuga, A., R. Kass, J. Moral. 2003. The microalgae of aquaculture. En: Stottrup, J. & McEvoy, L. (Eds.). *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Science Publishers. 252p.
- Muñoz, R., B. Guieysse. 2006. Algal-bacterial processes for treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40, 2799-2815.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265-270.
- Neori, A., M. Shpigel, D. Ben-Ezra. 2000. Sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186, 279-291.
- Neori, A., M. Shpigel. 2002. Mariculture sustainability by integration of algae/algivores to fish/shrimp ponds. Abstract the 1st Congress of the International Society Applied Phycology, Aquadulce, Roquetas del Mar, Almeria (Spain). 26-30 May 2002. Universidad de Almeria, Servicio de Publicaciones.
- Okauchi M., K. Kawamura, Y. Mizukami. 1997. Nutritive value of Tahiti *Isochrysis sp.* for larval greasy back shrimp *Metapenaeus emsis*. *Bull. Natl. Res. Ins. Aquat.* 26,1-11.
- Okauchi M., Y. Hirano. 1986. Nutritional value of *Tetraselmis tetrathele* for larvae of *Penaeus japonicus*. *Bull. Natl. Res. Ins. Aquat.* 9, 29-33.
- Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 81-91.
- Olguín, E.J., G. Sánchez, G. Mercado. 2004. Cleaner production and environmentally sound biotechnology for the prevention of upstream nutrient pollution in the Mexican coast of the Gulf of México. *Ocean Coastal Manage.* 47(11-12):642-670.
- Olguín, E.J., G. Sánchez-Galván, R.E. González-Portela, M. López-Vela. 2008. Constructed wetland mesocosms for the treatment of diluted sugarcane molasses stillage from ethanol production using *Pontederia sagittata*. *Water Res.* 42, 3659-3666.

- Ong, A.S.H., E.S. Tee. 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Meth. Enzymol.* 213, 142-167.
- Ördörg, V., W.A. Stirk, R. Lenobel, M. Bancirova, M. Strnad, J. van Staden, J. Szigeti, L. Németh. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. App. Phycol.* 16, 309-314.
- Osaka, T., K. Shirotani, S. Yoshie, S. Tsuneda. 2008. Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Res.* 42, 3709-3718.
- Otsoshi, C.A., A.D. Montgomery, A.M. Look, S.M. Moss. 2001. Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 32, 243-249.
- Otsoshi, C.A., Moss, D.R., Moss, S.M., 2011. Growth-enhancing effect of pond water on four size classes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 42, 417-422.
- Páez-Osuna, F. 2001. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environ. Manage.* 28 (1):131-140.
- Pan, C.H., Y.H. Chien, J.H. Chen. 2001. Effect of light regime, algae in water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. *Zool. Stud.* 371-382.
- Passow, U. 2002a. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog. Oceanogr.* 55, 287-333.
- Passow, U. 2002b. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 1-12.
- Patnaik, S., T.M. Samocha, D.A. Davis, R.A. Bullis, C.L. Browdy. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 12(5):395-401.
- Patel A., S. Barrington, M. Lefsud. 2012. Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms. *GCB Bioenergy* 4, 485-495.
- Pérez-Velazquez M., M.L. González-Felix, S. Gómez-Jiménez, D.A. Davis, N. Miramontes. 2008. Nitrogen budget for a low-salinity, zero-water exchange culture system: II. Evaluation of isonitrogenous feeding of various dietary protein levels to *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.* 39, 995-1004.

- Pinhassi, J., M.M. Sala, H. Havskum, F. Peters, O. Guadayol, A. Malits, C.L. Marrase. 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753-6766.
- Pomeroy, R.L., J.E. Sheldon, W.M. Shledon, F. Peters. 1995. Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117, 259-268.
- Post, A.F., I. Cohen, E. Romen. 1994. Characterization of two *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) strains isolated from wastewater oxidation ponds. *J. Phycol.* 30, 950-954.
- Powell, N., A. Shilton, S. Pratt, Y. Chisti. 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5958-5962.
- Powell, N., A. Shilton, Y. Chisti, S. Pratt. 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. *Water. Res.* 43, 4207-4213.
- Preston N.P., M.A. Burford, F.E. Coman, P.C. Rothlisberg. 1992. Natural diet of larval *Penaeus merguensis* Decapoda: Penaeidae survival. *Mar. Biol.* 113, 181-191.
- Pruder, G. 2004. Biosecurity: application in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 32, 3–10.
- Ray, A.J., B.L. Lewis, C.L. Browdy, J.W. Leffler. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plantbased feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299, 89–98.
- Redfield, A.C. 1934. On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. En James Johnstone Memorial Volume. (ed. R.J. Daniel). University Press of Liverpool. 177-192p.
- Ree, G. 1972. Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. *Limnol. Oceanogr.* 17, 505-514.
- Riquelme, C.E., R.E. Avendaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y su uso potencial en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76, 725-736.
- Rocha, I.P., J. Rodriguez, L. Amorin. 2004. The Brazilian shrimp culture in 2003. *Brazilian Association of Shrimp Rearing Magazine* 6(1):30-36.

- Romanenko, L.A., M. Uchino, E. Falsen, N.V. Zhukova, V.V. Mikhailov, T. Uchimura. 2003. *Rheinheimera pacifica* sp. nov., a novel halotolerant bacterium isolated from deep sea water of the Pacific. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1973–1977.
- Rosenberry, B. 2001. Shrimp farming in the USA. *World Shrimp Farming.* 316p.
- Rotz, C.A. 2004. Management to reduce nitrogen losses in animal production. *J. Anim. Sci.* 82, 119-137.
- Roy, L.A., A. Bordinhon, D. Sookying, D. D'Allen, T. Brown, G. Whitis. 2009. Demonstration of alternative feeds for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters of west Alabama. *Aquac. Res.* 40, 496-503.
- Ruíz-Fernández, A.C. 2005. Calidad de agua en cuatro granjas camaronícolas en el noreste de México: estudio comparativo de las características física, químicas y de contribución orgánica en aguas de ingreso y egreso. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Oceanografía Química. México.
- Samocha, T.M., A. Lawrence, C.R Collins, C.R. Emberson, J.L. Harvin, P.M. Van Wyk. 2001. Development of integrated, environmentally sound, inland shrimp production technologies for *Litopenaeus vannamei*. En: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds). *The new wave, proceedings of the special session on sustainable shrimp culture.* Aquaculture. 2001. The World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA. 75p.
- Sandrin, T.R., R.M. Maier. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ. Hlth. Persp.* 111, 1093-1101.
- Sayegh, F.A.Q., D.J.S. Montagnes. 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresour. Technol.* 102, 3007-3013.
- Schneider, O. 2006. Fish waste management by conversion into heterotrophic bacteria biomass. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherlands.
- Schuler, D.J., G.D. Boardman, D.D. Kuhn, G.J. Flick. 2010. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *J. World Aquacult. Soc.* 41(3):438-446.
- Schweitzer, R., Andreatta, E., Souza, J., Arantes, R., Seiffert, W., 2008. O cultivo com bioflocos: engorda e formacao de matrizes de *Litopenaeus vannamei*. *Panorama da Aquicultura* 107, 38–43.

- Sengha, S.S., A.J. Anderson, A.J. Hacking, E.A. Dawes. 1989. The Production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 135, 795-804.
 - Seung-Bum, K., O.I. Nedashkovskaya, V.V. Mikhailov, S.K. Han, K.O. Kim, M.S. Rhee1, K.S. Bae1. 2004. *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1617–1620.
- Shimoda, T., Y. Fujioka, C. Srithong, C. Aryutha. 2005. Phosphorous budget in shrimp aquaculture pond with mangrove enclosure and aquaculture performance. Fish. Sci. 71, 1249-1255.
- Shi-Yen, S., C. Ben-Shuan. 2003. Grass shrimp, *Penaeus monodon*, growth as influenced by dietary taurine supplementation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Physiology 108(1):137-142.
 - Simon, M., H.P. Grossart, B. Schweitzer, H. Ploug. 2002b. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. Aquat. Microb. Ecol. 28, 175-211.
 - Sivakumar, N., M. Sundararaman, G. Selvakumar. 2011. Efficacy of micro algae and cyanobacteria as a live feed for juveniles of shrimp *Penaeus monodon*. Afr. J. Biotechnol. 10(55):11594-11599.
 - Sowers, A., D. Gatlin, S. Young, J. Isely, C. Browdy, J. Tomasso. 2005. Responses of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in water containing low concentrations of total dissolved solids. Aquacult. Res. 36, 819–823.
 - Srinivasa-Rao, P.S. I. Karunasagar, S.K. Otta. 2000. Incidence of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in tropical shrimp culture ponds. Aquac. Int. 8(5):463-472.
 - Stackebrandt, E., C. Koch, O. Gvozdiak, P. Shumann. 1995. Taxonomic dissection of the genus Micrococcus: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 4, 682-692.
 - Stewart, W.D.P. 1980. Transport and utilization of nitrogen by algae. En J.W. Payne (ed.). Microorganisms and nitrogen sources. Wiley and Sons Ltd. New York. N.Y. 577-606p.
 - Strickland, J.D.H., T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 167, Canada.
 - Sugiura, S.H., D.D. Marchant, K. Kelsey, T. Wiggling, R.P. Ferraris. 2006. Effluent profile of commercially used low phosphorous fish feeds. Environ. Pollut. 40, 95-101.

- Tacon, A.G.J., J.J. Cody, L.D. Conquest, S. Divakaran, I.P. Forster, O.E. Decamp. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac. Nutr.* 8, 121-137.
- Tam, N.F., Y. Wang. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107, 145-151.
- Tao, Y., A. Fishman, W.E. Bentley, T.K. Wood. 2004. Oxidation of Benzene to Phenol, Catechol, and 1,2,3-Trihydroxybenzene by Toluene 4-Monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and Toluene 3-Monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. *App. Environ. Microbiol.* 70, 3814–3820.
- Thakur, E.D., C.K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in close shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquac. Eng.* 27, 159-176.
- Ting C., S.Y. Park, L. Yebo. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 19, 360-369.
- Tulli, F., G. Chini Zittelli, G. Giorgi, B.M. Poli, E. Tibaldi, M.R. Tredici. 2012. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of european sea bass juveniles fed organic diets. *J. Aquat. Food Prod. T.*, 21(3):188-197.
- Ungers, G.E., J. Cooney. 1968. Isolation and characterization of carotenoid pigments of *Micrococcus roseus*. *J. Bacteriol.* 96(1):234-241.
- Vadstein, O. 2000. Heterotrophic, planktonic bacteria and cycling of phosphorus: phosphorus requirements, competitive ability and food web interactions. *Adv. Microb. Ecol.* 16, 115-168.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10, 109-122.
- Valderrama, L.T., C.M. Del Campo, C.M. Rodríguez, L.E. de-Bashan, Y. Bashan. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Res.* 36, 4185-4192.
- Vary, P.S., R. Biedendieck, T. Fuerch, F. Meinhardt, M. Rohde, W.D. Deckwer, D. Jahn. 2007. *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 957-967.
- Vázquez-Correa, P. 1996. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociados a la rizósfera de los mangles: *Avicennia germinans* (L.) L y *Laguncularia racemosa* (L.) Gaerth. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

- Vinatea, L., A.O. Gálvez, C.L. Browdy, A. Stokes, J. Venero, J. Haveman, B.L. Lewis, A. Lawson, A. Shuler, J.W. Leffler. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: interaction of water quality variables. *Aquac. Eng.* 42, 17–24.
- Wang, L., M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang, R. Ruan. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 4, 1174-1186.
- Wasielesky, W.Jr., H. Atwood, A. Stokes, C.L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396-403.
- Watanabe, K., N. Takihana, H. Aoyagi, S. Hanada, Y. Watanabe, N. Ohmura, H. Saiki, H. Tanaka. 2005. Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 187-196.
- Weihrauch, D., S. Morris, D.W. Towle. 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491-4504.
- Weirich, C.S., C.L. Browdy, D. Bratvold, B.J. McAbee, A.D. Stokes. 2002. Preliminary characterization of a prototype minimal exchange super-intensive production system. Proceedings of the IVth International Conference on Recirculating Aquaculture. Virginia Tech University. Blacksburg. Virginia. USA. 270p.
- Wood A., D.F. Toerien, R.K. Robinson. 1991. The algae recent developments in cultivation and utilization. En: Hudson B.J.F (ed). *Developments in food Proteins-7*, London. Elsevier. Appl. Sci. 123p.
- Xia, L.Z., L.Z. Yang, M.C. Yan. 2004. Nitrogen and phosphorus cycling in shrimp ponds and the measures for sustainable management. *Environ. Geochem. Health* 26, 245-251.
- Xiao-Yi, W., Y. Yu-Feng. 2010. Accumulation of heavy metal and total phosphorus in intensive aquatic farm sediments: comparison of tilapia *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, Asian seabass, *Lates calcarifer* and White shrimp *Litopenaeus vannamei* farms. *Aquac. Res.* 41, 1377-1386.
- Ye, J.D., K. Wang, F.D. Li, Y.Z. Sun, X.H. Liu. 2010. Incorporation of a mixture of meat and meat bone meal, poultry by-product meal blood meal and corn gluten meal as a replacement of fish meal in practical diets of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. *Aquac. Nutr.* 17(2):337-347.

- Yen K.M., M.R. Karl, L.M. Blatt, M.J. Simon, R.B. Winter, P.R. Fausset, H.S. Lu, A.A. Harcourt, K.K. Chen. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. J. Bacteriol. 173(17):5315-27.
- Yoo, G.Y., X.J. Wang, S. Choi, K. Han, J.C. Kang, S.C. Bai. 2005. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed diets containing soybean meal. Aquaculture 243, 315-322.
- Yoon, J., S. Park, S. Kang, T. Oh. 2007. *Rheinheimera aquimaris* sp. Nov., isolation from seawater of the East Sea in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1386-1390.
- Yoon, J.H., S.J. Kang, Y.T. Jung, T.K. Oh. 2008. *Muricauda lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 1603-1607.
- Yoon-Kyung, K., C. Soo-Yeon, K. Yoon-Ho, K. Toshiya, J. Eon-Seon, K. Dong-Soo, H. Myunng-Soo. 2008. Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms. J. App.Phycol. 20, 375-386.
- Yoshie, S., T. Ogawa, H. Makino, H. Hirosawa, S. Tsuneda, A. Hirata. 2006. Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. Lett. Appl. Microbiol. 42, 277-283.
- Yu-Hong, Y., W. Yu-Yu, L. Yang, L. Qing-Zhang. 2011. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Int. 19(3):405-419.
- Zarain-Herzberg, M., A.I. Campa-Cordova, R.O. Cavalli. 2006. Biological viability of producing white shrimp *Litopenaeus vannamei* in seawater floating cages. Aquaculture 259(1-4):283-289.
- Zhuang, W.Q., J.H. Tay, A.M. Maszenan, L.R Krumholz, S.T. Tay. 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. Lett. Appl. Microbiol. 36, 251.
- Zobell, C.E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J. Mar. Res. 4, 42-75.

11. ANEXOS