

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ASOCIADAS A
LAS MICROALGAS *Isochrysis galbana* Y *Chaetoceros gracilis*,
UTILIZADAS EN CULTIVO DE MOLUSCOS BIVALVOS”

Presentado por:

LUCÍA NATALÍ RÍOS CASTRO

Tesis para optar por el título de:

INGENIERO PESQUERO

Lima - Perú

2018

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Incabiotec, por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis y de forma muy especial a Benoit Diringer, por compartir sus conocimientos, guiarme, aconsejarme y brindarme su amistad.

A Krizia Pretell, Karina Zapata, José González, Joselyn Zavala, Abrahán Flores y Angelita Ramos, por enseñarme, ayudarme y compartir conmigo, siendo más que compañeros de trabajo, amigos.

A Reproducción y Comercialización of Scallops Company por proporcionar los ambientes necesarios para la realización de esta tesis.

A la profesora Patricia Gil-Kodaka por asesorarme y ayudarme en todo este tiempo.

A mi familia, por siempre estar presente, brindándome su apoyo, aconsejándome, preocupándose por mí y motivándome a ser mejor persona.

Y en general, a todas la personas que de una u otra forma me ayudaron de manera profesional o personal a concluir este proceso exitosamente.

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	5
I.1. Índice de tablas	7
I.2. Índice de figuras	8
I.3. Índice de anexos	9
II. RESUMEN	10
III. GLOSARIO	11
IV. INTRODUCCIÓN	13
V. REVISIÓN DE LA LITERATURA	15
V.1. Microalgas y bivalvos	15
V.2. Relaciones microalga-bacteria	17
V.3. Bacterias cultivables asociadas a microalgas	20
V.4. Cultivos de microalgas con bacterias	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VI.1. Lugar de Ejecución	23
VI.2. Materiales	23
VI.2.1. Material biológico	23
VI.2.2. Materiales de laboratorio	23
VI.2.3. Reactivos Químicos	24
VI.2.4. Equipos	24
VI.3. Metodología	25
VI.3.1. Aislamiento de bacterias cultivables	27
VI.3.2. Extracción de ADN bacteriano	27
VI.3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	28
VI.3.4. Electroforesis	28
VI.3.5. Preparación de las bacterias	28
VI.3.6. Evaluación del crecimiento de microalgas	29
VI.3.7. Análisis Estadístico	30
VI.3.8. Secuenciación y análisis	30

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
VII.1. Aislamiento de las bacterias cultivables	31
VII.2. Preparación de las bacterias.....	32
VII.3. Evaluación del crecimiento de microalgas	32
VII.4. Electroforesis en gel de agarosa	42
VII.5. Secuenciación y análisis.....	43
VII.6. Análisis estadístico.....	45
VII.7. Aplicación en la alimentación de larvas de moluscos bivalvos	48
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. RECOMENDACIONES	52
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
XI. ANEXOS	60

I.1. Índice de tablas

Cuadro 1: Morfología de las bacterias cultivables aisladas de <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Chaetoceros gracilis</i>	31
Cuadro 2: Tinción de Gram de las bacterias cultivables aisladas de <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Chaetoceros gracilis</i>	32
Cuadro 3: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 1.....	33
Cuadro 4: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 2.....	33
Cuadro 5: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Chaetoceros gracilis</i> en la etapa 1.....	34
Cuadro 6: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Chaetoceros gracilis</i> en la etapa 2.....	34
Cuadro 7: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 3.....	35
Cuadro 8: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 4.....	35
Cuadro 9: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Chaetoceros gracilis</i> en la etapa 3.....	36
Cuadro 10: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Chaetoceros gracilis</i> en la etapa 4.....	36
Cuadro 11: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Chaetoceros gracilis</i> en la etapa 5.....	38
Cuadro 12: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 5.....	40

Cuadro 13: Cálculo del total de microalgas (L) a utilizar con el tratamiento con <i>Lysinibacillus sp.</i>	49
--	----

I.2. Índice de figuras

Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de <i>Pavlova viridis</i> en cultivo puro (A) y en co-cultivo con la bacteria <i>Citrobacter freundii</i> (B) (Ahamed <i>et al.</i> , 2015).....	17
Figura 2: Esquema general de la metodología empleada.....	23
Figura 3: Esquema de la evaluación del crecimiento de microalgas. El color amarillo representa la microalga <i>Isochrysis galbana</i> y el color naranja la microalga <i>Chaetoceros gracilis</i>	26
Figura 4: Cultivos mixtos de microalgas y bacterias. Observado con un microscopio digital PentaView LCD (Celestron) a 40X. A) Cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> , inoculado con la bacteria BM6. B) Cultivo de <i>Chaetoceros gracilis</i> , inoculado con la bacteria G6.....	37
Figura 5: Cultivo de <i>Chaetoceros gracilis</i> , día 4. A) Etapa 4: Control, G3, G4 y G6. B) Etapa 5: G3.1, Control y G3.2. C) Etapa 5: G4.1, Control y G4.2. D) Etapa5: G6.1, Control y G6.2.....	38
Figura 6: Curva de crecimiento del cultivo de <i>Chaetoceros gracilis</i> en las etapas 4 y 5.....	39
Figura 7: Cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> . A) Etapa 4: BM6, Control e I4. B) Etapa 5: Control, I4.1 e I4.2. C) Etapa 5: BM6.1, Control y BM6.2.....	41
Figura 8: Curva de crecimiento del cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> en la etapa 5.....	41
Figura 9: Gel de electroforesis. CE: Control de extracción, C-: Control de PCR, C+: Control positivo, MP: Marcador de peso.	42

Figura 10: Análisis estadístico del cultivo de *Chaetoceros gracilis*. A) Etapa 4. B) Etapa 5.....46

Figura 11: Análisis estadístico del cultivo de *Isochrysis galbana*, etapa 5.....47

I.3. Índice de anexos

ANEXO 1: Secuencias de ADN obtenidas a partir del gen 16S ARNr.60

ANEXO 2: Análisis estadístico.64

ANEXO 3: Tabla de alimentación (Modificada de MAGAP y Concepto Azul, 2015).....72

ANEXO 4: Cálculos para determinar el ahorro en L del cultivo de microalgas al inocular las cepas bacterianas.73

II. RESUMEN

Se aislaron, purificaron y caracterizaron cepas bacterianas asociadas a dos especies de microalgas utilizadas en la larvicultura de la concha de abanico *Argopecten purpuratus*. Estas cepas fueron inoculadas individualmente a cada cultivo de microalgas para comprobar si presentaban un efecto promotor en el crecimiento. La inoculación se realizó en cinco etapas que permitieron seleccionar las mejores cepas; las dos primeras a nivel de cultivo puro, en un volumen de 10 ml, las siguientes dos en un volumen de 500 ml con aireación constante y en la última etapa se realizó el traspase de 500 ml a 2L, separándose en dos grupos, el primero continuó sin ninguna modificación y en el segundo hubo una re-inoculación de las bacterias. Se aislaron en total diez cepas bacterianas, dos de ellas, *Lysinibacillus sp.* y *Bacillus cereus*, evidenciaron una mejora en la producción de *Isochrysis galbana* con 45 y 31% más densidad, comparado con el tratamiento control. Y tres de ellas, *Psychrobacter sp.*, *Lysinibacillus sp.* y *Staphylococcus saprophyticus* incrementaron el crecimiento en el cultivo de *Chaetoceros gracilis* en 47, 52 y 47%, respectivamente. Logrando dichas diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la última etapa, con una nueva adición de bacterias cuando se efectuó el traspase. Si bien los resultados mostrados en este experimento son alentadores, se debe comprobar que el efecto continúe en el cultivo masivo.

Palabras clave: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, aislamiento, bacterias, crecimiento.

III. GLOSARIO

- ADN (Ácido Desoxirribonucleico): Es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T) (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano).
- Amplicón: Producto de una reacción de amplificación de ADN. Amplificación de ADN: Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN, tanto in vivo, en un plásmido, fago u otro vector, como in vitro, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Zaid *et al.*, 2004).
- Cepa: Cultivo puro de microorganismos de una especie, caracterizado por una o más propiedades fenotípicas o genotípicas, tales como tipo serológico o reacción bioquímica, que se mantienen en forma relativamente estable durante sucesivos subcultivos (Bennington, 2000).
- *Chaetoceros gracilis*: Es un alga unicelular perteneciente al grupo de diatomeas (*Bacillariophyceae*) planctónicas, generalmente marina. Sin movilidad, con una pared celular gruesa y setas conformadas de silicio. Volumen celular: 80 μm^3 . Se cultivan como alimento para las diferentes etapas del cultivo en criaderos de moluscos de valor comercial (Helm *et al.*, 2006).
- Cultivo axénico: Cultivo libre de contaminantes externos y de simbiontes internos; generalmente no se consiguen tales requisitos con una esterilización de superficie; a veces se utiliza incorrectamente como sinónimo de cultivo aséptico (Zaid *et al.*, 2004).
- Electroforesis: Es una técnica utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Los poros del gel actúan como un colador, permitiendo que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano).

- Ficósfera: Zona que se extiende hacia afuera de una célula o colonia de algas, con una distancia indefinida, en la que el crecimiento bacteriano es estimulado por productos extracelulares del alga (Bell y Mitchell, 1972).
- Gen 16S ARNr: Es una macromolécula de aproximadamente 1.500 nucleótidos, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariotas, es altamente conservado, presentando regiones comunes a todos los organismos. (Rodicio y Mendoza, 2003).
- Inóculo: Una pequeña cantidad de material celular tomada de un cultivo en suspensión, que se transfiere a un medio fresco para continuar su crecimiento en un cultivo (Zaid, *et al.*, 2004).
- *Isochrysis galbana*: Alga unicelular perteneciente a las Haptophytas, flagelada pequeña, con un volumen de $40\mu\text{m}^3$. Se cultivan como alimento para las diferentes etapas del cultivo en criaderos de moluscos de valor comercial (Helm *et al.*, 2006).
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano).
- Primer (Iniciador o cebador): Es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano).
- Secuenciación de ADN: Es una técnica de laboratorio utilizada para determinar la secuencia exacta de las bases (A, C, G y T) en una molécula de ADN. La secuencia de bases de ADN lleva la información que una célula necesita para ensamblar proteínas y moléculas de ARN (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano).

IV. INTRODUCCIÓN

En la última década la producción del molusco bivalvo concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), se ubicó regularmente como el primer recurso de producción acuícola del país con un récord en volumen de exportaciones de US\$ 160 millones en el 2013. Sin embargo las exportaciones fluctuaron fuertemente con disminuciones de la producción por mortalidades en los cultivos y escasez de semilla en el 2011 (-15%), 2012 (- 53%), 2014 (-18%) (PromPeru, 2015), 2015 (-51%) (Adex, 2015) y en el primer trimestre del 2016 se reporta solo US\$ 21.7 millones, aproximadamente la mitad de lo exportado el mismo periodo en el 2105 (Adex, 2016).

Las mortalidades han sido relacionadas al bloom algal, caídas de oxígeno y se sospecha eventos de virosis por un malacoherpesvirus (Diringer *et al.*, 2012), mientras que la escasez de semilla es reportada como el cuello de botella del cultivo de *A. purpuratus* (González, 2010). Para dar solución a dicha escasez, se implementó la producción de semilla en laboratorio. Los hatcheries tienen varias ventajas, siendo algunas de ellas, la posibilidad de cubrir el requerimiento de semillas de los moluscos bivalvos durante todo el año, la utilización de técnicas de mejoramiento genético y prevención de enfermedades.

Dentro del laboratorio, los cultivos de microalgas, son primordiales para el éxito de los cultivos larvarios de bivalvos, representan alrededor del 40% de los gastos de producción y del espacio total del hatchery, siendo su cantidad y calidad limitante en muchos casos (Uriarte *et al.*, 2002; Helm *et al.*, 2006). Además de ser costosos, también demandan una gran cantidad de tiempo y personal calificado, ya que es un procedimiento laborioso que se debe realizar con sumo cuidado y dedicación.

Al mismo tiempo, el cultivo de moluscos bivalvos en laboratorio es afectado frecuentemente por algunas enfermedades, sobre todo relacionadas con infecciones bacterianas. La principal fuente de entrada de bacterias al cultivo de moluscos, es a través de las microalgas. En consecuencia, es de suma importancia mantener el cultivo microalgal en las mejores condiciones posibles y de esta manera, asegurar la buena calidad de la semilla.

Sin embargo, en los sistemas de producción acuícola es imposible producir cultivos microalgales axénicos en grandes volúmenes, primero porque muchas cepas supuestamente axénicas, tienen bacterias que no son detectadas por los medios de cultivo estándares (bacterias no cultivables o co-cultivables), en segundo lugar, debido a la complejidad de esterilizar completamente todos los entrantes y finalmente, porque las células de microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano y viceversa (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003). Por ello, el alimento utilizado es en realidad una mezcla de microalgas y de una o más bacterias asociadas.

Las interacciones entre microalga-bacteria(s) pueden ser benéficas y mejorar la estabilidad, crecimiento, productividad, etc. o al contrario, antagónicas, bacterias compitiendo por los nutrientes y siendo capaces incluso de lisar las microalgas, provocando el colapso del cultivo (Amin *et al.*, 2012; Avendaño-Herrera *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 2005; Fukami *et al.*, 1997; Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

Es primordial, para los laboratorios, disponer de cepas de microalgas de calidad y estables para el éxito y rentabilidad del cultivo. Para ello, las nuevas tendencias son de crear un ecosistema equilibrado entre microalgas y bacterias benéficas. El primer paso para lograrlo es conocer la flora microbiana total asociada a la cepa de microalga cuando el cultivo este sano. Una vez identificadas, se determinarán que bacterias pueden ser utilizadas como probióticos, para mejorar la productividad del cultivo. La estabilidad del consorcio debe estar monitoreado para asegurarse de su sostenibilidad entre cada etapa de repicaje.

El objetivo principal de la presente investigación, fue aislar y caracterizar molecularmente cepas bacterianas asociadas a dos cultivos de microalgas, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. Como objetivo secundario, se quiso evaluar el efecto que dichas cepas ocasionaban al cultivo de microalgas, inoculándolas y realizando un conteo diario de la densidad para comprobar si aumentaba la producción.

V. REVISIÓN DE LA LITERATURA

V.1. Microalgas y bivalvos

Las microalgas son especies unicelulares que viven en ambientes continentales o marinos y que miden de pocas micras a milímetros. Deben poseer ciertos atributos para ser útiles en acuicultura, como el tamaño y forma de la célula, tasas de crecimiento rápidas, estabilidad del cultivo ante fluctuaciones de luz, temperatura y nutrientes, fácil ingestión y digestión, composición bioquímica y la ausencia de toxinas (Brown, 2002). Siendo las más utilizadas para el cultivo de moluscos bivalvos los flagelados: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* y las diatomeas: *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana* y *Skeletonema costatum* (Helm *et al.*, 2006).

La composición bioquímica puede variar según la fase del ciclo de cultivo en la que se encuentren. Durante la fase de crecimiento logarítmico, las microalgas contienen entre 30 - 40% de proteína, 10 - 20% de lípidos y 5 -15 % de carbohidratos (Brown *et al.*, 1997), sin embargo, cuando el cultivo se prolonga hasta la fase estacionaria, la composición proximal de las microalgas puede variar significativamente. Así mismo, mediante variaciones en los parámetros de cultivo como temperatura, exposición a la luz o cantidad de nutrientes en el medio, las proporciones de carbohidratos, lípidos y proteínas pueden ser manipuladas (Fábregas *et al.*, 2004; Renaud *et al.*, 2002). Por ejemplo cuando el nitrato es limitante, los niveles de carbohidratos pueden duplicarse a expensas de la proteína (Harrison *et al.*, 1990) y viceversa, cuando se le agrega más nitrógeno al medio de cultivo, el contenido de proteínas de las células se elevan casi en un 50%, lo que conlleva a un aumento en la cantidad de huevos de *Argopecten purpuratus* en el desove y mejora el crecimiento de las larvas y postlarvas hasta los 5 mm (Uriarte y Farías, 1999). Otra investigación interesante es la de De Castro y García (2005) en la que comprueban que el contenido de lípidos y carbohidratos de *Chaetoceros wighamii* fue más alto a temperaturas más bajas (20-25°C, respecto a 30°C); con la adición de CO₂, las proteínas aumentan y los carbohidratos disminuyen, y al contrario, se observó mejora de la cantidad de carbohidratos y disminución de lípidos y proteínas con una salinidad de 35 ppt (respecto a 25 ppt).

En cuanto a los aminoácidos, las microalgas marinas presentan los diez que se consideran esenciales para cubrir la demanda alimenticia de los bivalvos y están presentes en porcentajes muy similares entre las diferentes especies de algas (Brown 1997).

Las larvas en desarrollo tienen requerimientos nutricionales específicos como lo son los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs). Dentro de los HUFAs más importantes, se encuentran el ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) y el ácido eicosapentaneóico (EPA, 20:5n-3), por lo tanto, necesitan una mezcla de microalga que les proporcione ambos. Coutteau y Sorgeloos (1992) indican que *Isochrysis galbana* (clone *T-Iso*) y *Chaetoceros gracilis* son las especies más utilizadas en la nutrición de pectínidos, esto se debe a que de la primera especie se pueden obtener niveles altos de lípidos totales y de ácido docosahexanoico (DHA), mientras que *Chaetoceros gracilis* complementa los requerimientos con los niveles elevados de carbohidratos, ácido eicosapentanoico (EPA) y riboflavina (Brown, 2002; Farias y Uriarte, 2002). Por lo tanto, una combinación de dos o tres especies de microalgas altamente nutricionales, incluyendo una diatomea de tamaño adecuado y un flagelado, proporcionan mejores tasas de crecimiento y desarrollo larvario que las dietas de una sola especie (Aranda-Burgos *et al.*, 2014; Helm *et al.*, 2006).

Para apoyar esta idea, se han realizado diversos estudios, como el de Vivanco *et al.* (2014), quienes evaluaron el efecto de diferentes dietas de microalgas y dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia de larvas de almeja *Mulinia edulis*, obteniendo como resultado que la dieta con una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* fue la que generó la mayor supervivencia y mayor tasa de crecimiento del cultivo. Asimismo, Carreño *et al.* (2012), estudiaron la influencia de la dieta sobre el desarrollo larvario del pectínido *Argopecten nucleus*, utilizaron las especies de microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*, con tratamientos monoalgales y mezclas en relación 1:1. Las variables estudiadas fueron supervivencia, crecimiento, aparición de la mancha ocular y estado de condición (larvas llenas, semillenas y vacías). La dieta que comprendía la mezcla entre *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* fue la que obtuvo mejores resultados. Dichos resultados, concluyen los autores, se debe básicamente a que los nutrientes aportados por cada microalga se complementan.

V.2. Relaciones microalga-bacteria

Históricamente las bacterias han sido conocidas como contaminantes de los cultivos de microalgas, sin embargo, ahora se acepta que algunas bacterias también desempeñan un papel en la promoción del crecimiento de las algas, estableciendo interacciones que van desde el mutualismo hasta el parasitismo (Ramanan, 2016). Dichas interacciones se dan en la ficósfera, la cual se ha definido como «una zona que se extiende hacia afuera de una célula o colonia de algas, con una distancia indefinida, en la que el crecimiento bacteriano es estimulado por productos extracelulares del alga» (Bell y Mitchell, 1972). Es análoga a la rizósfera en los suelos y tiene implicaciones directas para los flujos de nutrientes desde y hacia las células algales (Amin *et al.*, 2012). En este espacio, las bacterias pueden vivir libremente alrededor de las microalgas e interactuar a través de los flujos metabólicos, en relación con el medio ambiente o en una asociación más estrecha con las células: bacterias epífitas, que se adhieren a la superficie de la microalga o bacterias endófitas, las cuales se desarrollan dentro de las células de las microalgas (Lupette *et al.*, 2016). Por ejemplo, se visualizó la adhesión directa de la bacteria *Citrobacter freundii* en la superficie de las células de microalgas *Pavlova viridis* (Figura 1) con el método de microscopía electrónica de barrido (SEM) cuando se realizó un co-cultivo, el cual mostró mayor crecimiento y una fase exponencial más larga que ambos cultivos individuales (Ahamed *et al.*, 2015).

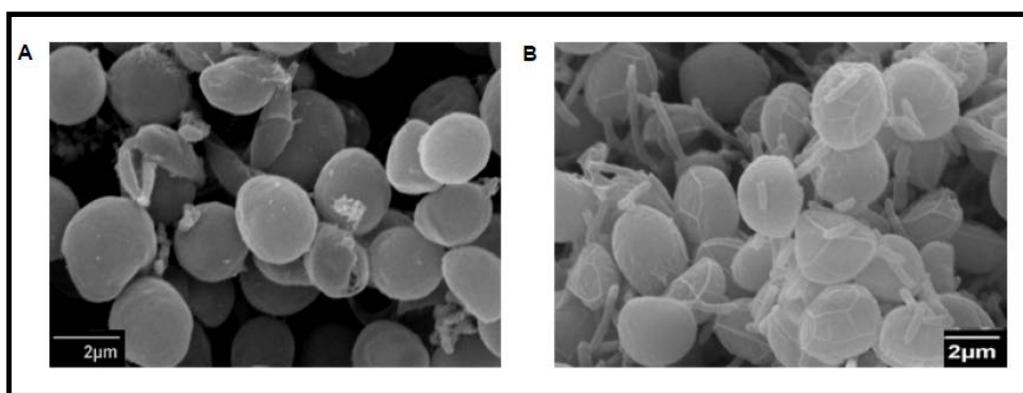


Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *Pavlova viridis* en cultivo puro (A) y en co-cultivo con la bacteria *Citrobacter freundii* (B) (Ahamed, *et al.*, 2015).

Las interacciones entre algas y bacterias se clasifican en intercambio de nutrientes y transducción de señales, siendo el primero el tipo más común (Kouzuma y Watanabe, 2015). Uno de los sustratos más importantes proporcionados por las algas autótrofas a las bacterias heterótrofas es el carbono orgánico disuelto (DOC), excretado como parte de las sustancias orgánicas fotosintetizadas (Amin, 2012). Se ha demostrado además que el carbono orgánico de la lisis celular de microalgas muertas y senescentes promueve el crecimiento bacteriano, así la densidad bacteriana es mayor en cultivos de algas en fase estacionaria en comparación con cultivos de fase exponencial, y es proporcional a la densidad de microalgas senescentes (Grossart *et al.*, 2005).

Otro elemento significativo es el nitrógeno, un ejemplo documentado, es la simbiosis entre diatomeas (*Hemiaulus*, *Rhizosolenia* y *Chaetoceros*) y cianobacterias diazótroficas (aquellas que convierten el nitrógeno gaseoso en formas biológicamente más disponibles, como el amoníaco), como *Richelia* y *Calothrix*, las cuales mostraron una tasa de fijación de N₂ entre 171-420 veces más al igual que una tasa de crecimiento mayor, cuando se cultivaron con las diatomeas respecto a cuándo se cultivaron solas. Los autores sugieren que las cianobacterias fijan nitrógeno en exceso y la mayoría es transferido a las diatomeas (Foster *et al.*, 2011).

El hierro es un micronutriente requerido por toda la vida en la Tierra, excepto por un grupo de bacterias *Lactobacillus* (Imbert y Blondeau, 1998), al ser un nutriente necesario para la fotosíntesis y la respiración. Se requiere hierro en porcentajes relativamente mayores que los demás metales de transición debido a su capacidad de catalizar reacciones redox, transferir electrones y unirse reversiblemente y así transportar ligandos tales como el O₂ (Amin *et al.*, 2012). Aunque las algas y las bacterias compiten a menudo por este nutriente, se conocen algunos casos de mutualismo. Muchas bacterias marinas sintetizan y excretan pequeños compuestos orgánicos llamados sideróforos, que se unen al ión férrico, aumentando su solubilidad. Una bacteria del género *Marinobacter*, asociada a dinoflagelados presenta un sideróforo funcional llamado Vibrioferrina (VF), el cual proporciona a las algas el hierro necesario para soportar la fijación fotosintética del carbono, este carbono fijo posteriormente ayuda al crecimiento y la reproducción tanto de las algas como de sus bacterias asociadas y finalmente se usa para sintetizar nuevamente el

sideróforo (Amin *et al.*, 2009). *Halomonas sp.*, se cultivaron con *Dunaliella bardawil*, las bacterias aumentaron la solubilidad del Fe, mejorando así la disponibilidad para las algas, como resultado, la tasa de crecimiento de algas aumentó (Keshtacher-Liebson, 1995).

Otro grupo importante de micronutrientes son las vitaminas B, que actúan como cofactores de las enzimas del metabolismo celular. A pesar de su estilo de vida fotosintético, de 306 microalgas estudiadas por Croft *et al.* (2006), más del 50% de las especies tienen un requisito obligatorio de una fuente exógena de vitamina B12 (Cobalamina) para el crecimiento, el 22% requieren vitamina B1 (Tiamina) y un 5% B7 (Biotina). Los autores manejan la hipótesis que dicha auxotrofía se deba a la pérdida de un gen implicado en la biosíntesis de ese cofactor. La cobalamina se requiere en organismos que carecen de la metionina sintasa independiente de cobalamina (MetE), como el alga roja *Porphyridium purpureum* y el dinoflagelado *Amphidinium operculatum*. Croft *et al.* (2005) demostraron que el dinoflagelado obtuvo exclusivamente la vitamina de bacterias pertenecientes al género *Halomonas* asociadas a ellos. Para confirmar si la bacteria era la responsable de suministrar B12, fue inoculada nuevamente a los cultivos de *Porphyridium purpureum* y *Amphidinium operculatum*. Los resultados para ambos casos fueron positivos. Debido a que el medio de estos co-cultivos no contenía una fuente de carbono orgánico, se presume que las bacterias usaban los productos de la fotosíntesis de algas para crecer. Una indicación adicional de la relación íntima se obtuvo cuando *Halomonas sp.* se cultivó en un medio con presencia y ausencia de fucoídina, un extracto de algas. El extracto aumentó la tasa de crecimiento bacteriano, y al mismo tiempo aumentó significativamente la cantidad de vitamina B12 producida.

La transducción de señales es otra forma de interacción entre algas y bacterias. En este caso, los productos químicos utilizados para sus interacciones no sirven como nutrientes sino que activan o inhiben la expresión génica y/o las actividades fisiológicas, modificando así su comportamiento y crecimiento. La transducción de señales entre las algas y las bacterias se clasifica como “Señalización Interkingdom” (Kouzuma y Watanabe, 2015).

La capacidad de muchas bacterias marinas para secretar autoinductores y de diatomeas para sintetizar y secretar moléculas como las feromonas, con funcionalidades similares, sugiere que estos tipos de compuestos podrían funcionar como señales bidireccionales entre las

diatomeas y las bacterias (Amin *et al.*, 2012). Las microalgas pueden interferir con la detección del *quorum* bacteriano, produciendo compuestos que pueden obstaculizar los receptores de señal bacterianos y/o los reguladores de respuesta (Natrah *et al.*, 2011a). Lumicromo, un derivado de la vitamina B2 (riboflavina) es producido por *Chlamydomonas reinhardtii* y tiene una actividad estimulante de detección de *quorum* (Teplitski *et al.*, 2004; Rajamani *et al.*, 2008). Por el contrario, Natrah *et al.* (2011b) informaron que la microalga *Chlorella saccharophila* y cinco microalgas marinas produjeron actividad inhibidora de detección de *quorum*; sin embargo, los compuestos activos aún no han sido identificados. En condiciones de estrés, el óxido nítrico liberado por las diatomeas a la ficósfera puede atraer bacterias carroñeras que detectan este óxido y atacan las células estresadas o moribundas; en condiciones sin estrés, el óxido nítrico liberado puede actuar como una señal para las bacterias sinérgicas (Amin *et al.*, 2012).

V.3. Bacterias cultivables asociadas a microalgas

Schwenk *et al.* (2014) obtuvieron 40 colonias aisladas a partir de los cultivos de microalgas de *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus*, *Isochrysis sp.*, y *Nitzschia microcephala* (10 de cada cepa), todas las colonias aisladas resultaron Gram negativas y fueron identificadas mediante análisis de secuencias del gen 16S rRNA y agrupadas en cuatro familias. En los cultivos de las microalgas *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* y *Nitzschia microcephala*, las familias de bacterias identificadas fueron Rhodobacteriaceae y Rhizobacteriaceae. En el cultivo de la microalga *Isochrysis sp.*, las principales familias de bacterias aisladas fueron Rhodobacteriaceae, Erythrobacteriaceae y en menor prevalencia Flavobacteraceae y Flexibacteraceae.

Las bacterias encontradas en *Nitzschia microcephala*: *Loktanella sp.* y *Agrobacterium sp.*, en *Isochrysis sp.*: *Flexibacter sp.*, *Rhodobacteraceae bacterium JAMALO110*, *Seohaecicola saemankumensis* SD-15, *Roseobacter sp.* y *Erythromicrobium sp.* B04. En *Chlorella pyrenoidosa*: *Agrobacterium vitis* M63038 y *Loktanella vestfoldensis* IMCC6033. En *Scenedesmus obliquus*: *Agrobacterium vitis* M63038, *Rhizobium sp.* W7 y *Loktanella vestfoldensis* IMCC6033.

Para identificar la microbiota presente en los cultivos de las microalgas: *Chaetoceros ceratosporum*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira sp.*, *Thalassiosira weissflogii*, *Amphora sp.*, *Navicula sp.* y *Tetraselmis suecica*, Hernández-Zulueta *et al.* (2011) aislaron un total de 70 bacterias. En todos los cultivos de microalgas se encontró una gran cantidad del género *Bacillus*, lo cual, explican los autores, podría deberse a que estas bacterias forman esporas y dicha estructura les brinda una mayor capacidad de adaptarse. Sugieren, además, que existe una microbiota específica para cada especie de microalga; por ejemplo, la microbiota del cultivo de *Chaetoceros muelleri* está conformada por siete géneros: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*; mientras que el cultivo de *Chaetoceros ceratosporum*, sólo consta de tres: *Aeromonas*, *Bacillus* y *Moraxella*; siendo las dos microalgas del mismo género, la única bacteria que comparten es *Bacillus subtilis*. Estos resultados son similares a los de Suminto e Hirayama (1996), quienes aislaron las bacterias presentes en un cultivo de *Chaetoceros gracilis* y obtuvieron los géneros *Flavobacterium*, *Coryneform*, *Alteromonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Moraxella* y *Bacillus*. Estos últimos resultados, a su vez, concuerdan con los alcanzados por Riquelme *et al.* (1988); Fukami *et al.* (1997), y Avendaño-Herrera y Riquelme (1999), quienes observaron que las bacterias *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Xanthomona sp.* son promotoras de crecimiento de algunas microalgas, como *Isochrysis galbana*, *Asterionella gracilis*, *Oscillatoria sp.* y *Nitzschia sp.* Por el contrario, Sakata (1990); Imai *et al.* (1991) y Fukami *et al.* (1992) demostraron que bacteria *Flavobacterium sp.* 5N-3, además de *Cytophaga sp.* y *Saprospira sp.*, presentaron actividad alguicida ante *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Chattonella antiqua* y *Chattonella marina*.

V.4. Cultivos de microalgas con bacterias

Suminto e Hirayama (1996), aislaron 12 cepas (7 géneros diferentes) de los tanques de cultivo masivos de *Chaetoceros gracilis* y evaluaron su inoculación en el cultivo axénico de la diatomea. Cepas del género *Moraxella*, *Alteromonas* y *Micrococcus* no tuvieron efecto aparente y la adición de las cepas de *Corineformes*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Vibrio* y *Micrococcus* afectó negativamente el cultivo. Únicamente la cepa *Flavobacterium* DN-10 promovió fuertemente el crecimiento de la diatomea, con una tasa de crecimiento 2.8 veces

mayor, respecto a los cultivos control. En estudios posteriores, los mismos autores probaron la cepa de *Flavobacterium* en cultivos de *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y nuevamente *Chaetoceros gracilis*; sin embargo, la bacteria no tuvo un claro efecto promotor en las dos primeras microalgas (Suminto e Hirayama, 1997).

Por otro lado, con respecto al cultivo de *Isochrysis galbana*, Parhuayo (2015) evaluó la capacidad inhibitoria de esta microalga sobre *Vibrio furnisii*, el cual es reportado como un patógeno en acuicultura. En el experimento se comprobó que la adición de *Vibrio furnisii*, incrementó ligeramente el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana*, obteniéndose una densidad celular máxima de 3.57×10^7 células/ml contra 1.41×10^7 células/ml del cultivo axénico. Otro experimento (Planas *et al*, 2015) muestra el efecto que tuvieron siete cepas de bacterias ácido lácticas de origen terrestre, sobre el cultivo de *Isochrysis galbana*, todas las bacterias mejoraron la tasa de crecimiento en un volumen de 100 ml, siendo las mejores *Leuconostoc mesenteroides spp. mesenteroides* y *Pediococcus acidilactici*. A continuación se probaron estas dos bacterias en un volumen de 4L, se separaron en dos grupos, con y sin nutrientes. En el grupo con nutrientes se obtuvieron 40 y 16% mayor densidad con la inoculación de cepas, respecto al control. En el grupo sin nutrientes, las densidades de *Isochrysis galbana* con inoculación de las bacterias fueron 3 veces más altas que el control.

Ahamed *et al.* (2015) aislaron cinco cepas bacterianas del cultivo de *Pavlova viridis*, para luego inocularlas y probar su efecto. El crecimiento de la microalga aumentó aproximadamente dos veces en comparación al control gracias a la inoculación de *Citrobacter freundii* y entre 0.5 y 1.5 veces para los cultivos con *Kocuria marina*, *Staphylococcus cohnii*, *Micrococcus yunnanensis* y *Staphylococcus haemolyticus*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de microalgas de la empresa Reproducción y Comercialización of Scallops Company S.A.C., ubicado en Sechura, Piura y en el laboratorio de Incabiotec S.A.C., ubicado en la región de Tumbes. Siendo uno de los componentes del proyecto Innovate PITEI-2-P-200-071-14: “Desarrollo de un paquete tecnológico para el abastecimiento de semillas de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) mediante el uso de bacterias nativas probióticas”.

VI.2. Materiales

VI.2.1. Material biológico

La materia prima empleada, fueron las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, utilizadas como parte de una producción comercial destinadas a alimentar cultivos larvarios de *Argopecten purpuratus* de la empresa Reproducción y Comercialización of Scallops Company S.A.C. Dichas microalgas fueron obtenidas del IMARPE (Instituto del Mar del Perú).

VI.2.2. Materiales de laboratorio

- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Probeta
- Micropipetas digitales de 0.5-10, 20-200, 100-1000 ul
- Puntas con filtro de 0.5-10, 20-200, 100-1000 ul
- Asas de Kolle
- Espátula de Drigalsky
- Tubos Eppendorf de 0.2 y 1.5 ml
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml y 2 L
- Gradillas par tubos de 0.2 ml y 1.5 ml
- Porta pipetas

VI.2.3. Reactivos Químicos

- Triptona Soja Agar (Scharlau)
- Triptona Soja Broth (Scharlau)
- Cloruro de Sodio (Panreac Applichem)
- Kit para tinción de Gram (Chemical)
- Kit de extracción de ADN (Incabiotec SAC)
- Kit de PCR (Incabiotec SAC)
- Primers 27F, 1492R, 518F y 800R
- Agarosa (Clever)
- TAE (Tris, Ácido acético glacial, EDTA)
- Azul de Bromofenol 6X-Promega
- Bromuro de etidio (Gen Lab)
- Agua destilada (Purísima)
- Nitrato de sodio
- Fosfato de sodio
- Metasilicato
- Cloruro férrico
- Vitaminas: Biotina, Tiamina, Cianocobalamina
- Metales traza: Molibdato de sodio, Sulfato de cobre, Sulfato de zinc, Cloruro de cobalto, Cloruro de manganeso
- Glicerol
- Alcohol 96°

VI.2.4. Equipos

- Refrigeradora -20 °C
- Balanza analítica digital
- Baño María
- Microscopio óptico
- Microscopio digital
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Centrífuga refrigerada
- Agitador Vortex
- Cámara electroforética
- Termociclador
- Trasiluminador
- Cámara de flujo
- Autoclave
- Bomba de vacío
- Cámara de Neubauer

VI.3. Metodología

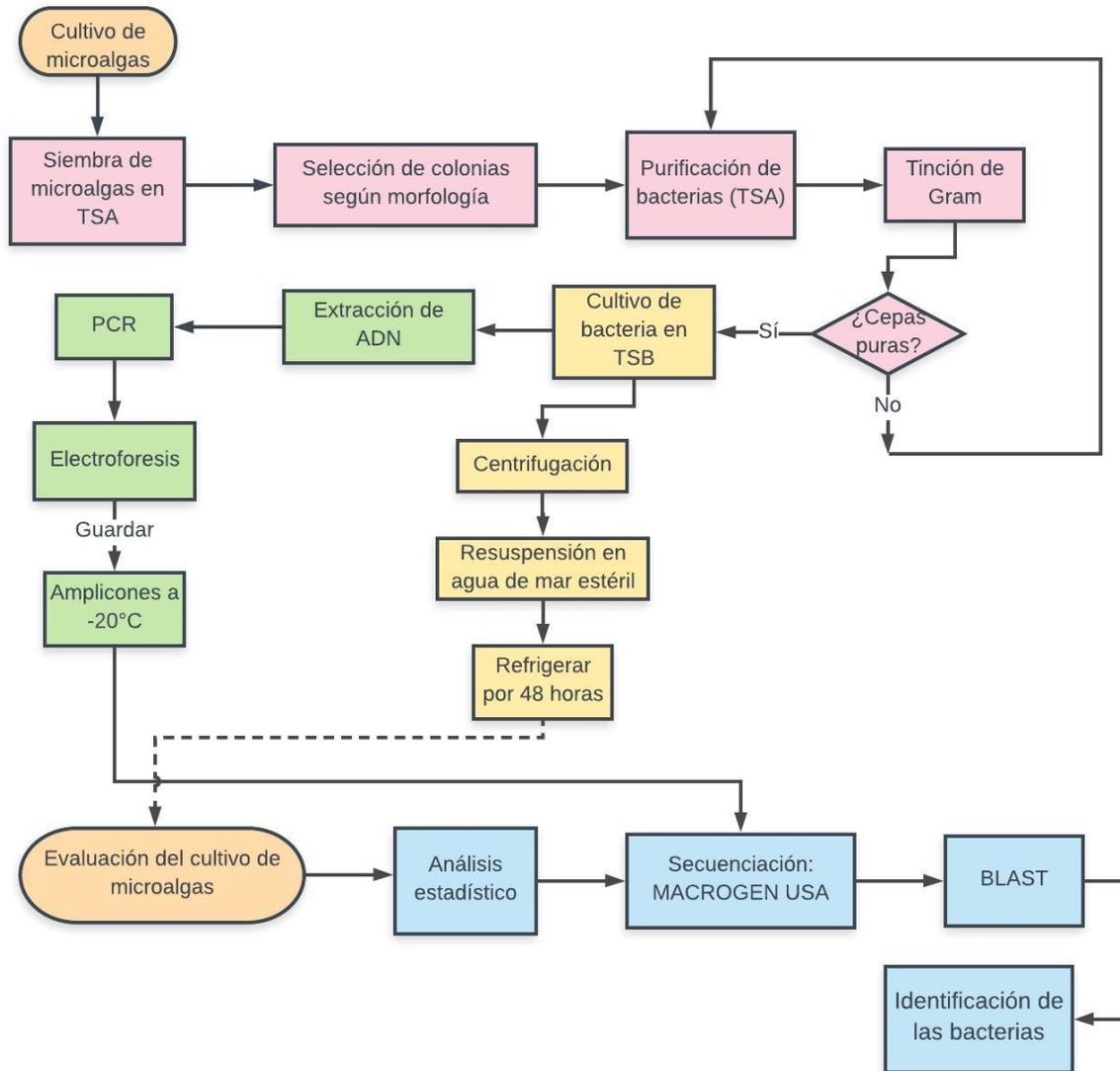


Figura 2: Esquema general de la metodología empleada.

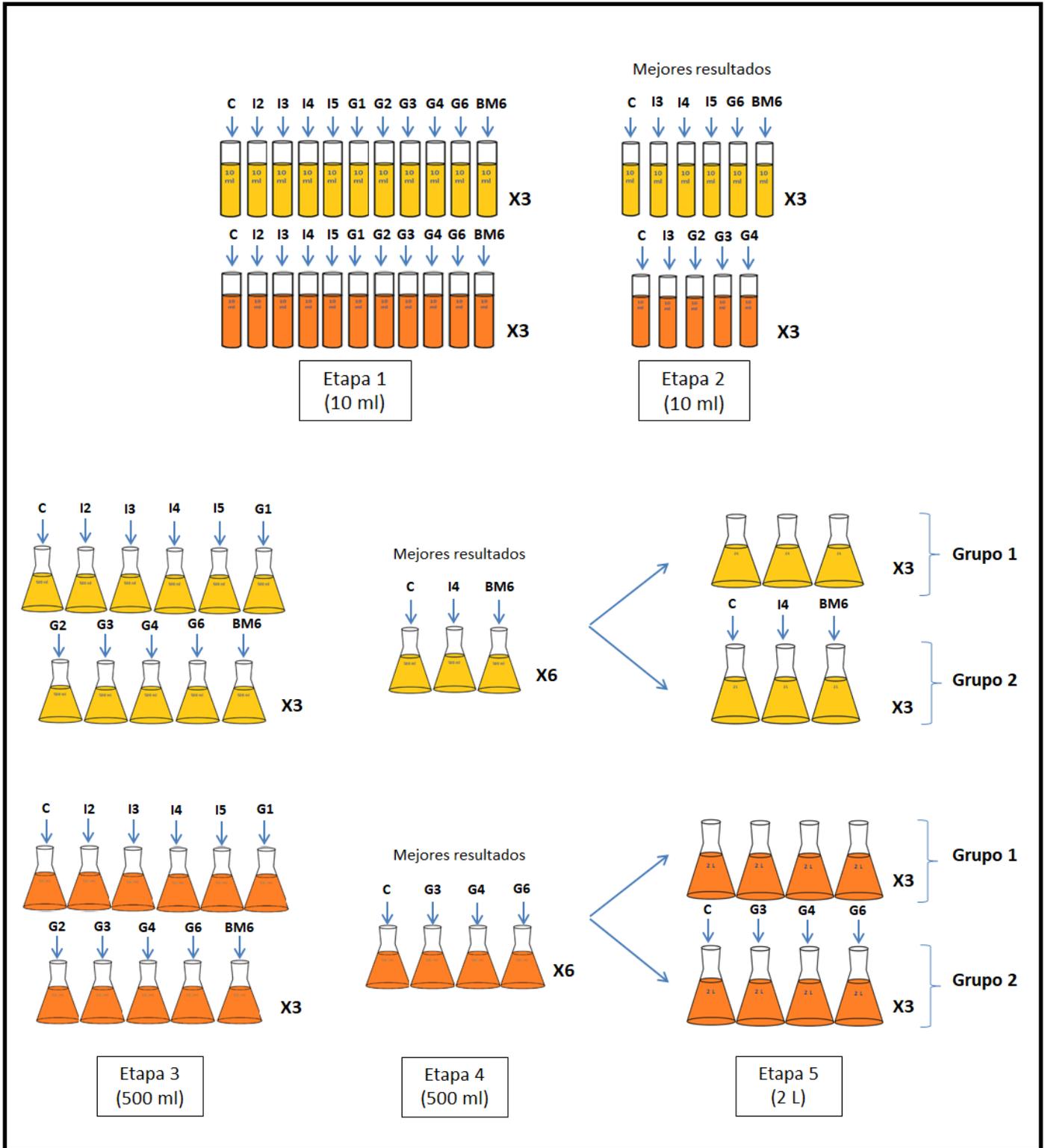


Figura 3: Esquema de la evaluación del crecimiento de microalgas. El color amarillo representa la microalga *Isochrysis galbana* y el color naranja la microalga *Chaetoceros gracilis*.

VI.3.1. Aislamiento de bacterias cultivables

El cultivo de microalgas se realizó en tubos de ensayo con 9 ml del medio de cultivo Guillard F/2 y 1 ml de cada una de las cepas, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, por separado. Para el óptimo crecimiento, los tubos se mantuvieron a 18 °C y con una luz artificial fluorescente de 40 watts.

Se prepararon placas Petri con Triptona Soja Agar (TSA) con 2% de sal. Se realizaron tres diluciones del cultivo de microalgas y se sembraron por esparcido 20 µl de cada una de las cepas en cada placa, por duplicado. Se dejaron crecer las bacterias en una incubadora a 37°C por 24 horas. Se observaron las colonias y se seleccionaron según sus diferencias morfológicas. Cada colonia fue transferida a una nueva placa con TSA y 2% de sal, sembradas por el método de rayado en placa. Este procedimiento se repitió hasta obtener cepas puras. Una vez terminada la purificación, se sembraron las colonias de bacterias en medio líquido, Triptona Soja Broth (TSB) y se dejaron crecer por 24 horas. Una vez crecidas, se realizó una tinción de Gram para determinar si eran Gram positivas o Gram negativas y para corroborar si las cepas estaban realmente puras. Se prepararon duplicados de cada bacteria pura en TSB con 10% de glicerol y se guardaron a -20°C para su posterior uso.

VI.3.2. Extracción de ADN bacteriano

Se tomó 1 ml de cada cepa pura y se centrifugó para obtener el ADN del cultivo bacteriano. El buffer de lisis utilizado fue la solución CTAB (Tris HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %), complementado con proteinasa K (0.2 mmol/mL). Luego se realizó el tratamiento con RNAasa (0.4 mg/mL) a 55 °C por 10 minutos. El proceso de purificación fue con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1, respectivamente. Para el paso de la precipitación de ADN se utilizó etanol al 96% con un lavado posterior en etanol al 75 %. Finalmente, el pellet de ADN fue resuspendido en 30 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y conservado a -20 °C. (Modificado de Wilson, 2001).

VI.3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Al ADN extraído se le aplicó la técnica de PCR, dirigida al gen 16S ARNr. Para esta prueba se utilizaron 20 pmol de los iniciadores universales 27F (5'-AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG-3) - 1492R (GGYTACCTTGTTACGACTT) que generan amplicones de un tamaño esperado de 1500 pb. El mix de PCR utilizado, con un volumen final de 25 µL, consistió en 2.5 µL buffer 10 X, 2.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.6 µL de dNTP 10 mM y 2 U de Taq DNA polymerase (Thermo scientific) y agua ultra pura. Las condiciones utilizadas para la PCR fueron, una temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de 58°C por 45 segundos, una temperatura de elongación de 72°C por 1 minuto y 30 segundos y una elongación final de 72°C por 6 minutos. (Innis *et al.*, 1999). Se guardaron los amplicones a -20°C.

Además de las muestras de ADN bacteriano, se colocaron, un control de extracción, un control de PCR y un control positivo, para asegurar que las pruebas se realizaron correctamente.

VI.3.4. Electroforesis

Para observar los resultados de la amplificación por PCR, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal. Se preparó un gel de agarosa al 1.5% de concentración, añadiendo 3µl de bromuro de etidio para 60ml del gel. Por cada pocillo en el gel se colocó 8µl de la muestra (amplicones de PCR diluídos 1:20) y 2µl de tampón de depósito. Se migraron los amplicones a un voltaje de 70 voltios por 30 minutos. Se observó el resultado en el transluminador (Fierro, 2014).

VI.3.5. Preparación de las bacterias

Se reactivaron los 10 cultivos bacterianos guardados en TSB con glicerol a -20°C y se dejaron crecer por 24 horas a 37°C. Se tomó 1 ml del cultivo de cada bacteria y se

centrifugó a 12 000 g por un periodo de 10 minutos, se retiró el sobrenadante para eliminar el caldo TSB que podría interferir en el cultivo de microalgas y se resuspendió en agua de mar estéril a 30 ppt. La resuspensión se mantuvo refrigerada por 48 h. Se midió el OD y se hicieron los cálculos respectivos para obtener 8×10^4 cel/ml de cada bacteria en el volumen final correspondiente. Para esto se asumió que $1 \text{ OD} = 8 \times 10^8$ cel/ml. (<https://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>)

VI.3.6. Evaluación del crecimiento de microalgas

Se evaluó el crecimiento del cultivo de ambas microalgas en presencia de cada una de las 10 cepas bacterianas resuspendidas, durante cinco etapas. Las pruebas se realizaron por triplicado (con excepción de la etapa 4, donde fue sextuplicado) y con las mismas condiciones de salinidad (30 ppt), luz (40 watts) y temperatura (18°C). Se tomaron muestras diarias con pipetas Pasteur de vidrio estéril y se contaron las células de microalgas con una cámara de Neubauer, en un microscopio.

Etapa 1: El cultivo se realizó en un volumen de 10 ml, inoculando las 10 bacterias por separado en cada una de las dos microalgas. Las densidades iniciales de la microalgas fueron 2.5×10^5 y 1.5×10^5 cel/ml para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, respectivamente.

Etapa 2: Se eligieron los tratamientos con mejor crecimiento para cada una de las microalgas de la etapa 1 y se volvieron a probar en un volumen de 10 ml. Las densidades iniciales de la microalgas fueron 3×10^5 y 4×10^5 cel/ml para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, respectivamente.

Etapa 3: El cultivo se realizó en un volumen de 500 ml, con aireación constante, probándose las 10 bacterias por separado en cada una de las dos microalgas. Las densidades iniciales de la microalgas fueron 6×10^5 y 9×10^5 cel/ml para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, respectivamente.

Etapa 4: Se eligieron los tratamientos con mejor crecimiento de cada una de las microalgas en la etapa 3 y se probaron nuevamente en un volumen de 500 ml, con aireación constante.

La densidad inicial para las dos microalgas fue 1×10^6 cel/ml. Esta etapa se realizó por sextuplicado, para poder continuar en la etapa 5. En esta etapa no se pudo registrar el conteo del día 1 para ninguna de las dos microalgas.

Etapa 5: Se traspasaron todos los matraces de la etapa 4 a un volumen de 2L, con una densidad inicial de 1×10^6 cel/ml, para cada microalga. Las 6 repeticiones de cada tratamiento, se separaron en dos grupos, al primer grupo no se le agregó nada y al segundo grupo se le inoculó 8×10^4 cel/ml más de la bacteria correspondiente (re-inoculación). El objetivo en esta etapa era comprobar si las bacterias inoculadas en la etapa 4 seguían mejorando el crecimiento luego del traspase o era necesario agregar más bacteria.

VI.3.7. Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto del crecimiento de las microalgas en presencia de las bacterias seleccionadas se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). En los experimentos donde se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey para comprobar cuál de los tratamientos era mejor. Se utilizó el programa R studio.

VI.3.8. Secuenciación y análisis

Se alicuotaron 15 μ l de los amplicones pertenecientes a las cinco cepas bacterianas que mostraron diferencias significativas positivas en la producción de las microalgas, respecto al control. Se enviaron a secuenciar a MACROGEN USA. Las secuencias de ADN obtenidas fueron alineadas y comparadas con una base de datos, empleando el software online BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Aislamiento de las bacterias cultivables

Se aislaron y purificaron un total de 10 bacterias asociadas a los dos cultivos de microalgas, cuatro cepas bacterianas de la microalga *Isochrysis galbana*: I2, I3, I4, I5, y seis cepas de *Chaetoceros gracilis*: G1, G2, G3, G4, G6 y BM6. En el Cuadro 1 se describe la morfología de las colonias de cada una de las cepas y los resultados de la tinción de Gram se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 1: Morfología de las colonias de bacterias cultivables aisladas de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

BACTERIA	MORFOLOGÍA DE LA COLONIA
I2	Mediana, redonda, rosada
I3	Pequeña, redonda, crema
I4	Mediana, redonda, crema
I5	Pequeña, redonda, blanca
G1	Pequeña, redonda, transparente
G2	Mediana, redonda, crema
G3	Pequeña, redonda, transparente
G4	Pequeña, redonda, blanca
G6	Mediana, redonda, rosada
BM6	Grande, redonda, crema

Cuadro 2. Tinción de Gram de las bacterias cultivables aisladas de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

BACTERIA	TINCIÓN DE GRAM	
I2	Cocos grandes	Gram negativo
I3	Cocobacilos	Gram negativo
I4	Cocobacilos	Gram positivo
I5	Cocobacilos	Gram negativo
G1	Cocobacilos	Gram negativo
G2	Cocos agrupados	Gram negativo
G3	Bacilos	Gram negativo
G4	Cocobacilos	Gram positivo
G6	Cocos grandes	Gram positivo
BM6	Bacilos	Gram positivo

VII.2. Preparación de las bacterias

En evaluaciones preliminares a los resultados presentados en esta tesis, las bacterias eran inoculadas directamente con su medio de cultivo (TSB). Sin embargo, al ser las diferencias de crecimiento con los controles no significativas, se optó por centrifugar los cultivos bacterianos, eliminando el medio TSB, para luego resuspender las bacterias en agua de mar estéril (Planas *et al.*, 2015), descartando así la posibilidad de que otras bacterias puedan beneficiarse con la adición del TSB al medio de cultivo.

VII.3. Evaluación del crecimiento de microalgas

Etapa 1 y 2

Para la etapa 1 con *Isochrysis galbana*, fueron las cepas bacterianas I3, I4, I5, G6 y BM6 las que tuvieron entre 25% y 40% de mayor crecimiento que el cultivo control, en el tercer día (Cuadro 3). Al probar nuevamente esas 5 bacterias en la etapa 2, la I4 y la G6 mostraron el mayor porcentaje de crecimiento, con 36 y 34%, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 3: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Isochrysis galbana* en la etapa 1 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	250,000	400,000	883,333	1,533,333	1,783,333
I2	250,000	516,667	983,333	1,533,333	2,133,333
I3	250,000	516,667	1,050,000	2,016,667	2,133,333
I4	250,000	450,000	1,000,000	1,933,333	2,000,000
I5	250,000	400,000	933,333	2,050,000	2,116,667
G1	250,000	333,333	1,233,333	1,900,000	2,116,667
G2	250,000	300,000	1,250,000	1,866,667	2,016,667
G3	250,000	583,333	1,300,000	1,816,667	2,000,000
G4	250,000	400,000	1,033,333	1,583,333	1,850,000
G6	250,000	550,000	1,200,000	2,133,333	2,150,000
BM6	250,000	366,667	1,183,333	2,150,000	2,200,000

Cuadro 4: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Isochrysis galbana* en la etapa 2 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Control	300,000	516,667	1,466,667	1,783,333
I3	300,000	400,000	1,216,667	1,833,333
I4	300,000	416,667	1,350,000	2,416,667
I5	300,000	450,000	983,333	1,883,333
G6	300,000	366,667	933,333	2,383,333
BM6	300,000	466,667	1,050,000	2,016,667

Para *Chaetoceros gracilis*, en la etapa 1, el mayor aumento se mostró en el segundo día, con la inoculación de las bacterias G3 (51%), G4 (42%), I3 (39%) y G2 (36%) (Cuadro 5). En la etapa 2 para esta microalga, no hubo mucha diferencia positiva en el crecimiento de los tratamientos respecto al control (Cuadro 6).

Cuadro 5: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Chaetoceros gracilis* en la etapa 1 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	150,000	833,333	1,283,333	1,800,000	2,000,000
I2	150,000	516,667	1,200,000	1,950,000	2,033,333
I3	150,000	1,016,667	1,783,333	1,850,000	1,600,000
I4	150,000	750,000	1,700,000	1,750,000	1,900,000
I5	150,000	1,200,000	1,500,000	1,733,333	1,666,667
G1	150,000	1,083,333	1,316,667	1,500,000	1,800,000
G2	150,000	633,333	1,750,000	1,583,333	2,150,000
G3	150,000	1,600,000	1,933,333	1,900,000	1,983,333
G4	150,000	583,333	1,816,667	2,033,333	2,450,000
G6	150,000	483,333	1,400,000	1,833,333	1,633,333
BM6	150,000	783,333	1,033,333	1,350,000	1,516,667

Cuadro 6: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Chaetoceros gracilis* en la etapa 2 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Control	400,000	850,000	2,633,333	3,050,000
G2	400,000	1,000,000	2,450,000	3,066,667
G3	400,000	1,200,000	2,483,333	3,250,000
G4	400,000	816,667	2,550,000	3,000,000
BM6	400,000	1,150,000	2,333,333	2,300,000

Luego de estos primeros resultados, se prosiguió a probar nuevamente las mismas bacterias en ambas microalgas, pero esta vez en mayor volumen (500 ml) y con aireación constante, comprobando que los resultados seguían una tendencia similar respecto a las primeras etapas.

Etapa 3 y 4

Isochrysis galbana tuvo un aumento del 31% con la inoculación de la bacteria BM6 y 18% con I4, en el día 3 de la tercera etapa (Cuadro 7). En la etapa 4, se probaron las dos bacterias nuevamente, consiguiendo un 38% y 30% de crecimiento con I4 y BM6, respectivamente, al tercer día de cultivo (Cuadro 8).

Cuadro 7: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Isochrysis galbana* en la etapa 3 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	600,000	1,200,000	2,333,333	3,550,000	6,983,333
I2	600,000	1,083,333	2,400,000	3,000,000	5,416,667
I3	600,000	683,333	1,516,667	4,066,667	5,800,000
I4	600,000	1,250,000	2,283,333	4,200,000	6,650,000
I5	600,000	1,116,667	2,433,333	3,783,333	4,600,000
G1	600,000	766,667	1,833,333	3,133,333	4,783,333
G2	600,000	916,667	1,550,000	2,350,000	3,083,333
G3	600,000	833,333	1,700,000	2,516,667	3,616,667
G4	600,000	866,667	2,433,333	4,016,667	5,350,000
G6	600,000	666,667	2,033,333	3,383,333	4,583,333
BM6	600,000	1,016,667	2,633,333	4,650,000	8,833,333

Cuadro 8: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Isochrysis galbana* en la etapa 4 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	1,000,000	-	3,150,000	6,233,333	8,850,000
I4	1,000,000	-	3,566,667	8,616,667	11,450,000
BM6	1,000,000	-	3,950,000	8,100,000	10,600,000

-: No se realizó conteo.

El cultivo de *Chaetoceros gracilis* alcanzó 48% más densidad respecto al control, con la adición de la cepa bacteriana G6, en el segundo día de la etapa 3. Mientras que el tratamiento con la bacteria G3 mostró un aumento del 34%, 32% y 31% entre los días 2 y 4. En el día 4, en el tratamiento con G4, se observó 33% mayor crecimiento (Cuadro 9). Al

repetir los mejores tratamientos, en la etapa 4, las mayores diferencias se encontraron en el segundo día, G6 con 34% G4 25% y G3 24%, más que el tratamiento control (Cuadro 10). En la Figura 4 podemos observar el cultivo mixto de microalgas y bacterias.

Cuadro 9: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Chaetoceros gracilis* en la etapa 3 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	900,000	3,050,000	5,350,000	7,733,333	9,166,667
I2	900,000	3,066,667	5,833,333	7,916,667	11,066,667
I3	900,000	2,933,333	5,783,333	6,483,333	9,300,000
I4	900,000	2,650,000	6,050,000	8,000,000	9,216,667
I5	900,000	2,833,333	6,483,333	8,383,333	10,516,667
G1	900,000	2,716,667	6,350,000	7,433,333	8,700,000
G2	900,000	2,800,000	7,316,667	9,500,000	10,250,000
G3	900,000	2,116,667	7,166,667	10,200,000	12,033,333
G4	900,000	3,283,333	6,866,667	9,350,000	12,233,333
G6	900,000	3,233,333	7,900,000	8,983,333	10,700,000
BM6	900,000	3,066,667	6,200,000	7,750,000	9,616,667

Cuadro 10: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Chaetoceros gracilis* en la etapa 4 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control ^b	1,000,000	-	4,166,667	5,350,000	6,733,333
G3 ^a	1,000,000	-	5,191,667	6,250,000	7,550,000
G4 ^a	1,000,000	-	5,175,000	6,725,000	8,416,667
G6 ^a	1,000,000	-	5,600,000	6,808,333	7,691,667

-: No se realizó conteo.

Las letras a y b representan la agrupación de la prueba de Tukey. Letras desiguales son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$).

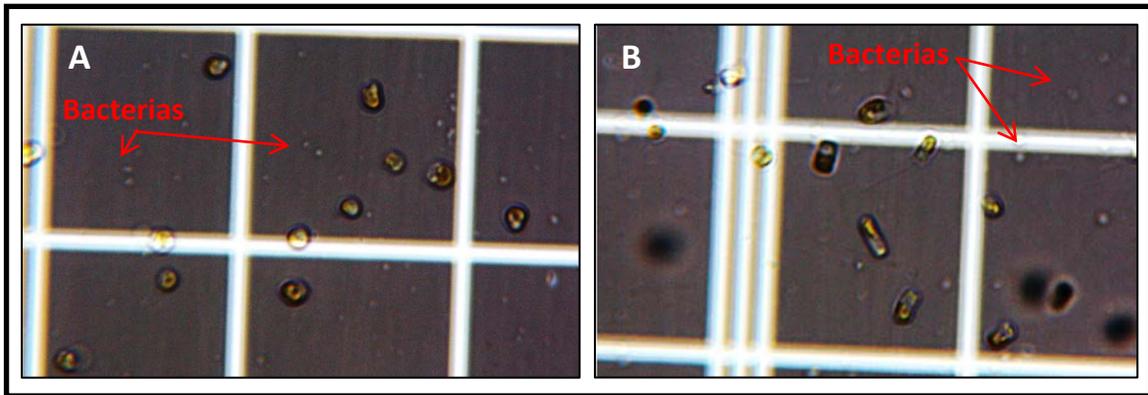


Figura 4: Cultivos mixtos de microalgas y bacterias. Observado con un microscopio digital PentaView LCD (Celestron) a 40X. A) Cultivo de *Isochrysis galbana*, inoculado con la bacteria BM6. B) Cultivo de *Chaetoceros gracilis*, inoculado con la bacteria G6.

Etapa 5

Los resultados de estas pruebas mostraron que, si bien podía mantenerse el efecto de mejora en algunos casos, el porcentaje de crecimiento era mayor cuando se realizaba una segunda inoculación. En el tratamiento con G4 observamos que, al tercer día, el crecimiento de *Chaetoceros gracilis* fue del 18% en el primer grupo (G4.1, sin nueva inoculación de bacteria) mientras que el segundo grupo (G4.2, con nueva inoculación de bacteria) alcanzó un 52% más respecto al control. Para los tratamientos con G3 los valores fueron de 20% y 47%, así mismo, para el tratamiento con G6 se obtuvo 26% y 47% (Cuadro 11). En la figura 5 podemos observar los matraces con los diferentes tratamientos en el último día de cultivo, de las etapa 4 y 5. Y en la figura 6, la curva de crecimiento correspondiente a ambas etapas.

Cuadro 11: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Chaetoceros gracilis* en la etapa 5 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control ^d	1,000,000	1,416,667	2,716,667	3,383,333	3,966,667
G3.1 ^{cd}	1,000,000	1,383,333	2,900,000	4,066,667	4,450,000
G3.2 ^{abc}	1,000,000	1,533,333	3,683,333	4,966,667	4,466,667
G4.1 ^{cd}	1,000,000	1,583,333	2,850,000	3,983,333	4,250,000
G4.2 ^a	1,000,000	1,866,667	3,733,333	5,150,000	4,933,333
G6.1 ^{bcd}	1,000,000	1,583,333	3,333,333	4,266,667	4,200,000
G6.2 ^{ab}	1,000,000	1,900,000	4,100,000	4,983,333	4,533,333

Grupo 1: Sin nueva inoculación de bacterias

Grupo 2: Con nueva inoculación de bacteria

Las letras a, b, c y d representan la agrupación de la prueba de Tukey. Letras desiguales son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$).

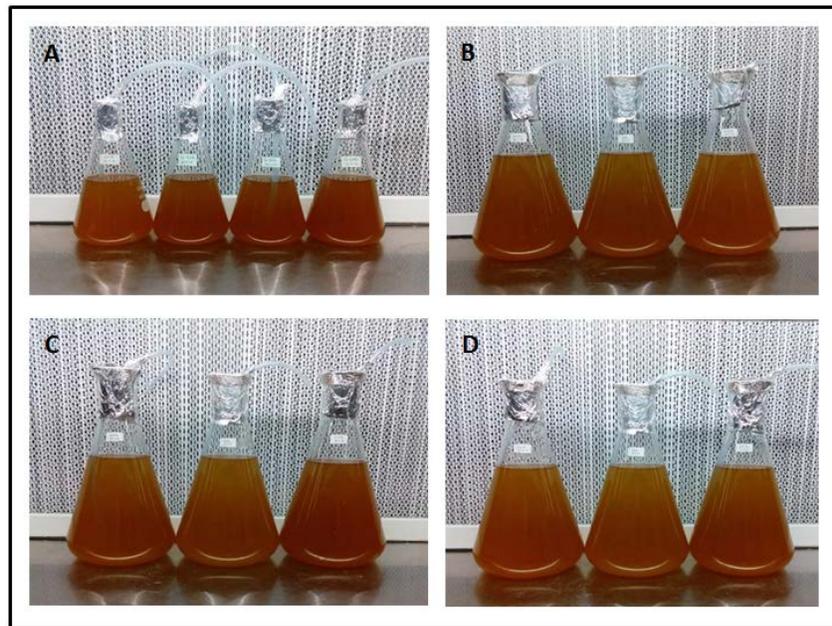


Figura 5: Cultivo de *Chaetoceros gracilis*. A) Etapa 4: Control, G3, G4 y G6. B) Etapa 5: G3.1, Control y G3.2. C) Etapa 5: G4.1, Control y G4.2. D) Etapa5: G6.1, Control y G6.2.

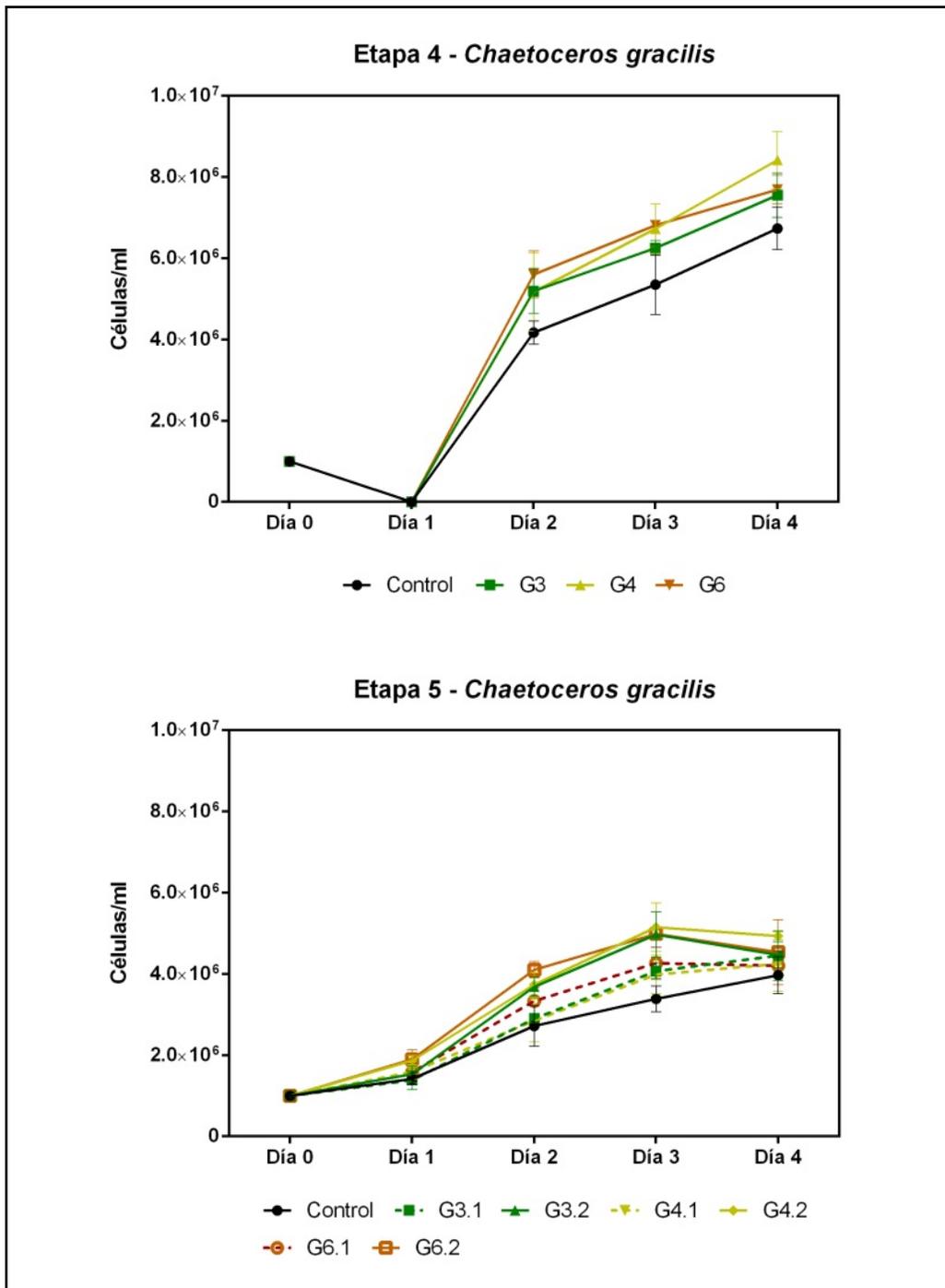


Figura 6: Curva de crecimiento del cultivo de *Chaetoceros gracilis* en las etapas 4 y 5 (El día 1 de la etapa 4 no se realizó conteo).

Para el caso de *Isochrysis galbana* (Cuadro 12), los resultados fueron similares, 17% y 45% en el tratamiento con la bacteria I4 y 14% y 31% con BM6, para el primer y segundo grupo, respectivamente. En las figuras 7 y 8 se presentan los matraces con los tratamientos realizados y la curva de crecimiento, respectivamente, para la etapa 5.

El crecimiento del cultivo de *Isochrysis galbana* ha sido estimulado anteriormente por bacterias ácido lácticas de origen terrestre, las siete cepas probadas lograron incrementar la densidad, obteniendo hasta 40% más, respecto al control, con la cepa *Leuconostoc mesenteroides spp. mesenteroides* (Planas *et al.*, 2015). Otra cepa con actividad promotora hacia *Isochrysis galbana* es *Vibrio sp. C33*, la cual fue aislada del agua de cultivo larval de *Argopecten purpuratus*, e inoculada en el cultivo axénico de la microalga, alcanzando 46% mayor densidad que la obtenida con el control (Avendaño y Riquelme, 1999).

Cuadro 12: Conteo diario de la densidad (en cel/ml) de *Isochrysis galbana* en la etapa 5 (Los cuadros sombreados corresponden a resultados superiores al 15% con respecto al control).

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control ^c	1,000,000	2,100,000	3,750,000	5,900,000	8,150,000
I4.1 ^{bc}	1,000,000	1,700,000	3,483,333	6,883,333	9,716,667
I4.2 ^a	1,000,000	2,316,667	4,633,333	8,583,333	10,450,000
BM6.1 ^{bc}	1,000,000	2,133,333	4,483,333	6,700,000	8,416,667
BM6.2 ^a	1,000,000	2,183,333	4,800,000	7,700,000	8,766,667

Grupo 1: Sin nueva inoculación de bacterias

Grupo 2: Con nueva inoculación de bacteria

Las letras a, b y c representan la agrupación de la prueba de Tukey. Letras desiguales son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$).

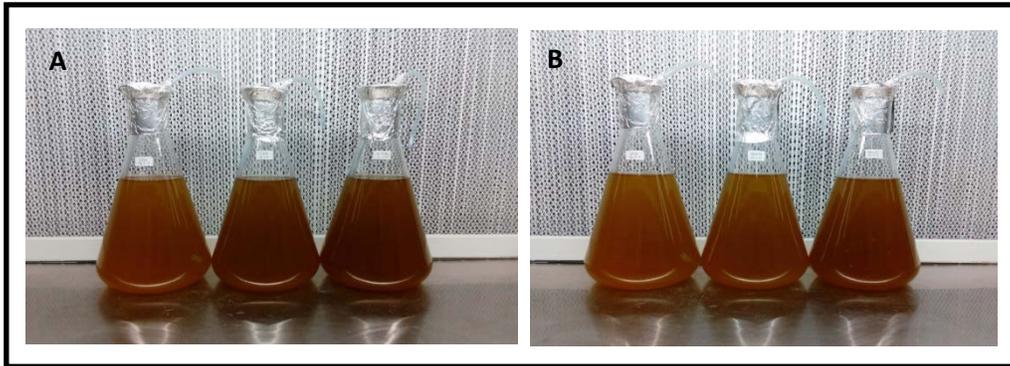


Figura 7: Cultivo de *Isochrysis galbana*. A) Etapa 5: Control, I4.1 e I4.2. B) Etapa 5: BM6.1, Control y BM6.2.

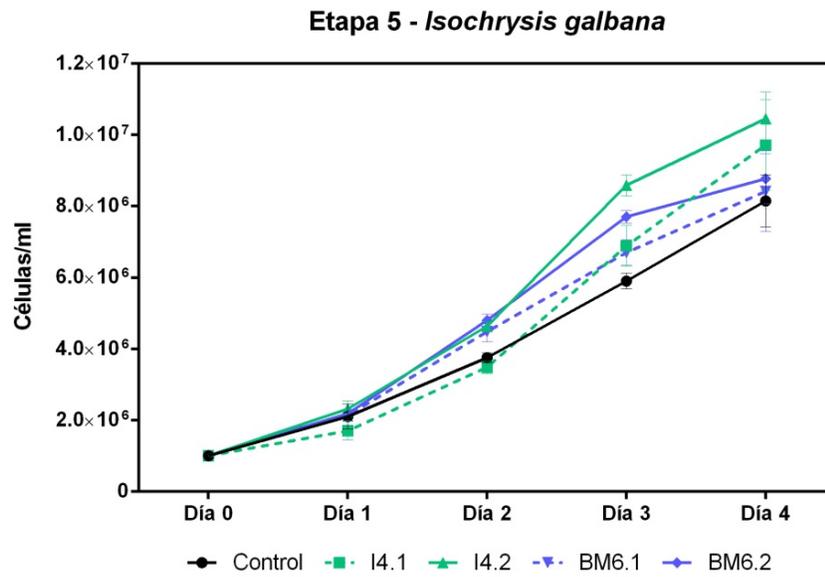


Figura 8: Curva de crecimiento del cultivo de *Isochrysis galbana* en la etapa 5.

VII.4. Electroforesis en gel de agarosa

En la figura 9 podemos observar las bandas (fragmentos de ADN) correspondientes a cada uno de los amplicones, alineados en 1500 pb. No se observaron bandas en el control de extracción y el control negativo, con lo que se comprueba que la extracción y amplificación de ADN por PCR de las muestras fueron correctas.

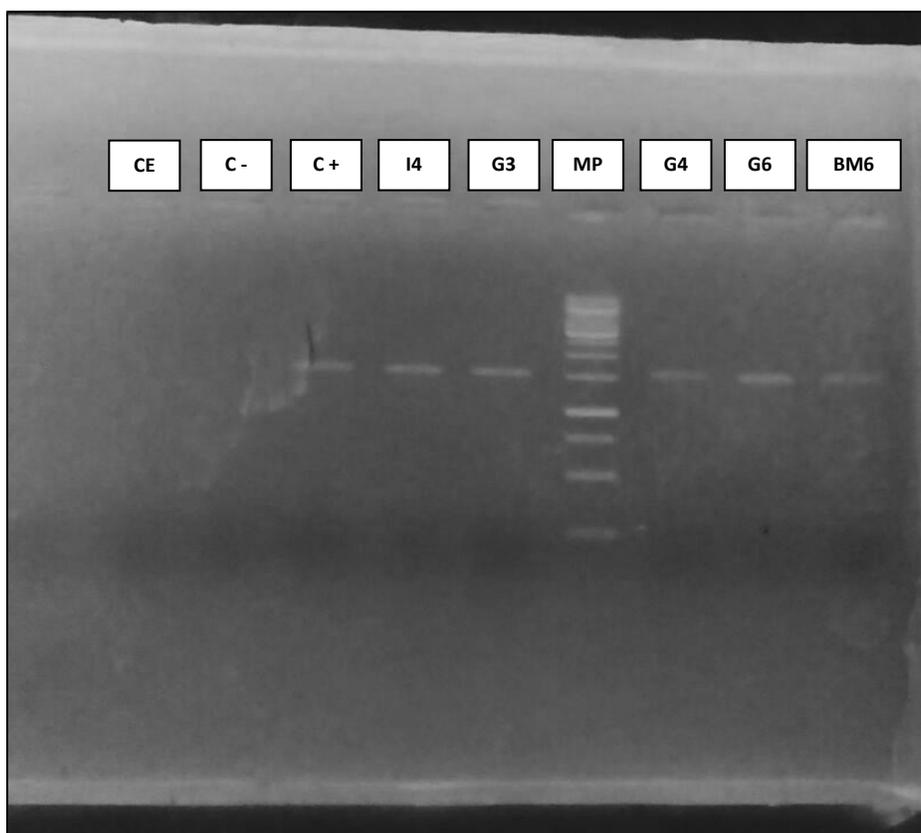


Figura 9: Gel de electroforesis. CE: Control de extracción, C-: Control de PCR, C+: Control positivo, MP: Marcador de peso.

VII.5. Secuenciación y análisis

La caracterización molecular mediante el análisis del gen 16S ARNr, permitió identificar las cinco cepas que demostraron mejorar el crecimiento de las microalgas cuando fueron inoculadas; una cepa aislada de *Isochrysis galbana* (I4) y 4 provenientes de *Chaetoceros gracilis* (G3, G4, G6 y BM6). Las secuencias obtenidas fueron comparadas en el software BLAST (Anexo 1). Las secuencias de ADN de I4 y G4 mostraron 99% de identidad con dos cepas de *Lysinibacillus fusiformis* (KY910256.1 y MG650805.1). Mientras que las cepas G3, G6 y BM6 obtuvieron un 99%, 100% y 100% de identidad con *Psychrobacter celer* (KP640590.1), *Staphylococcus saprophyticus* (MF776606.1) y *Bacillus cereus* (CP023245.1), respectivamente. Sólo se tomará en cuenta a nivel de especie aquellas secuencias que obtuvieron 100% de identidad.

Se aislaron dos cepas de *Lysinibacillus sp.*, I4 fue hallada en *Isochrysis galbana* y G4 en *Chaetoceros gracilis*. A pesar de pertenecer al mismo género, cada cepa sólo tuvo un efecto promotor del crecimiento en la microalga original a la que fue asociada y no para la otra, lo que confirma que las relaciones entre microalga y bacteria son específicas (Amin *et al.*, 2012; Fukami *et al.*, 1997; Hernández-Zuloeta *et al.*, 2011; Kouzuma y Watanabe, 2015). Debido a esta alta especificidad microalga-bacteria, es poco probable que las bacterias aisladas en este trabajo promuevan el crecimiento de otras microalgas, como lo demostraron experimentalmente Suminto e Hirayama (1996), quienes aislaron una cepa de *Flavobacterium sp.* a partir de un tanque de cultivo masivo de *Chaetoceros gracilis*, la cual mostró un efecto positivo únicamente sobre el crecimiento de cultivos axénicos de *Chaetoceros gracilis*, pero no de las flageladas *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri* (Suminto e Hirayama, 1997).

La cepa *Psychrobacter sp.*, aislada de *Chaetoceros gracilis*, pertenece a la familia γ -*Proteobacteria*, este resultado concuerda con un análisis de las interacciones entre diatomeas y bacterias (Amin *et al.*, 2012), el cual sugiere que existen dos filos observados constantemente: *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, particularmente las clases α -*Proteobacteria* y γ -*Proteobacteria*. Así mismo, un meta análisis de bacterias asociadas a 40 micro y macroalgas, encontró que las cepas aisladas se distribuyeron entre seis filos: Bacteroidetes (42 géneros), Proteobacteria (32), Firmicutes (7), Actinobacteria (8),

Verrucomicrobia (3) y Planctomicetos (1) (Goecke *et al.*, 2013). Las cepas *Lysinibacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus cereus*, aisladas de la diatomea, pertenecen al filo Firmicutes, también mencionado en dicho estudio.

Hernández-Zuloeta *et al.* (2011) encontraron *Bacillus cereus* presente en cultivos de *Thalassiosira sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Navicula sp.*, *Amphora sp.* y *Chaetoceros muelleri*, más no en *Chaetoceros ceratosporum*. También fue encontrado en *Navicula germanopolonica* (Hernández-Zuloeta, 2014), los autores afirman que es común encontrar el género *Bacillus* asociado a los cultivos de microalgas, ya que estas bacterias son formadoras de esporas, lo que les otorga una gran capacidad de adaptación. Sin embargo, esto no quiere decir que todas las cepas de dicho género mejoren el crecimiento en las microalgas, Suminto e Hirayama (1996) aislaron dos cepas de *Bacillus sp.* del cultivo masivo de *Chaetoceros gracilis* pero ninguna de las dos promovió el crecimiento cuando fueron inoculadas en el cultivo axénico, por el contrario, tuvieron un efecto negativo.

Varios estudios han demostrado que las interacciones entre microalgas y bacterias pueden favorecer el crecimiento de la microalga debido al intercambio de nutrientes entre ambas, como vitaminas, además las bacterias convierten los nutrientes en formas más biodisponibles para que las microalgas puedan asimilarlas, como el nitrógeno o el hierro; en reciprocidad, las algas les proporcionan carbono orgánico disuelto, como parte de las sustancias orgánicas que excretan en la fotosíntesis (Amin *et al.*, 2012; Croft *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2016; Kouzuma y Watanabe, 2015; Lupette *et al.*, 2016; Natrah, 2014; Ramanam *et al.*, 2016). En un estudio posterior se debería analizar cuál es la interacción específica entre las microalgas y bacterias estudiadas. Para llegar a entender la naturaleza de estas interacciones, se debería aplicar herramientas como la genómica: estudio de la información genética contenida en un organismo, a través de la detección e identificación de genes de interés implicados en las interacciones; la proteómica: estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma) o metabolómica: estudio de los metabolitos (moléculas pequeñas como hormonas, toxinas, etc.) producidos en una célula, tejido, u organismo que son producto de los procesos celulares.

Este estudio se revela muy importante si consideramos que los resultados “positivos” presentados en esta tesis fueron obtenidos a partir de cultivos bacterianos incubados en solución salina por varios días en contraste a experimentaciones previas donde la inoculación se realizaba directamente después de la resuspensión de las cepas bacterianas. Esta importante diferencia podría deberse a los metabolitos excretados por las bacterias, los cuales quedarían en el medio que se descarta. Justamente, Ahamed *et al* (2015) evaluaron el crecimiento de la microalga flagelada *Pavlova viridis*, cultivada con una bacteria probiótica o con su filtrado libre de bacterias, es decir utilizaron el sobrenadante luego de centrifugar las bacterias, en el cual estarían presentes los metabolitos producidos. El tratamiento con el filtrado libre de bacteria obtuvo el doble de crecimiento, respecto al control, resaltando la importancia de los metabolitos bacterianos. En un estudio posterior se debería evaluar el efecto del sobrenadante sobre los cultivos de microalgas, y de los diferentes parámetros que controlan su producción.

VII.6. Análisis estadístico

Los resultados mostrados en este estudio corresponden al promedio de números de células/ml obtenidos a partir de triplicados. Si bien estos promedios son en muchos casos alentadores con ganancias que oscilan del 30 al 50% en comparación con los controles, los análisis estadísticos generales indican que los tratamientos no son significativamente diferentes al control en las primeras etapas del cultivo debido a las importantes fluctuaciones observadas intra-triplicados. En todo caso, estas tendencias de incremento del crecimiento sirvieron para seleccionar a cada paso las mejores cepas bacterianas que fueron utilizadas en los experimentos finales.

En los experimentos con *Chaetoceros gracilis*, en la etapa 4, los tratamientos con las bacterias G3, G4, G6 (*Psychrobacter sp.*, *Lysinibacillus sp.* y *Staphylococcus saprophyticus*) resultaron estadísticamente diferentes al control ($\alpha=0.05$) de forma positiva, pero sin diferencias entre sí, lo que quiere decir que los tres tratamientos mejoraron por igual el crecimiento del cultivo de microalgas, respecto al control (Figura 10A). En la etapa 5, el grupo que recibió una nueva dosis de las bacterias G3, G4, G6, fue el que se diferenció

del control, sin tener diferencias entre dichos tratamientos, más sí con los del grupo que no recibió la nueva inoculación (Figura 10B).

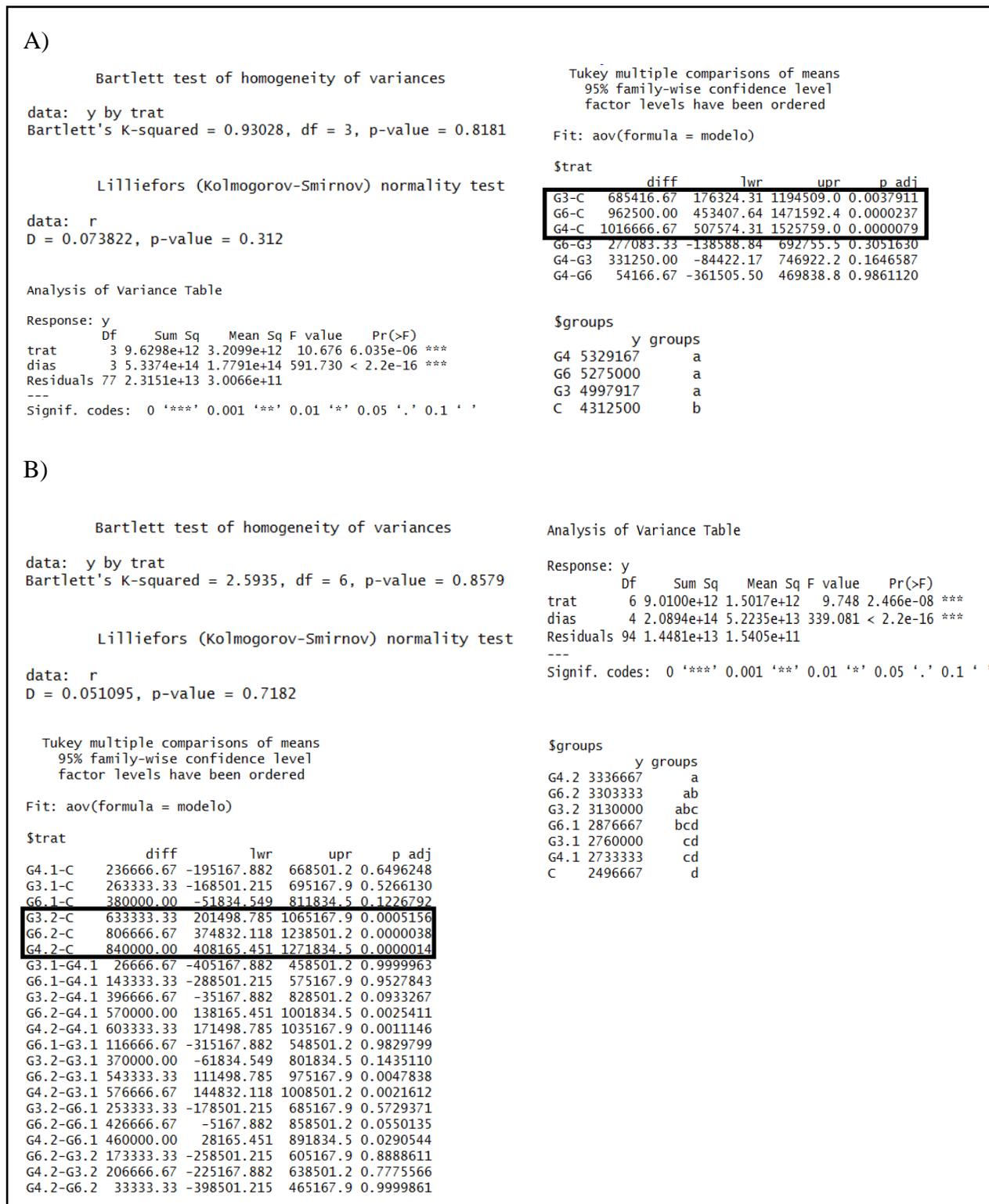


Figura 10: Análisis estadístico del cultivo de *Chaetoceros gracilis*. A) Etapa 4. B) Etapa 5.

En los experimentos con *Isochrysis galbana*, sólo la etapa 5 muestra resultados que difieren estadísticamente del control ($\alpha=0.05$), al igual que con *Chaetoceros gracilis*, los tratamientos del grupo que tuvo una nueva inoculación de las bacterias fueron los que lograron mejorar el crecimiento significativamente, en este caso las bacterias I4 y BM6 (*Lysinibacillus sp.* y *Bacillus cereus*) fueron con las que se obtuvieron mejores resultados (Figura 11).

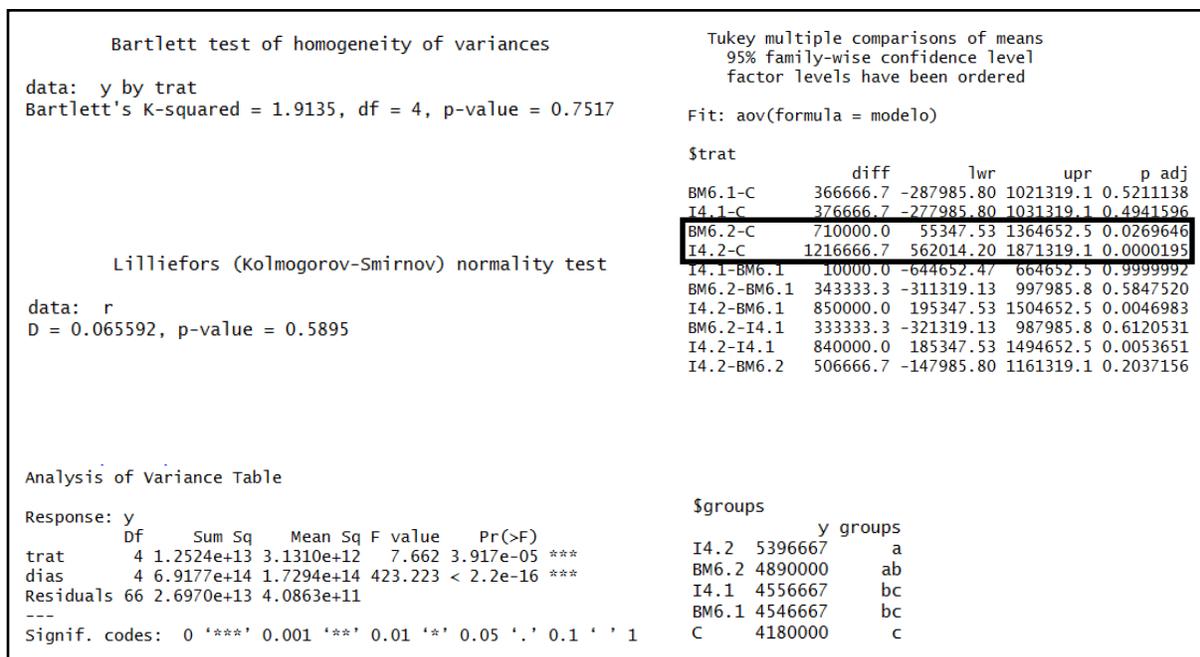


Figura 11: Análisis estadístico del cultivo de *Isochrysis galbana*, etapa 5.

La estrategia de re-inoculación aplicada en este estudio demostró entonces ser muy beneficiosa, multiplicando por 2 la ganancia obtenida sin re-inoculación frente al control. Este fenómeno podría deberse a que a temperaturas de 18-20°C, las microalgas se multiplican más eficientemente que las bacterias, limitando así el efecto probiótico en el tiempo. La aplicación de una dosis inicial de bacterias más elevada debería ser evaluada, sin embargo es importante recordar que las asociaciones bacterias - microalgas reposan sobre un equilibrio y que se ha reportado que bacterias probióticas se vuelven alguicidas cuando su concentración es mayor a 10^6 cel/ml (Fukami *et al.*, 1992).

Un interesante complemento a este estudio residiría en el seguimiento por metagenómica (estudio de la información genética que está contenida en todos los microorganismos que se encuentran en una comunidad o muestra ambiental) de las evoluciones de las poblaciones

microbianas totales (cultivables y no cultivables) con y sin inoculación de las mejores cepas. Con esta información se podría estimar si las cepas inoculadas persisten o desaparecen y si pueden desplazar a las otras bacterias asociadas. Este tipo de experimentaciones sería aún más oportuno cuando se iniciaran las evaluaciones del efecto combinado (como consorcio) de las cepas seleccionadas sobre cada microalga.

VII.7. Aplicación en la alimentación de larvas de moluscos bivalvos

En la bibliografía revisada, las experimentaciones corresponden a inoculación de bacterias en diferentes volúmenes de cultivos de microalgas sin realizar su seguimiento, es decir, monitorear el crecimiento al traspase de un volumen a otro hasta llegar a la cosecha para ver cómo afectan las bacterias en todo el proceso del cultivo y poder tener una aplicación real en la alimentación de bivalvos. En este estudio, se hizo el seguimiento de 500 ml a 2 L y por cuestión de tiempo, no se pudo continuar el proceso hasta el cultivo masivo de microalgas (20 L y 200L). Sin embargo, se realizó una proyección asumiendo que todos los días se obtendría la densidad alcanzada en la última etapa de experimento, con un volumen de 2L y nueva adición de bacterias en los tratamientos. Como se explicó anteriormente, los tratamientos en esta última etapa son estadísticamente diferentes al control pero iguales entre sí, por lo tanto al hacer el cálculo se refleja un ahorro con todos los tratamientos, no obstante, el máximo ahorro porcentualmente, se produciría con la bacteria *Lysinibacillus sp.*, I4 para *Isochrysis galbana* y G4 para *Chaetoceros gracilis*.

Se tomó como referencia una tabla de alimentación, modificada para una dieta de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* (Anexo 3) y se hicieron los cálculos respectivos basados en la fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde: C_1 = Densidad celular de microalgas cosechadas (cel/ml); V_1 = Volumen necesario para alimentar (L); C_2 = Densidad celular necesario (cel/ml); V_2 = Volumen del tanque de cultivo larvario (L).

La densidad celular necesaria (C_2) es la que se presenta en la tabla de alimentación del Anexo 3, para cada día respectivo. El volumen de los tanques del cultivo larvario (V_2) es de 10 000 L. La densidad celular de las microalgas cosechadas son las obtenidas en la etapa 5 de la experimentación, presentadas en los Cuadros 11 y 12. Los cálculos se presentan en el Anexo 4.

El consumo de algas por cada tanque durante los 30 días que dura aproximadamente el cultivo de *Argopecten purpuratus*, hasta que es llevado al mar, sería:

- Tratamiento control: 1,101 L de *Isochrysis galbana* + 2,437 L de *Chaetoceros gracilis*.
- Tratamiento con *Lysinibacillus sp.* en ambas microalgas: 859 L de *Isochrysis galbana* + 1,601 L de *Chaetoceros gracilis*.

A lo largo del cultivo se utilizan aproximadamente 12 tanques, por lo tanto los valores quedaría de la siguiente manera:

Cuadro 13: Cálculo del total de microalgas (L) a utilizar con el tratamiento con *Lysinibacillus sp.*

	1 Tanque		12 Tanques	
	Control (L)	Tratamiento con <i>Lysinibacillus sp.</i> (L)	Control (L)	Tratamiento con <i>Lysinibacillus sp.</i> (L)
<i>Isochrysis galbana</i>	1,101	859	13,216	10,307
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,437	1,601	29,240	19,209
TOTAL			42,456	29,516

Obteniendo un ahorro total de 12,940 L de microalgas. Es decir, 30.5% de ahorro en el cultivo.

Si bien estos cálculos pueden considerarse como teóricos, nos pueden dar una idea del ahorro aproximado que se generaría gracias a la adición de bacterias, específicamente dos cepas de *Lysinibacillus sp.* Siendo el cultivo de microalgas un costo de producción de aproximadamente el 40% en los hatchery de concha de abanico (Coutteau & Sorgeloos, 1992; Uriarte *et al.*, 2002; Helm *et al.*, 2006;), la adición de la bacteria *Lysinibacillus sp.* contribuiría a disminuir dichos costos, debido a que se necesitaría menos electricidad, agua, nutrientes y tiempo, para cubrir los mismos requerimientos. En un estudio de escalamiento, se debería también considerar los costos y la logística de producción de la bacteria, que sería de todos modos menos costoso que la producción de mayores cantidades de microalgas.

Cabe mencionar que dentro del proyecto donde se ejecutó esta tesis, también se realizaron experimentos probando cepas bacterianas que mejoran la supervivencia de los cultivos larvarios de concha de abanico. En dichos bioensayos las cepas I4 y G4 de *Lysinibacillus sp.* arrojaron porcentajes de supervivencia similares e incluso mayores que el control, lo que demostraría su inocuidad para las larvas, por lo que no habría problema en ser utilizadas en los cultivo microalgales.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cuatro cepas bacterianas asociadas a la microalga *Isochrysis galbana* y seis asociadas a *Chaetoceros gracilis*, utilizadas en un laboratorio de cultivo de moluscos.
2. Las cinco cepas que promueven el crecimiento de interés fueron caracterizadas molecularmente basándose en sus secuencias del gen 16S ARNr, identificándose cuatro géneros: *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Psychrobacter* y *Staphylococcus*.
3. Las cepas *Psychrobacter sp.*, *Lysinibacillus sp.* y *Staphylococcus saprophyticus*, provocan un efecto promotor del crecimiento en la microalga *Chaetoceros gracilis* cuando son adicionadas puntualmente o de forma continua en el cultivo al momento del traspase.
4. Las cepas *Lysinibacillus sp.* y *Bacillus cereus* promueven el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* cuando son inoculadas de forma continua en el cultivo al momento que se realiza el traspase.
5. La adición de dos cepas de *Lysinibacillus sp.*, una a cada microalga, permitiría reducir los costos de producción del cultivo de microalgas, sin afectar el crecimiento y supervivencia de las larvas de *Argopecten purpuratus*.

IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar el seguimiento de la adición de las cepas bacterianas hasta el cultivo masivo.
2. Evaluar el efecto de la aplicación en consorcio de las mejores cepas.
3. Probar la adición de cepas bacterianas en cultivos axénicos.
4. Monitorear por metagenómica la evolución de las comunidades bacterianas totales (bacterias cultivables y no cultivables) presentes a lo largo del cultivo con y sin la inoculación de las cepas seleccionadas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adex (Asociación de exportadores). 2015. Exportaciones News: Boletín de exportaciones. p. 13.
2. Adex (Asociación de exportadores). 2016. Exportaciones News: Boletín de exportaciones. p. 13.
3. Ahamed, S; Kim, JJ; Choi, TO; Choi, TJ. 2015. Growth promotion of *Pavlova viridis* by bacteria isolated from the microalga. *Journal of Life Science* 25(5):568-576.
4. Amin, S; Green, D; Hart, M; Küpper, F; Sunda, W; Carrano, C. 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(40):17071-17076.
5. Amin, S; Parker, M; Armbrust, E. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76:667-684.
6. Aranda-Burgos, J; da Costa, F; Nóvoa, S; Ojea, J; Martínez-Patiño, D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture* 420-421:38-48.
7. Avendaño-Herrera, R; Dekovic, M; Riquelme, C. 2001. Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en cultivo masivo. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36:31-41.
8. Avendaño-Herrera, R; Riquelme C. 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30:893-900.
9. Avendaño-Herrera, R; Riquelme, C. 2007. Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. *Aquacultural Engineering* 36:97-104.
10. Bell, W; Mitchell, R. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin* 143:265-277.

11. Bennington, J. 2000. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Editorial Médica Panamericana. España.
12. Brown M. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: Cruz-Suárez, L; Ricque-Marie, D; Tapia-Salazar, M; Gaxiola-Cortés, M; Simoes, N. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memoria VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Cancún, México. p. 281-292.
13. Brown, M; Jeffrey, S; Volkman, J; Dunstan, G. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315-331.
14. Carreño, Y; Acosta, E; Gómez-León, J. 2012. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Argopecten nucleus* alimentadas con diferentes dietas microalgales. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 41(1):103-120.
15. Couteau, P; Sorgeloos, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research* 11:467-476.
16. Croft, M; Lawrence, A; Raux-Deery, E; Warren, M; Smith, A. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438: 90-93.
17. Croft, M; Warren, M; Smith, A. 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryot Cell* 5:1175-1183.
18. De Castro, S; García, V. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture* 246:405-412.
19. Diringer, B; Ramírez, B; Avellan, R; Ordinola, A; Peralta, T; Mendoza, O; Mialhe, E; Motte, E. 2012. First herpesvirus detection by semi-Nested PCR in several cultivated populations of a economically-important pectinid mollusk (*Argopecten purpuratus*). *Aquaculture*. Enviado.

20. Fábregas, J; Maseda, A; Domínguez, A; Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:31-35.
21. Farías, A. 2001. Nutrición en moluscos pectínidos. In: Maeda-Martínez, A. (Ed.) 2001. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. 5:89-104.
22. Farías, A., Uriarte. I., 2002. Nutrición en larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lípidos. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). 2002. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.
23. Fierro F. 2014. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Electroforesis de ADN*. México. p. 27-51.
24. Foster, R; Kuypers, M; Vagner, T; Paerl, R; Musat, N; Zehr, J. 2011. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *The ISME Journal* 5:1484-1493.
25. Fuentes, J; Gaebayo, I; Cuaresma, M; Montero, Z; González-del-Valle, M; Vílchez, C. 2016. Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Marine Drugs* 14:100.
26. Fukami, K; Yuzawa, A; Nishijima, T; Hata, Y. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58:1073-1077.
27. Fukami, K; Nishijima, T; Ishida, Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358:185-191.
28. Galley, T; Batista, F; Braithwaite, R; King, J; Beaumont, A. 2010. Optimisation of larval culture of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Aquaculture International* 18:315-325.

29. Goecke, F; Thiel, V; Wiese, J; Labes, A; Imhoff, J. 2013. Algae as an important environment for bacteria-phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia* 52(1):14-24.
30. González, R. 2010. Auge y crisis: la pesquería de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la región Pisco-Paracas, costa sur del Perú. *Espacio y Desarrollo* (22):25-51.
31. Grossart, H; Levold, F; Allgaier, M; Simon, M; Brinkhoff, T. 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* 7:860–873.
32. Han, J; Zhang, L; Wang, S; Yang, G; Zhao, L; Pan, K. 2016. Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 23:8.
33. Harrison, P; Thompson, P; Calderwood, G. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 2:45–56
34. Helm, M.; Bourne, N; Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca FAO, Roma. 184 p.
35. Hernández-Zulueta, J; Leal, S; Lugiayo, G; Loza, S; Curbelo, R; Caballero, V; Ortiz, E; Morales, M; Kratzer, J. 2011. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en cultivos de microalgas marinas. Actividad antibacteriana de algunas de las especies encontradas. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras* 28(2): 59-67.
36. Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. Glosario Hablado de Términos Genéticos (en línea). Consultado el 24 de abril 2018. Disponible en: <https://www.genome.gov/glossary/>.
37. Imai, I; Ishida, Y; Sawayama, S; Hata, Y. 1991. Isolation of marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57:1409.

38. Imbert, M; Blondeau, R. 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Current Microbiology* 37:64–66.
39. Innis, M; Gelfand, D; Sninsky, J. 1999. PCR Applications. Protocols for functional genomics. Academic Press. New York, Estados Unidos de América. 566 p.
40. Keshtacher-Liebson, E; Hadar, Y; Chen, Y. 1995. Oligotrophic bacteria enhance algal growth under iron-deficient condition. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2439–2441.
41. Kouzuma, A; Watanabe, K. 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion Biotechnology* 33:125-129.
42. Lupette, J; Lami, R; Krasovec, M; Grimsley, N; Moreau, H; Piganeau, G; Sanchez-Ferandin, S. 2016. *Marinobacter* dominates the bacterial community of the *Ostreococcus tauri* phycosphere in culture. *Frontiers in Microbiology* 7:1414
43. MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, Ecuador); Concepto Azul, Ecuador. 2015. Manual práctico de producción de concha prieta *Anadara tuberculosa*, en condiciones de laboratorio. Ecuador. 23 p.
44. Nascimento, P. 2015. Mejora de la supervivencia larvaria en cultivos de moluscos mediante la mejora de las técnicas de cultivo de microalgas y la introducción de nuevas especies de microalgas. Tesis Ph.D. España. Universidad de Santiago de Compostela.
45. Natrah, F; Bossier, P; Sorgeloos, P; Yusoff, F y Defoirdt. 2014. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 6:48–61.
46. Natrah, F; Defoirdt, T; Sorgeloos, P; Bossier, P. 2011a. Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Marine Biotechnology* 13:109–126.
47. Natrah, F; Kenmegne, M; Wiyoto, W; Sorgeloos, P; Bossier, P; Defoirdt, T. 2011b. Effects of microalgae commonly used in aquaculture on acylhomoserine lactone *quorum sensing*. *Aquaculture* 317:53–57.

48. Parhuayo, L. 2015. Efecto inhibitorio de la microalga *Isochrysis galbana* (Haptophyta) sobre bacterias tipo *Vibrio spp.* Tesis Ing. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 71 p.
49. Planas, M; Vásquez, J; Novoa, B. 2015. Stimulative effect of lactic acid bacteria in the growth of the microalgae *Isochrysis galbana*. *Journal of Coastal Life Medicine* 3(12):925-930.
50. PromPeru, 2015. Informe anual 2014: Desarrollo del comercio exterior pesquero. p. 27.
51. Rajamani, S; Bauer, W; Robinson, J; Farrow, J; Pesci, E; Teplitski, M. 2008. The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial *quorum-sensing* receptor. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21:1184–1192.
52. Ramanan, R; Kim, BH; Cho, DH; Oh, HM; Kim, HS. 2016. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 34:14-29.
53. Renaud, S; Thinh, L; Lambrinidis, G; Parry, D. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae growth in batch cultures. *Aquaculture* 211:195-214.
54. Riquelme, C; Avendaño-Herrera, R. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76(4): 725-736.
55. Riquelme, C; Ishida, Y. 1988. Chemotaxis of bacteria extracellular products of marine bloom. *The Journal of General and Applied Microbiology* 34:417–423.
56. Rodicio, MR; Mendoza MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4):238-45.
57. Sakata, T. 1990. Occurrence of marine *Saprospira sp.* possessing algicidal activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1165.

58. Schwenk, D; Nohynek, L; Rischer, H. 2014. Algae-bacteria association inferred by 16S rDNA similarity in established microalgae cultures. VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland. *MicrobiologyOpen* 3:356-368.
59. Suminto, K; Hirayama, K. 1996. Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fisheries Science* 62:40–43.
60. Suminto, K; Hirayama, K. 1997. Application of a growth-promoting bacterium for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia* 358:223–230.
61. Teplitski, M; Chen, H; Rajamani, S; Gao, M; Merighi, M; Sayre, R. 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interference with *quorum sensing* regulation in bacteria. *Plant Physiology* 134:137–146.
62. Uriarte, I; Farías, A. 1999. The effect of dietary protein on growth and biochemical composition of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) postlarvae and spat. *Aquaculture*, 180:119–127.
63. Uriarte, I; Rupp, G; Abarca, A. 2002. Producción de juveniles de pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. In: *Los Moluscos Pectínidos de Ibero América: Ciencia y Acuicultura*. A.N. Maeda-Martínez (Ed.), Editorial Limusa, p. 147-172.
64. Vivanco, G; Oliva, D; Abarca, A. 2014. Efecto de dietas en base a microalgas tradicionales, nativas y dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia en larvas velígeras de la almeja taquilla *Mulinia edulis*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2):339-349.
65. Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. Chapter 2: Unit 2.4.
66. Zaid, A; Hughes, HG; Porceddu, E; Nicholas, F. 2004. *Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación*. Estudio FAO Investigación y Tecnología. Roma.

XI. ANEXOS

ANEXO 1: Secuencias de ADN obtenidas a partir del gen 16S ARNr.

Código	Secuencia	Descripción	Query cover	Ident	Accession
G3	CATGCAGTCGAGCGGAACGATG GGAGCTTGCTCCCAGGCGTCGA GCGGCGGACGGGTGAGTAACAC TTAGGAATCTACCTAGTAGTGGG GGATAGCTCGGGGAAACTCGAA TTAATACCGCATAACGACCTACGG GAGAAAGGGGGCAGTTTACTGC TCTCGCTATTAGATGAGCCTAAG TCGGATTAGCTAGATGGTGGGGT AAAGGCCTACCATGGCGACGAT CTGTAGCTGGTCTGAGAGGATG ATCAGCCACACCGGGACTGAGA CACGGCCCGGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATATTGGA CAATGGGGGAAACCCTGATCCA GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA GGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTT TAAGCAGTGAAGAAGACCTTAT GGTTAATACCCGTATGCGATGAC ATTAGCTGCAGAATAAGCACCG GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACAGAGGGTGCAAGCG TTAATCGGAATTACTGGGCGTAA AGCGAGCGTAGGTGGCTTGATA AGTCAGATGTGAAATCCCCGGG CTTAACCTGGGAACTGCATCTGA TACTGTAAAGCTAGAGTAGGTGA GAGGGAAGTAGAATTCAGGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT CTGGAGGAATACCGATGGCGAA GGCAGCTTCCTGGCATCATACTG ACACTGAGGCTCGAAAGCGTGG GTAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACG ATGTCTACTAGTCGTTGGGTCCC TTGAGGACTTAGTGACGCAGCTA ACGCAATAAGTAGACCGCCTGG GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGC CCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGTCTTGACATA CACAGAATCTTGTAGAGATACG AGAGTGCCTTCGGGA	<i>Psychrobacter celer</i> Mcap_H2	100%	99%	KP640590.1

G4	ACTGCAGTCGAGCGAACAGAGA AGGAGCTTGGTCCTTCACGTTAG CGGCGGACGGGTGAGTAACACG TGGGCAACCTACCTTATACTTTG GGATAACTCCGGGAAACCGGGG CTAATACCGAATAATCTGTTTCA CCTCATGGTGAACACTGAAAG ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGG ATGGGCCCGCGGCATTANCT AGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC CAAGGCGACGATGCGTACCCGA CCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGGACTGATACACGGCCCAN ACTCTACGGGAGGCAGCAGTA GGGAATCTTCCACAATGGGCGA AAGCCTGATGGAGCAACGCCGC GTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGT TCTTAAAACCTCTGTTGTAAGGGA AGAACAAGTACAGTAGTAACTG GCTGTACCTTGACGGTACCTTAT TAGAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG CAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATG TGAAAGCCCACGGCTCAACCGT GGAGGGTCATTGGAAACTGGGA GACTTGAGTG	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> FJAT- 42880	99%	99%	MG650805. 1
G6	TGCAGTCGAGCGAACAGATAAG GAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGT GGGTAACCTACCTATAAGACTG GGATAACTTCGGGAAACCGGAG CTAATACCGGATAACATTTGGAA CCGCATGGTTCTAAAGTGAAG ATGGTTTTGCTATCACTTATAGA TGGACCCGCGCCGTATTAGCTAG TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA GGCGACGATACGTAGCCGACCT GAGAGGGTGATCGGCCACACTG GAACTGAGACACGGTCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG AATCTTCCGCAATGGGCGAAAG CCTGACGGAGCAACGCCGCGTG AGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGT AAAACCTCTGTTATTAGGGAAGA ACAAACGTGTAAGTAACTGTGC ACGTCTTGACGGTACCTAATCAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGC CAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> MBL_B9 16S	100%	100%	MF776606. 1

	<p>TTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCACGGCTCAACCGTGGAG GGTCATTGGAAACTGGGAAACT TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGCAGAGATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGGCGACTTTCTG GTCTGTAAGTACGCTGATGTGC GAAAGCGTGGGGATCAAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAGTGCTAAGT GTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA CTCCGCCTGGGGAGTACGACCG CAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCGG TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA GCAACGCGAAGA</p>				
I4	<p>TGCAGTCGAGCGAACAGAGAAG GAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGT GGGCAACCTACCTTATAGTTTGG GATAACTCCGGGAAACCGGGGC TAATACCGAATAATCTGTTTCAC CTCATGGTGAAACACTGAAAGA CGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGA TGGGCCCCGCGGCATTAGCTA GTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCGACGATGCGTAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGGCGAA AGCCTGATGGAGCAACGCCGCG TGAGTGAAGAAGGATTTCCGGTTC GTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAA GAACAAGTACAGTAGTAACTGG CTGTACCTTGACGGTACCTTATT AGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCACGGCTCAACCGTG GAGGGTCATTGGAAACTGGGAG ACTTGAGTGCAGAAGAGGATAG TGGAATTCCAAGTGTAGCGGTG AAAATGCGTAGAGATTTGGAGG AACACCAGTGGCGAAGGGCGACT ATCTGGTCTGTAAGTACTGACTGA</p>	<p><i>Lysinibacillus fusiformis</i> BH45</p>	100%	99%	<p>KY910256. 1</p>

	GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCACGCCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGTTAAGGGGTTTCCGCC CCTTA				
BM6	AGTGTCAGTTACAGACCAGAAA GTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC TCCATATCTCTACGCATTTACC GCTACACATGGAATTCCACTTTC CTCTTCTGCACTCAAGTCTCCA GTTTCCAATGACCCTCCACGGT GAGCCGTGGGCTTTCACATCAGA CTTAAGAAACCACCTGCGCGCG CTTTACGCCCAATAATTCCGGAT AACGCTTGCCACCTACGTATTAC CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG CCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACC GTCAAGGTGCCAGCTTATTCAAC TAGCACTTGTTCTTCCCTAACA CAGAGTTTTACGACCCGAAAGC CTTCATCACTCACGCGCGTTC TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGC GGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT CAGTCCCAGTGTGGCCGATCACC CTCTCAGGTCGGCTACGCATCGT TGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCA CCAAGTAGCTAATGCGACGCGG GTCCATCCATAAGTGACAGCCG AAGCCGCCTTTCAATTTTGAACC ATGCAGTTCAAAATGTTATCCGG TATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGT TATCCCAGTCTTATGGGCAGGTT ACCCACGTGTTACTACCCGTCC GCCGCTAACTTCATAAGAGCAA GCTCTTAATCCATTTCGCTCGACT TGCATGTATTAGGCACGCCGCA GCGTTCATCCTGAGCCA	<i>Bacillus cereus</i> HBL-AI	100%	100%	CP023245.1

ANEXO 2: Análisis estadístico.

- *Isochrysis galbana*, etapa 1.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat

Bartlett's K-squared = 3.0223, df = 10, p-value = 0.9809

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r

D = 0.079164, p-value = 0.01339

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) más no con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor <0.05), por lo que no se puede realizar un ANOVA, sino que debe aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis:

Sstatistics

Chi sq	Df	p. chi sq	t. value	MSD
1.786364	10	0.9977308	1.975488	35.21646

Sparameters

test	p. adjusted	name. t	ntr	alpha
Kruskal-Wallis	none	trat	11	0.05

Smeans

	y	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BM6	1230000	88.56667	875214.3	15	250000	2350000	350000	1250000	2125000
C	970000	72.76667	632399.1	15	250000	2000000	375000	900000	1600000
G1	1166667	84.06667	830160.6	15	250000	2600000	325000	1250000	1875000
G2	1136667	82.63333	786372.0	15	250000	2100000	300000	1300000	1925000
G3	1190000	85.36667	727569.3	15	250000	2450000	500000	1300000	1775000
G4	1023333	76.23333	659509.2	15	250000	2000000	375000	1050000	1650000
G6	1256667	89.86667	843010.5	15	250000	2650000	525000	1150000	1950000
I2	1083333	79.33333	724979.5	15	250000	2550000	425000	1000000	1625000
I3	1193333	87.50000	812814.0	15	250000	2400000	500000	1000000	1950000
I4	1126667	83.20000	784416.7	15	250000	2500000	425000	1000000	1800000
I5	1150000	83.46667	862098.8	15	250000	2600000	300000	900000	1875000

Sgroups

	y	groups
G6	89.86667	a
BM6	88.56667	a
I3	87.50000	a
G3	85.36667	a
G1	84.06667	a
I5	83.46667	a
I4	83.20000	a
G2	82.63333	a
I2	79.33333	a
G4	76.23333	a
C	72.76667	a

Con un $\alpha=0.05$, no se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control.

- *Isochrysis galbana*, etapa 2.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat
Bartlett's K-squared = 2.5772, df = 5, p-value = 0.7648

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r
D = 0.10702, p-value = 0.04005

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) más no con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor <0.05), por lo que no se puede realizar un ANOVA, sino que debe aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis:

```
$statistics
      Chi sq Df  p. chi sq  t. value      MSD
0.2230391  5 0.9988457  1.996564  17.46598
```

```
$parameters
      test p.ajusted name.t ntr alpha
Kruskal-Wallis      none  trat   6  0.05
```

```
$means
      y      rank      std  r      Min      Max      Q25      Q50      Q75
BM6  958333.5  36.83333  706731.7  12  300000  2100002  337500  800001.0  1350000
C    1016666.5  38.08333  655512.7  12  300000  1899999  412500  974999.5  1625000
G6   995834.0  35.54167  892764.2  12  300000  2700003  300000  575001.0  1362500
I3   937499.7  35.04167  667465.9  12  300000  1949998  300000  750000.0  1500000
I4  1120833.3  37.79167  902133.6  12  250000  2600003  300000  775000.0  1775000
I5   904166.5  35.70833  657286.5  12  300000  1949998  375000  650001.5  1337500
```

```
$groups
      y groups
C    38.08333  a
I4   37.79167  a
BM6  36.83333  a
I5   35.70833  a
G6   35.54167  a
I3   35.04167  a
```

Con un $\alpha=0.05$, no se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control.

- *Isochrysis galbana*, etapa 3.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat
 Bartlett's K-squared = 26.973, df = 10, p-value = 0.00263

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r
 D = 0.072128, p-value = 0.03568

Los datos no cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor <0.05) y tampoco con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor <0.05), por lo que no se puede realizar un ANOVA, sino que debe aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis:

\$statistics

	Chi sq	Df	p. chi sq	t. value	MSD
	4.903979	10	0.8974992	1.975488	34.85828

\$parameters

	test	p. adjusted	name.	t	ntr	alpha
	Kruskal-Wallis	none	trat	11	0.05	

\$means

	y	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BM6	3546667	94.83333	3139805.9	15	6e+05	9600000	950000	2900000	4975000
C	2933333	90.16667	2368066.3	15	6e+05	7800000	1175000	2300000	3725000
G1	2223333	77.36667	1706381.6	15	6e+05	6300000	725000	1950000	3250000
G2	1700000	68.46667	957862.2	15	6e+05	3200000	900000	1400000	2450000
G3	1853333	71.33333	1195895.8	15	6e+05	4500000	750000	1650000	2650000
G4	2653333	88.06667	1991093.3	15	6e+05	7100000	850000	2150000	4150000
G6	2253333	77.10000	1632533.8	15	6e+05	5200000	600000	1950000	3600000
I2	2500000	84.83333	1792544.1	15	6e+05	6000000	975000	2300000	3175000
I3	2533333	81.66667	2210015.1	15	6e+05	6950000	675000	1500000	4100000
I4	2996667	92.43333	2289375.0	15	6e+05	6900000	1150000	2000000	4375000
I5	2506667	86.73333	1660127.6	15	6e+05	6100000	1050000	2400000	3675000

\$groups

	y	groups
BM6	94.83333	a
I4	92.43333	a
C	90.16667	a
G4	88.06667	a
I5	86.73333	a
I2	84.83333	a
I3	81.66667	a
G1	77.36667	a
G6	77.10000	a
G3	71.33333	a
G2	68.46667	a

Con un $\alpha=0.05$, no se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control.

- *Isochrysis galbana*, etapa 4.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat

Bartlett's K-squared = 1.1263, df = 2, p-value = 0.5694

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r

D = 0.17634, p-value = 7.695e-05

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) más no con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor <0.05), por lo que no se puede realizar un ANOVA, sino que debe aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis:

\$statistics

Chi sq	Df	p. chi sq
1.220596	2	0.5431891

\$parameters

test	p. adjusted	name	t	ntr	alpha
Kruskal-Wallis	none	trat		3	0.05

\$means

	y	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BM6	5912500	31.02083	3822566	24	1e+06	12000000	2312500	6150000	9050000
C	4808333	25.70833	3176464	12	1e+06	10400000	2312500	4675000	6987500
I4	6158333	32.37500	4234169	24	1e+06	13000000	2650000	5800000	9537500

\$comparison

NULL

\$groups

	y	groups
I4	32.37500	a
BM6	31.02083	a
C	25.70833	a

Con un $\alpha=0.05$, no se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control.

- *Chaetoceros gracilis*, etapa 1.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat
 Bartlett's K-squared = 1.1263, df = 2, p-value = 0.5694

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r
 D = 0.072128, p-value = 0.03568

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) y con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor >0.05). Se aplica el análisis de varianza:

Analysis of Variance Table

Response: y

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	10	4.1198e+13	4.1198e+12	7.052	4.949e-09 ***
di as	4	5.2067e+14	1.3017e+14	222.806	< 2.2e-16 ***
Residuals	150	8.7632e+13	5.8421e+11		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Con una significancia de 0.05, se puede afirmar que al menos un tratamiento difiere de otro, se utiliza la prueba de Tukey para verificar cuáles son esos tratamientos.

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level
 factor levels have been ordered

Fit: aov(formula = modelo)

Strat diff	lwr	upr	p adj
G3-G2	153333.333	-759048.02	1065714.7 0.9999774
G1-G2	523333.333	-389048.02	1435714.7 0.7323589
G6-G2	553333.333	-359048.02	1465714.7 0.6612046
I2-G2	800000.000	-112381.36	1712381.4 0.1442072
I5-G2	806666.667	-105714.69	1719048.0 0.1362094
I3-G2	833333.333	-79048.02	1745714.7 0.1076001
G4-G2	953333.333	40951.98	1865714.7 0.0323880
C-G2	1233333.333	320951.98	2145714.7 0.0009373
I4-G2	1296666.667	384285.31	2209048.0 0.0003736
BM6-G2	1846666.667	934285.31	2759048.0 0.0000000
G1-G3	370000.000	-542381.36	1282381.4 0.9628974
G6-G3	400000.000	-512381.36	1312381.4 0.9380289
I2-G3	646666.667	-265714.69	1559048.0 0.4279927
I5-G3	653333.333	-259048.02	1565714.7 0.4120919
I3-G3	680000.000	-232381.36	1592381.4 0.3510456
G4-G3	800000.000	-112381.36	1712381.4 0.1442072
C-G3	1080000.000	167618.64	1992381.4 0.0073194
I4-G3	1143333.333	230951.98	2055714.7 0.0032313
BM6-G3	1693333.333	780951.98	2605714.7 0.0000006
G6-G1	30000.000	-882381.36	942381.4 1.0000000
I2-G1	276666.667	-635714.69	1189048.0 0.9958021

I5-G1	283333.333	-629048.02	1195714.7	0.9949149
I3-G1	310000.000	-602381.36	1222381.4	0.9897086
G4-G1	430000.000	-482381.36	1342381.4	0.9034978
C-G1	710000.000	-202381.36	1622381.4	0.2882467
I4-G1	773333.333	-139048.02	1685714.7	0.1797822
BM6-G1	1323333.333	410951.98	2235714.7	0.0002508
I2-G6	246666.667	-665714.69	1159048.0	0.9983778
I5-G6	253333.333	-659048.02	1165714.7	0.9979693
I3-G6	280000.000	-632381.36	1192381.4	0.9953759
G4-G6	400000.000	-512381.36	1312381.4	0.9380289
C-G6	680000.000	-232381.36	1592381.4	0.3510456
I4-G6	743333.333	-169048.02	1655714.7	0.2269238
BM6-G6	1293333.333	380951.98	2205714.7	0.0003925
I5-I2	6666.667	-905714.69	919048.0	1.0000000
I3-I2	33333.333	-879048.02	945714.7	1.0000000
G4-I2	153333.333	-759048.02	1065714.7	0.9999774
C-I2	433333.333	-479048.02	1345714.7	0.8990266
I4-I2	496666.667	-415714.69	1409048.0	0.7902183
BM6-I2	1046666.667	134285.31	1959048.0	0.0110433
I3-I5	26666.667	-885714.69	939048.0	1.0000000
G4-I5	146666.667	-765714.69	1059048.0	0.9999851
C-I5	426666.667	-485714.69	1339048.0	0.9078403
I4-I5	490000.000	-422381.36	1402381.4	0.8036891
BM6-I5	1040000.000	127618.64	1952381.4	0.0119705
G4-I3	120000.000	-792381.36	1032381.4	0.9999978
C-I3	400000.000	-512381.36	1312381.4	0.9380289
I4-I3	463333.333	-449048.02	1375714.7	0.8530085
BM6-I3	1013333.333	100951.98	1925714.7	0.0164327
C-G4	280000.000	-632381.36	1192381.4	0.9953759
I4-G4	343333.333	-569048.02	1255714.7	0.9780204
BM6-G4	893333.333	-19048.02	1805714.7	0.0606780
I4-C	63333.333	-849048.02	975714.7	1.0000000
BM6-C	613333.333	-299048.02	1525714.7	0.5102451
BM6-I4	550000.000	-362381.36	1462381.4	0.6693518

Sgroups

y groups

BM6	3546667	a
I4	2996667	ab
C	2933333	ab
G4	2653333	abc
I3	2533333	bcd
I5	2506667	bcd
I2	2500000	bcd
G6	2253333	bcd
G1	2223333	bcd
G3	1853333	cd
G2	1700000	d

El control difiere estadísticamente ($p < 0.05$) de los tratamientos G2 y G3, pero lo hace de forma negativa, es decir, las densidades obtenidas con el control, son mayores a los otros tratamientos.

- *Chaetoceros gracilis*, etapa 2.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat
 Bartlett's K-squared = 1.4576, df = 4, p-value = 0.8341

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r
 D = 0.091154, p-value = 0.2471

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) y con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor >0.05). Se aplica el análisis de varianza:

Analysis of Variance Table

Response: y

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	4	5.2025e+11	1.3006e+11	2.0865	0.09585 .
dias	3	6.4806e+13	2.1602e+13	346.5455	< 2e-16 ***
Residuals	52	3.2414e+12	6.2335e+10		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Con una significancia de 0.05, se puede afirmar que al menos un tratamiento difiere de otro, se utiliza la prueba de Tukey para verificar cuáles son esos tratamientos.

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level
 factor levels have been ordered

Fit: aov(formula = modelo)

Strat diff	lwr	upr	p adj
G4-BM6	145833.333	-142191.7101	433858.4 0.6110212
G2-BM6	183333.333	-104691.7101	471358.4 0.3853545
C-BM6	187500.000	-100525.0434	475525.0 0.3625856
G3-BM6	287500.000	-525.0434	575525.0 0.0506336
G2-G4	37500.000	-250525.0434	325525.0 0.9959710
C-G4	41666.667	-246358.3768	329691.7 0.9939550
G3-G4	141666.667	-146358.3768	429691.7 0.6367772
C-G2	4166.667	-283858.3768	292191.7 0.9999993
G3-G2	104166.667	-183858.3768	392191.7 0.8440895
G3-C	100000.000	-188025.0434	388025.0 0.8625568

No se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control (p>0.05).

- *Chaetoceros gracilis*, etapa 3.

Bartlett test of homogeneity of variances

data: y by trat

Bartlett's K-squared = 4.9454, df = 10, p-value = 0.8948

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: r

D = 0.10113, p-value = 0.0002965

Los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (p-valor >0.05) más no con el supuesto de normalidad de los residuos (p-valor <0.05), por lo que no se puede realizar un ANOVA, sino que debe aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis:

Sstatistics

Chi sq	Df	p. chi sq	t. value	MSD
3.063021	10	0.9799018	1.975488	35.08774

Sparameters

test	p. adjusted	name.	t	ntr	alpha
Kruskal-Wallis	none	trat	11	0.05	

Smeans

	y	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BM6	5506667	81.53333	3384253	15	9e+05	10300000	3000000	6400000	7925000
C	5240000	76.33333	3189167	15	9e+05	9450000	2950000	4950000	8525000
G1	5220000	75.40000	3348496	15	9e+05	10600000	2600000	5350000	7725000
G2	6153333	87.50000	4077266	15	9e+05	13950000	2450000	7000000	9050000
G3	6483333	89.63333	4734021	15	9e+05	14700000	1950000	7300000	10275000
G4	6526667	92.46667	4278554	15	9e+05	14250000	3075000	6850000	9750000
G6	6343333	92.50000	3988460	15	9e+05	12200000	2950000	6400000	9875000
I2	5756667	82.53333	3761262	15	9e+05	11950000	2950000	5850000	8700000
I3	5080000	73.83333	3070703	15	9e+05	10600000	2875000	5800000	6950000
I4	5363333	77.60000	3453387	15	9e+05	11550000	2600000	5550000	7525000
I5	5823333	83.66667	3708863	15	9e+05	12250000	2525000	6400000	8525000

Sgroups

	y	groups
G6	92.50000	a
G4	92.46667	a
G3	89.63333	a
G2	87.50000	a
I5	83.66667	a
I2	82.53333	a
BM6	81.53333	a
I4	77.60000	a
C	76.33333	a
G1	75.40000	a
I3	73.83333	a

Con un $\alpha=0.05$, no se puede afirmar que los tratamientos sean diferentes al control.

ANEXO 3: Tabla de alimentación (Modificada de MAGAP y Concepto Azul, 2015).

Días de cultivo	Estadío	Alimento (cel/ml)		
		<i>Isochrysis galbana</i>	<i>C. gracillis</i>	TOTAL
1	Larva D	5,000	-	5,000
2	Larva D	7,000	-	7,000
3	Larva D	9,000	-	9,000
4	Larva D	11,000	-	11,000
5	Larva D	13,500	1,500	15,000
6	Larva D	17,100	1,900	19,000
7	Larva umbonada	20,700	2,300	23,000
8	Larva umbonada	24,300	2,700	27,000
9	Larva umbonada	24,800	6,200	31,000
10	Larva umbonada	28,000	7,000	35,000
11	Larva umbonada	31,200	7,800	39,000
12	Larva umbonada	34,400	8,600	43,000
13	Larva umbonada	37,600	9,400	47,000
14	Larva con ojo	35,700	15,300	51,000
15	Larva con ojo	38,500	16,500	55,000
16	Larva con ojo	41,300	17,700	59,000
17	Larva con ojo	31,500	31,500	63,000
18	Larva pediveliger	33,500	33,500	67,000
19	Larva pediveliger	35,500	35,500	71,000
20	Larva pediveliger	30,000	45,000	75,000
21	Larva pediveliger	31,600	47,400	79,000
22	Larva pediveliger	33,200	49,800	83,000
23	Larva pediveliger	34,800	52,200	87,000
24	Larva pediveliger	36,400	54,600	91,000
25	Larva pediveliger	38,000	57,000	95,000
26	Larva pediveliger	39,600	59,400	99,000
27	Larva pediveliger	41,200	61,800	103,000
28	Larva pediveliger	42,800	64,200	107,000
29	Larva asentada	44,400	66,600	111,000
30	Larva asentada	46,000	69,000	115,000

ANEXO 4: Cálculos para determinar el ahorro en L del cultivo de microalgas al inocular las cepas bacterianas.

➤ *Isochrysis galbana*

Días de cultivo	C2 (cel/ml)	V2 (L)	Control		<i>Lysinibacillus sp.</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
			C1 (cel/ml)	V1 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)
1	5,000	10,000	8,150,000	6	10,450,000	5	8,766,667	6
2	7,000	10,000	8,150,000	9	10,450,000	7	8,766,667	8
3	9,000	10,000	8,150,000	11	10,450,000	9	8,766,667	10
4	11,000	10,000	8,150,000	13	10,450,000	11	8,766,667	13
5	13,500	10,000	8,150,000	17	10,450,000	13	8,766,667	15
6	17,100	10,000	8,150,000	21	10,450,000	16	8,766,667	20
7	20,700	10,000	8,150,000	25	10,450,000	20	8,766,667	24
8	24,300	10,000	8,150,000	30	10,450,000	23	8,766,667	28
9	24,800	10,000	8,150,000	30	10,450,000	24	8,766,667	28
10	28,000	10,000	8,150,000	34	10,450,000	27	8,766,667	32
11	31,200	10,000	8,150,000	38	10,450,000	30	8,766,667	36
12	34,400	10,000	8,150,000	42	10,450,000	33	8,766,667	39
13	37,600	10,000	8,150,000	46	10,450,000	36	8,766,667	43
14	35,700	10,000	8,150,000	44	10,450,000	34	8,766,667	41
15	38,500	10,000	8,150,000	47	10,450,000	37	8,766,667	44
16	41,300	10,000	8,150,000	51	10,450,000	40	8,766,667	47
17	31,500	10,000	8,150,000	39	10,450,000	30	8,766,667	36
18	33,500	10,000	8,150,000	41	10,450,000	32	8,766,667	38
19	35,500	10,000	8,150,000	44	10,450,000	34	8,766,667	40
20	30,000	10,000	8,150,000	37	10,450,000	29	8,766,667	34
21	31,600	10,000	8,150,000	39	10,450,000	30	8,766,667	36
22	33,200	10,000	8,150,000	41	10,450,000	32	8,766,667	38
23	34,800	10,000	8,150,000	43	10,450,000	33	8,766,667	40
24	36,400	10,000	8,150,000	45	10,450,000	35	8,766,667	42
25	38,000	10,000	8,150,000	47	10,450,000	36	8,766,667	43
26	39,600	10,000	8,150,000	49	10,450,000	38	8,766,667	45
27	41,200	10,000	8,150,000	51	10,450,000	39	8,766,667	47
28	42,800	10,000	8,150,000	53	10,450,000	41	8,766,667	49
29	44,400	10,000	8,150,000	54	10,450,000	42	8,766,667	51
30	46,000	10,000	8,150,000	56	10,450,000	44	8,766,667	52
TOTAL				1,101		859		1,024

➤ *Chaetoceros gracilis*

Días de cultivo	Control		<i>Psychrobacter</i> sp.		<i>Lysinibacillus</i> sp.		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
	C2 (cel/ml)	V2 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)	C1 (cel/ml)	V1 (L)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,500	10,000	3,383,333	4	4,966,667	3	5,150,000	3	4,983,333	3
6	1,900	10,000	3,383,333	6	4,966,667	4	5,150,000	4	4,983,333	4
7	2,300	10,000	3,383,333	7	4,966,667	5	5,150,000	4	4,983,333	5
8	2,700	10,000	3,383,333	8	4,966,667	5	5,150,000	5	4,983,333	5
9	6,200	10,000	3,383,333	18	4,966,667	12	5,150,000	12	4,983,333	12
10	7,000	10,000	3,383,333	21	4,966,667	14	5,150,000	14	4,983,333	14
11	7,800	10,000	3,383,333	23	4,966,667	16	5,150,000	15	4,983,333	16
12	8,600	10,000	3,383,333	25	4,966,667	17	5,150,000	17	4,983,333	17
13	9,400	10,000	3,383,333	28	4,966,667	19	5,150,000	18	4,983,333	19
14	15,300	10,000	3,383,333	45	4,966,667	31	5,150,000	30	4,983,333	31
15	16,500	10,000	3,383,333	49	4,966,667	33	5,150,000	32	4,983,333	33
16	17,700	10,000	3,383,333	52	4,966,667	36	5,150,000	34	4,983,333	36
17	31,500	10,000	3,383,333	93	4,966,667	63	5,150,000	61	4,983,333	63
18	33,500	10,000	3,383,333	99	4,966,667	67	5,150,000	65	4,983,333	67
19	35,500	10,000	3,383,333	105	4,966,667	71	5,150,000	69	4,983,333	71
20	45,000	10,000	3,383,333	133	4,966,667	91	5,150,000	87	4,983,333	90
21	47,400	10,000	3,383,333	140	4,966,667	95	5,150,000	92	4,983,333	95
22	49,800	10,000	3,383,333	147	4,966,667	100	5,150,000	97	4,983,333	100
23	52,200	10,000	3,383,333	154	4,966,667	105	5,150,000	101	4,983,333	105
24	54,600	10,000	3,383,333	161	4,966,667	110	5,150,000	106	4,983,333	110
25	57,000	10,000	3,383,333	168	4,966,667	115	5,150,000	111	4,983,333	114
26	59,400	10,000	3,383,333	176	4,966,667	120	5,150,000	115	4,983,333	119
27	61,800	10,000	3,383,333	183	4,966,667	124	5,150,000	120	4,983,333	124
28	64,200	10,000	3,383,333	190	4,966,667	129	5,150,000	125	4,983,333	129
29	66,600	10,000	3,383,333	197	4,966,667	134	5,150,000	129	4,983,333	134
30	69,000	10,000	3,383,333	204	4,966,667	139	5,150,000	134	4,983,333	138
TOTAL				2,437		1,660		1,601		1,654