



UNIVERSIDAD ESTATAL
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“UTILIZACIÓN DE MICROALGAS (DIATOMEAS BENTÓNICAS) ASOCIADAS AL PERIFITON SOBRE SUSTRATOS ARTIFICIALES EN EL SISTEMA DE CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) REALIZADO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CAMARONERA MARINAZUL S.A. TUMBES - PERÚ”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

TAYRON PATRICIO VERA VERA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2010

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENINSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“UTILIZACIÓN DE MICROALGAS (DIATOMEAS BENTÓNICAS) ASOCIADAS AL PERIFITON SOBRE SUSTRATOS ARTIFICIALES EN EL SISTEMA DE CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) REALIZADO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CAMARONERA MARINAZUL S.A. TUMBES - PERÚ”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

TAYRON PATRICIO VERA VERA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2010

DECLARATORIA EXPRESA

La responsabilidad por las investigaciones, resultados y discusiones expuesta en ésta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la empresas **Conceptazul S.A.**, **Marinazul S.A.**, y a la **Universidad Estatal Península de Santa Elena**.

TAYRON PATRICIO VERA VERA

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por darme el don de la vida, por estar siempre conmigo y por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este triunfo.

A mis padres, Juan Vera y Dolores Vera por confiar en mí y sobre todo por ser la fuente de inspiración y motivación para superarme cada día

Sinceramente a ustedes dedico el presente trabajo

TAYRON PATRICIO VERA VERA

AGRADECIMIENTO

Agradecimientos, a Dios por ser mi fortaleza, por proveerme de todo lo necesario para salir adelante y por la oportunidad que me ha brindado de aprender, mejorar y de crecer junto a personas tan especiales para mí.

A mis padres y hermanos por el apoyo incondicional que siempre me dan, en especial a mi madre por todos los sacrificios realizados a lo largo de mi carrera, así como su comprensión y paciencia demostrada.

A los directivos de Concepto Azul S.A. por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de mi trabajo.

Al personal de la camaronera Marinazul S.A., en especial al grupo de Ingenieros por su amistad y cooperación y sobre todo a su gerente general, el Sr. Walter Carlson, sinceramente muchas gracias por la confianza depositada en mi persona.

Al grupo de compañeros que formamos parte del Proyecto Perifiton, porque a pesar de todos los momentos difíciles que tuvimos pudimos salir adelante con nuestro trabajo, por su paciencia y comprensión muchas gracias.

A mis amigos MsC Mayra Valdez y Benoit Diringer, por su espíritu investigativo, su tiempo y disponibilidad que me han brindado para la realización de este trabajo.

A mi gran amigo MsC Juan Luzardo, por ser un gran maestro y una gran persona que con sus conocimientos y paciencia ha contribuido grandemente a mi formación profesional.

Mi satisfacción y agradecimiento a las autoridades de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, al personal que conforman el Departamento de Bienestar Estudiantil, que me extendieron su mano en momentos difíciles, permitiéndome continuar con mis estudios. Al Ing. Gonzalo Tamayo Castañeda, Decano de la Facultad de Ciencias del Mar y al Blgo. Richard Duque Marín, Director Académico de la Escuela de Biología Marina, muchas gracias por las oportunidades brindadas.

A la Blga Mayra Cuenca y a la MsC Janeth Galarza por sus valiosas sugerencias y acertados aportes.

A mis amigos y hermanos de lucha Douglas, Ronny, Claudio, Juan, Jessica, Nelly, Dennis y Mexy, por su lealtad y comprensión brindada cada día.

Como olvidar aquellas personas que han hecho grata mi estancia durante la ejecución del presente estudio, nunca los olvidaré y de corazón que Dios los bendiga compañeros: Fernanda, Lisbeth, Pilar, Yovani, Cesar y Efraim.

A todos, mi mayor reconocimiento y gratitud.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano de la Facultad de
Ciencias del Mar

Blgo. Richard Duque M.

Director de la Escuela de
Biología Marina

Blga. Tanya Gonzales B.

Docente Área

Blga. Mayra Cuenca

Profesor Tutor

MsC. Milton Zambrano C.

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN	4
1.2. HIPÓTESIS	6
1.3. OBJETIVO GENERAL	7
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7

CAPÍTULO II

PRODUCCIÓN ACUÍCOLA	9
2.1.1. Producción de Crustáceos	9
2.1.2. Camaronicultura	10
PERIFITON	13
2.2.1 Definición	13
2.2.2 Composición	13
2.2.2.1 Microalgas Bénticas	13
2.2.2.1.1 Diatomeas Bénticas	15
2.2.3 Procesos de Colonización	17
2.2.4 Importancia	19

2.2.4.1. Perifiton Como Base de la Cadena Alimenticia.....	19
2.2.4.2. Perifiton Como Regulador de la Calidad del Agua.....	21
2.2.4.3. Perifiton en la Producción Acuícola.....	25
2.2.4.3.1. Perifiton en el Sistema de Cultivo de Camarón.....	26
2.2.4.3.1.1. Perifiton - Larvicultura.....	27
2.2.4.3.1.2. Perifiton - Sistema de Engorde.....	31
DIATOMEAS.....	34
2.3.1 Generalidades.....	34
2.3.2 Importancia de las Diatomeas en la Acuicultura.....	34
2.3.2.1. Importancia de las Diatomeas Bentónicas en el sistema de cultivo de camarón.....	36
 CAPÍTULO III	
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	41
3.1. Área de Estudio.....	41
3.2. Materiales y Reactivos.....	42
3.2.1. Aislamiento.....	42
3.2.2. Purificación.....	43
3.2.3. Conservación.....	44
3.2.4. Identificación: Taxonomía Clásica.....	44
3.2.5. Identificación: Taxonomía Molecular.....	45

3.2.6. Cultivo de Microalgas	45
3.2.7. Dinámica de crecimiento	46
3.2.8. Producción: Perifiton Domesticado	46
3.2.9. Evaluación de la Colonización	47
3.2.10. Evaluación del Valor Nutricional	47
3.3. METODOLOGÍA	48
3.3.1. Preparación de Materiales y Medios de Cultivo	48
3.3.1.1. Limpieza y Esterilización de Materiales de Vidrio	48
3.3.1.2. Tratamiento y Esterilización del Agua	48
3.3.1.3. Preparación de medio de cultivo líquido	48
3.3.1.4. Preparación de Medio de Cultivo Sólido	49
3.3.2. Obtención y Preservación de Cepas de Diatomeas Bentónicas	49
3.3.2.1. Recolección y Tratamiento de Muestras	50
3.3.2.2. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas	50
3.3.2.2.1. Diluciones sucesivas	51
3.3.2.2.2 Captura con micropipeta	51
3.3.2.2.3 Siembra en placas	52
3.3.2.3. Purificación de Diatomeas Bentónicas	53
3.3.2.3.1. Purificación con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)	54
3.3.2.4. Conservación de las cepas de Diatomeas Bentónicas	55
3.3.2.4.1. Conservación de las Cepas de Diatomeas Bentónicas: Criopreservación ..	56
3.3.3. Identificación de las Cepas de Diatomeas Bentónicas	58

3.3.3.1. Taxonomía Molecular.....	60
3.3.3.1.1. Extracción de ADN.....	61
3.3.3.1.2. Amplificación por PCR.....	62
3.3.3.1.3. Migración en electroforesis.....	62
3.3.3.1.4. Secuenciación y clasificación taxonómica.....	63
3.3.4. Cultivo de Microalgas.....	63
3.3.4.1. Determinación de la Dinámica de Crecimiento.....	65
3.3.5. Producción de Perifiton Domesticado – Pruebas de Colonización.....	67
3.3.5.1. Evaluación de la colonización de las fibras de geotextil por Microscopia Confocal (LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy).....	68
3.3.6. Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas en Base al Cultivo de Post-Larvas <i>Litopenaeus vannamei</i>	69
3.3.6.1. Diseño experimental.....	70
3.3.6.2. Suministro de larvas.....	70
3.3.6.3. Aclimatación y Siembra.....	71
3.3.6.4. Manejo de la alimentación.....	71
3.3.6.5. Registro de parámetros: Físico – Químicos.....	72
3.3.6.6. Análisis de Parámetros Biológicos.....	72

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 73

4.1. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas..... 73

4.2. Purificación de Diatomeas Bentónicas.....	74
4.3. Conservación de las cepas de Diatomeas Bentónicas.....	76
4.4. Identificación de las cepas de Diatomeas Bentónicas.....	78
4.4.1. Taxonomía Clásica.....	78
4.4.1.1. Diatomea 1: <i>Amphora sp. 1</i>	79
4.4.1.2. Diatomea 2: <i>Amphora sp. 2</i>	79
4.4.1.3. Diatomea 5: <i>Navicula sp. 1</i>	80
4.4.1.4. Diatomea 7: <i>Nitzschia sp</i>	80
4.4.1.5. Diatomea 10: <i>Navicula sp. 2</i>	80
4.4.1.6. Diatomea 12: <i>Amphiprora sp</i>	81
4.4.2. Taxonomía Molecular.....	81
4.5. Cultivo de Microalgas.....	83
4.6. Perifiton Domesticado – Pruebas de Colonización Monoespecífico.....	86
4.7. Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas.....	89
4.7.1. Parámetros Físico - Químicos.....	89
4.7.2. Supervivencia – Peso y Biomasa.....	89

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	94
5.1. CONCLUSIONES.....	94
5.2 RECOMENDACIONES.....	97

BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS	119

ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
I.	Tabla Taxonomía Molecular: Principales Características de los Iniciadores...	121
II.	Tabla Condiciones de Amplificación empleadas para cada juego de Primers..	121
III.	Tabla Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos de 10 mL – 1000 mL.	121
IV.	Tabla Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos de 10 L – 100 L.....	122
V.	Tabla Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos Masivos - 1 Tonelada.....	122
VI.	Tabla Volúmenes Utilizados en el Aumento Progresivo de los Cultivos.....	123
VII.	Tabla Parámetros considerados para la Evaluación de la Colonización de las Fibras de Geotextil por Microscopia Confocal (LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy).....	123
VIII.	Tabla Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas: Manejo de la Alimentación.....	123
IX.	Tabla Cepas Aisladas: Origen, Condiciones Iniciales (T °C – %) y Método de Aislamiento.....	124
X.	Tabla Conservación de Cepas Aisladas: Conservación a 4 °C y Criopreservación o Criopreservación a - 196 °C.....	124
XI.	Tabla Taxonomía Molecular: Secuencias obtenidas de los productos amplificados (amplicones) con el juego de primers p23SrV-f1/r1 de las cepas D2, D7, D10, D12. Zona sombreada corresponde a la región analizada en el banco de genes.....	125
	Tabla Taxonomía Molecular: Secuencias obtenidas de los productos	126

XII.	amplificados (amplicones) con el juego de primer ITS1-DiatomF/R de las cepas D1 y D5 (D2 y D12 no se obtuvieron amplicones). Zona sombreada corresponde a la región analizada en el banco de genes.....	
Tabla	Identificación de las cepas: Taxonomía Clásica y Taxonomía Molecular.....	127
XIII.		
Tabla	Ecuaciones de regresión lineal: x = densidad óptica, y = Densidad o concentración celular (número de células / mL).....	127
XIV.		
Tabla	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphora salina</i> en diferentes volúmenes...	128
XV.		
Tabla	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphora sp</i> en diferentes volúmenes.....	128
XVI.		
Tabla	Dinámica de Crecimiento de <i>Nitzschia sp</i> en diferentes volúmenes.....	129
XVII.		
Tabla	Dinámica de Crecimiento de <i>Navícula veneta</i> en diferentes volúmenes...	129
XVIII.		
Tabla	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphiprora sp.</i> en diferentes volúmenes...	130
XIX.		
Tabla	Dinámica de Colonización de cada una de las Cepas de Microalgas en las Fibras de Geotextil durante 8 días.....	130
XX.		
Tabla	Porcentaje de Supervivencia, Peso Promedio y Biomasa obtenida al final de la experimentación.....	131
XXI.		
Tabla	Supervivencia: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.....	131
XXII.		
Tabla	Peso Promedio: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.....	132
XXIII.		
Tabla	Biomasa: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.....	132
XXIV.		

Tabla XXV.	Registro de Parámetros Físico – Químicos (Temperatura, Salinidad, pH y Oxígeno Disuelto).....	133
------------	---	------------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráf. 1. Curva de Regresión Lineal - <i>Amphora salina</i>	135
Gráf. 2. Curva de Regresión Lineal - <i>Amphora sp</i>	135
Gráf. 3. Curva de Regresión Lineal - <i>Nitzschia sp</i>	136
Gráf. 4. Curva de Regresión Lineal - <i>Navícula veneta</i>	136

Gráf. 5.	Curva de Regresión Lineal – <i>Amphiprora sp</i>	137
Gráf. 6.	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphora salina</i> durante 8 días de cultivo..	137
Gráf. 7.	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphora sp</i> durante 8 días de cultivo.....	138
Gráf. 8.	Dinámica de Crecimiento de <i>Nitzschia sp</i> durante 8 días de cultivo.....	138
Gráf. 9.	Dinámica de Crecimiento de <i>Navícula veneta</i> durante 8 día.....	139
Gráf. 10.	Dinámica de Crecimiento de <i>Amphiprora sp</i> durante 8 días de cultivo...	139
Gráf. 11.	Dinámica de Colonización del Geotextil de las Cepas de Diatomeas.....	140
Gráf. 12.	Supervivencia obtenida en cada tratamiento.....	140
Gráf. 13.	Peso promedio obtenido en cada tratamiento.....	141
Gráf. 14.	Biomasa obtenida en cada tratamiento.....	141
Gráf. 15.	Índice de Supervivencia, Peso y Biomasa obtenidos en cada tratamiento	142

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Recolección y tratamiento de muestras.....	144
Esquema 2. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas: Diluciones sucesivas.....	145
Esquema 3. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas: Captura con micropipeta.....	146
Esquema 4. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas: Siembra en Placa.....	147
Esquema 5a. Purificación de Cepas con Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂).....	148
Esquema 5b. Purificación de Cepas: Determinación de la Carga Bacteriana y Evaluación del Estado de la Cepa de Microalgas.....	149
Esquema 6a. Conservación de Cepas de Diatomeas Bentónicas: Criopreservación.	150
Esquema 6b. Criopreservación: Evaluación de la Viabilidad de la Cepa.....	151
Esquema 7a. Identificación de Diatomeas Bentónicas: Preparación de Muestras....	152
Esquema 7b. Identificación de Diatomeas Bentónicas por Microscopia Confocal...	153
Esquema 8a. Taxonomía Molecular: Extracción de ADN.....	154

Esquema	Taxonomía	
8b.	Molecular.....	155
Esquema 9.	Cultivo de Microalgas: Mantenimiento y Producción.....	156
Esquema	Determinación de la Dinámica de	
10.	Crecimiento.....	
Esquema	Pruebas de Colonización: Análisis Cuantitativo y	
11.	Cualitativo...	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Fig Diagrama de una Pesquería de Parques de Ramas de Tipo Acadjas – . 1. Kathas – Samarahs: a) Vista superior b) Vista transversal.....	158
Fig Esquema del proceso de Domesticación del . 2. Perifiton.....	158
Fig Sustrato AquaMats®. a) Sustratos sin colonizar. b) y c) Sustratos . 3. colonizados.....	159
Fig Estructura vertical de la Comunidad . 4. Perifítica.....	159
Fig Ubicación Geográfica de la Camaronera Marinazul S.A. campo . 5. Paracas. Distrito de Aguas Verdes de la provincia de Zarumilla del departamento Tumbes – Perú.....	160
Fig Ubicación Geográfica del “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas . 6. de Langostino - Marinazul S.A.” ubicada en la caleta de Punta Mero, distrito de Canoas de Punta Sal del departamento de Tumbes – Perú...	161
Fig Sustrato empleado: Geotextil - fibras de . 7. polipropileno.....	162
Fig Acondicionamiento del Sustrato: Colocación de pesos y . 8. flotadores.....	162
Fig Ubicación de sustratos en estanques de cultivo Semi- . 9. intensivo.....	163
Fig Ubicación de sustratos en estanques de cultivo . 10. Intensivo.....	163

Fig	Recolección de muestras a partir de cortes de un área de 25	
.	cm ²	
11.		164
Fig	Aislamiento de Microalgas: Diluciones Sucesivas en	
.	Microplacas.....	
12.		164
Fig	Aislamiento de Microalgas: Captura con	
.	Micropipeta.....	
13.		165
Fig	Aislamiento de Microalgas: Siembra en Medio	
.	Sólido.....	
14.		165
Fig	Medio Guillard F/2 solidificado: Crecimiento de Diatomeas y	
.	Bacterias..	
15.		166
Fig	Purificación con Peróxido de Hidrógeno - Tratamientos	
.	empleados.....	
16.		166
Fig	Purificación con Peróxido de Hidrógeno – Siembra en Medio F/2	
.	solidificado.....	
17.	167
Fig	Purificación con Peróxido de Hidrógeno – Determinación de la Carga	
.	Bacteriana.....	
18.	167
Fig	Conservación de Cepas de Diatomeas: Medio Líquido – 10	
.	mL.....	
19.		168
Fig	Conservación de Cepas de Diatomeas: Medio Solidificado – a) y b)	
.	Placas Petri c) Agar	
20.	Inclinado.....	168
Fig	Criopreservación de Cepas de Diatomeas: Nitrógeno líquido - 196	169

.	°C.....	
21.		
Fig	Identificación de Cepas de Diatomeas: Microscopio invertido	
.	Olympus	IX-
22.	FLA.....	169
Fig	Identificación de Cepas de Diatomeas: Microscopio Confocal	
.	Olympus	FLUOVIEW
23.	1000.....	170
Fig	Taxonomía Molecular: a) PCR – b) Obtención del amplicon – c)	
.	Secuenciación – d) Análisis en el Programa	
24.	Blast.ncbi.....	170
Fig	Cepario de Microalgas: Cultivos de 10 mL – 100 mL – 1	
.	L.....	
25.		171
Fig	Cultivos Iniciales – Cultivos de 10	
.	mL.....	
26.		172
Fig	Cultivos Iniciales – Cultivos de 100	
.	mL.....	
27.		173
Fig	Cultivos Iniciales – Cultivos de 1	
.	Litro.....	
28.		174
Fig	Cultivos Intermedios – Cultivos de 10	
.	Litros.....	
29.		175
Fig	Cultivos Intermedios – Cultivos de 100	
.	Litros.....	
30.		176
Fig	Cultivos Masivos – Cultivos de 1	
.	Tonelada.....	177

31.	Fig Dinámica de Crecimiento: Crecimiento Poblacional a través del . Tiempo..	
32.	Fig Colonización de Geotextiles con Bacterias (<i>Bacillus</i> sp): a) . Acondicionamiento de Sustratos, b) Fibras de Geotextil colonizadas 33. por Bacterias (10^4 UFC / cm ²).....	178
34.	Fig Producción de Perifiton Domesticado: 5 pedazos de geotextil 50 x 40 . cm (2000 cm ²) en 100 L de cultivo 34. monoalgal.....	179
35.	Fig Evaluación de la Colonización de las Fibras de Geotextil: a) . Extracción de muestras, b) Análisis por LSCM, c) y d) Observación 35. de Microalgas y Bacterias.....	179
36.	Fig Diseño Experimental: Recipientes Plásticos de 7 L provistos con 5 L . de agua de mar (34 %). y con suministro de 36. aire.....	180
37.	Fig Aclimatación y Siembra de Post – Larvas <i>Litopenaeus vannamei</i> . (PL10).	180
38.	Fig Ubicación de Geotextiles Maduros (Colonizados) - Fragmentos de 5 . X 20 cm considerando la relación del 30 % del área de 38. fondo.....	181
39.	Fig Registro de Parámetros Físicos - Químicos: Temperatura y . pH.....	181
40.	Fig Evaluación del Valor Nutricional de las cepas de Microalgas en base . al Cultivo de Post-Larvas <i>Litopenaeus</i> 40. <i>vannamei</i>	182

Fig	Aislamiento de Microalgas: Diatomeas con un ritmo de crecimiento bajo. a) Cymbella – b) d) e) g) h) i) Navícula – c) Nitzschia – f)	
41.	Amphora.....	183
Fig	Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 1 y Diatomea 2: Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con	
42.	30 ppm de H ₂ O ₂	183
Fig	Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 7 y Diatomea 12: Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con	
43.	30 ppm de H ₂ O ₂	184
Fig	Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 10: Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con 30 ppm de	
44.	H ₂ O ₂	184
Fig	Purificación de Diatomeas Bentónicas: Inhibición del Crecimiento Algal a partir de Concentraciones Superiores a 30 ppm de H ₂ O ₂ (D1 -	
45.	D2 - D7 - D10 - D12).....	185
Fig	Purificación de Diatomeas Bentónicas: Inhibición del Crecimiento Algal a partir de Concentraciones de 10 ppm de H ₂ O ₂	
46.	(D5).....	185
Fig	Criopreservación: a) Muestras criopreservadas. b) Muestras reactivadas.	
47.		186
Fig	Criopreservación: Muestras criopreservadas, presencia de cloroplastos contraídos (Viabilidad de la cepa	
48.	afectada).....	186
Fig	Frústulos de Diatomea 1: <i>Amphora salina</i>	
49.		187
Fig	Morfología de Diatomea 1: <i>Amphora salina</i> (Microscopio	188

. Invertido).....	
50.	
Fig Morfología de Diatomea 1: <i>Amphora salina</i> (Microscopia	
. Confocal).....	
51.	189
Fig Frústulos de Diatomea 2: <i>Amphora</i>	
. <i>sp</i>	
52.	190
Fig Morfología de Diatomea 2: <i>Amphora sp</i> (Microscopio	
. Invertido).....	
53.	191
Fig Morfología de Diatomea 2: <i>Amphora sp.</i> (Microscopia	
. Confocal).....	
54.	192
Fig Frústulos de Diatomea 5: <i>Sellaphora</i>	
. <i>sp</i>	
55.	193
Fig Morfología de de Diatomea 5: <i>Sellaphora sp</i> (Microscopio	
. Invertido).....	
56.	194
Fig Morfología de de Diatomea 5: <i>Sellaphora sp</i> (Microscopia	
. Confocal)....	
57.	195
Fig Frústulos de Diatomea 7: <i>Nitzschia</i>	
. <i>sp</i>	
58.	196
Fig Morfología de Diatomea 7: <i>Nitzschia sp.</i> (Microscopio	
. Invertido).....	
59.	197
Fig Morfología de Diatomea 7: <i>Nitzschia sp.</i> (Microscopio	
. Confocal).....	198

60.					
Fig	Frústulos	de	Diatomea	10:	<i>Navicula</i>
.	<i>veneta</i>			
61.					199
Fig	Morfología de	Diatomea	10:	<i>Navicula veneta</i>	(Microscopio
.	Invertido)	...			
62.					200
Fig	Morfología de	Diatomea	10:	<i>Navicula veneta</i>	(Microscopio
.	Confocal)			
63.					201
Fig	Frústulos	de	Diatomea	12:	<i>Amphiprora</i>
.	<i>sp</i>			
64.					202
Fig	Morfología de	Diatomea	12:	<i>Amphiprora sp.</i>	(Microscopio
.	Invertido)			
65.					203
Fig	Morfología de	Diatomea	12:	<i>Amphiprora sp.</i>	(Microscopio
.	Confocal)			
66.					204
Fig	Obtención de Amplicones (400 – 450 pb) de las Cepas D2, D7, D10,				
.	D12 aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1.				
67.				205
Fig	Obtención de Amplicones (950 - 1000 pb) de las Cepas D1, D5				
.	aplicando el juego de primers ITS1-DiatomF/R. Las muestras D12 y				
68.	D2			no	
	amplificaron			205
Fig	Evaluación Macroscópica de la Colonización del Geotextil por				
.	<i>Nitzschia</i> .				
69.					206
Fig	Evaluación Microscópica de la Colonización del Geotextil por				
.	<i>N.veneta</i> ..				206

70.				
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphora salina</i> durante tres días (10			
.	X).			
71.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			207
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphora salina</i> durante tres días (40			
.	X).			
72.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			208
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphora sp</i> durante tres días (10 X).			
.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
73.	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			209
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphora sp</i> durante tres días (40 X).			
.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
74.	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			210
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Nitzschia sp</i> durante tres días (10 X).			
.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
75.	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			211
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Navicula veneta</i> durante seis días (10			
.	X).			
76.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			
	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y			
	Bacterias).....			212
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Navicula veneta</i> durante seis días (40			
.	X).			
77.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras			213

	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y Bacterias).....	
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphiprora sp</i> durante seis días (10 X).	
.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras	
78.	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y Bacterias).....	214
Fig	Dinámica de Colonización de <i>Amphiprora sp</i> durante seis días (40 X).	
.	a) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil b) Microalgas y Fibras	
79.	de Geotextil c) Microalgas d) Microalgas y Bacterias).....	216
Fig	Evaluación del Consumo de Microalgas por Microscópica Confocal:	
.	Observación de Residuos de	
80.	Clorofila.....	218
Fig	Evaluación de la presencia de Microalgas (<i>Amphora salina</i> y	
.	<i>Amphora sp</i>) en el Sustrato al Inicio y al Final de la	
81.	Experimentación.....	219
Fig	Evaluación de la presencia de Microalgas (<i>Nitzschia sp</i> y <i>Navícula</i>	
.	<i>veneta</i>) en el Sustrato al Inicio y al Final de la	
82.	Experimentación.....	219
Fig	Evaluación de la presencia de Microalgas y Bacterias (<i>Amphiprora</i>	
.	<i>sp</i> y <i>Bacillus sp</i>) en el Sustrato al Inicio y al Final de la	
83.	Experimentación.....	220

GLOSARIO Y SIMBOLOGÍA

Acadjas: Es una forma tradicional de acuicultura de poca tecnología que se practica en aguas continentales y salobres. Los acadjas se hacen de muchas formas y tamaños, pero fundamentalmente consisten en un núcleo interior o círculo concéntrico de ramas de árboles con muchas ramificaciones rodeados de una estructura exterior de madera.

ADN: El ácido desoxirribonucleico, es una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.

Amilasas: La amilasa, es un enzima hidrolasa que tiene la función de digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples.

AquaMats: Es un producto de uso acuícola, fabricado con sustratos sintéticos altamente especializados para producir suplementos alimenticios orgánicos a

partir de procesos naturales, además provee una estructura acuática, que soporta mayores densidades de cultivo y reduce la depredación.

Bio-flocs: Hace referencia a una comunidad microbiana aerobia asociada a la materia orgánica, la cual se desarrolla gracias a la aireación y suspensión constante de los sólidos presentes en el cuerpo de agua, permitiendo así el reciclaje continuo de nutrientes y su conversión en biomasa microbiana, que pueden ser usados para la alimentación de camarones o peces, dados sus hábitos alimenticios omnívoros

Cepa: Conjunto de microorganismos de una misma especie, es decir que tienen el mismo patrimonio genético.

Colonización: Acción y efecto de colonizar; la colonización está fundamentada en las adaptaciones que presentan los organismos y que les permiten la dispersión para invadir nuevos hábitats; las especies o poblaciones que son colonizadoras, presentan una gran capacidad adaptativa.

Domesticación: Se denomina domesticación al proceso por el cual una población de una determinada especie pierde, adquiere o desarrolla ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento, los cuales son heredables y, además, son el resultado de una interacción prolongada y de una selección deliberada por parte del ser humano.

Epifítico: Relativo a epifito; organismo que se desarrolla sobre otro, pero que no toma ningún alimento del hospedante, éste únicamente le presta el soporte adecuado.

Eutrofización: En ecología el término eutrofización designa el enriquecimiento en nutrientes de un ecosistema. El uso más extendido se refiere específicamente al aporte masivo de nutrientes en un ecosistema acuático.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Brinda sus servicios tanto a países desarrollados, como a países en transición a modernizarse y a mejorar sus actividades agrícolas, forestales y pesqueras, con el fin de asegurar una buena nutrición para todos.

Fitoplancton.- (Fito=planta) (Plancton=a la deriva). Organismos acuáticos vegetales de pequeño tamaño, integrantes del plancton.

Frústulo: Cada una de las dos valvas que forman el esqueleto de las diatomeas.

Geotextil: El geotextil es una lámina de fieltro punzonado, no tejido, fabricado a partir de fibras especiales de poliéster o de polipropileno.

Glicerol: Es un a producto químico también llamado comúnmente glicerina o glicerina. Es un incoloro, inodoro, viscoso líquido ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas.

Kathas: Similar a los sistemas Acadjas, es el método tradicional de cultivo de peces aplicada en ríos donde sustratos naturales, especialmente ramas de arboles se utilizan como un medio para la fijación de algas. Permite incrementar la producción pesquera en un 33 %.

Litotróficas: Organismos autótrofos que obtienen energía mediante reacciones de óxido reducción, son conocidos también como quimoautótrofos.

LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy – Microscopio Confocal a Barrido Laser. Se basa en la observación de la fluorescencia emitida (luz de emisión) por diferentes elementos o moléculas cuando están excitados por una iluminación específica (luz de excitación).

Macrofitas: Algas y /o plantas acuáticas visibles sin instrumentos ópticos, que presentan una productividad primaria importante.

Monoespecífico: De una sola especie.

Mucilaginoso: Que tiene alguna propiedad del mucílago, sustancia viscosa que se halla en ciertas partes de algunas plantas, suele tener una función protectora o de fijación.

Mysis: Tercera fase larvaria de los crustáceos decápodos.

Nauplius: Primera fase larvaria de los crustáceos decápodos.

Penaidae: Crustáceos nadadores con el rostro bien desarrollado, con dientes en el borde dorsal sólo o en ambos. Sexos separados y fáciles de diferenciar; en el macho, los endopodios del primer par de pleópodos se han transformado en un órgano copulador que emplea para transferir a la hembra un espermatóforo que se fija a la base del cuarto y quinto par del periópodos. Los huevos, tras la fecundación, no son retenidos para ser incubados.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Pleura: Corresponde a los bordes de las semitecas, y de acuerdo a ello se denominan EPIPLEURA o HIPOPLEURA.

Primers: Conocidos también como iniciadores o cebadores, son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región, complementaria al ADN molde, que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la *Taq* ADN polimerasa.

Valvas: Región superior de la epiteca y la inferior de la hipoteca, según corresponda, se nombran EPIVALVA o HIPOVALVA.

Zoea: Segunda fase larvaria de los crustáceos decápodos.

ABREVIATURAS

BP: Baculovirus penaei.

C: Carbono

cel/mL: Células por mililitro.

cm: Centímetros

cm²: Centímetros Cuadrados.

CO₂: Dióxido de Carbono.

DHA: Ácido docosahexanoico.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

D.O: Densidad Óptica.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EPA: Ácido Eicosapentanoico.

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares.

F: Forward.

g: Gramos

Ha: Hectárea.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

IHHNV: Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.

Ind: Individuos.

Kg: Kilogramo.

KMnO₄: Permanganato de potasio.

M: Molar

m: Metros

m²: Metros Cuadrados.

m³: Metros Cúbicos

min: Minutos.

mm: Milimetro

mL: Mililitros

nm: Nanómetros.

NHP: Necrosis del Hepatopáncreas.

pb: Pares de Bases.

pH: Potencial de Hidrógeno

PL: Post-Larva

ppm: Partes por Millón

L: Litros

lb/plg² : Libras por Pulgadas cuadradas

UFC: Unidad Formadora de Colonias

µg: Microgramos

µL: Microlitros

µm: Micrometro.

R: Revers

rpm: Revoluciones por minuto.

sp: Especie.

T: Tonelada.

TAE: Tris-acetato-EDTA

TE: Tris HCl-. EDTA

TENS: Tris HCl – EDTA – Na Cl – SDS.

TSB: Tryptic Soy Broth - Caldo Tripticasa de Soya.

TSV: Virus del Síndrome de Taura.

WSSV: Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.

°C: Grados Celsius.

%: Porcentaje.

‰: Partes por Mil.

.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los trabajos enfocados al aprovechamiento del perifiton a nivel acuícola, están destinados a incrementar la productividad natural de los cuerpos de agua, para ello, se introducen superficies sólidas en el sistema de cultivo para permitir el establecimiento de poblaciones sésiles autótrofas y heterótrofas, aumentando así la productividad natural y sirviendo como alimento para los organismos cultivados (Milstein *et al*, 2006).

En diferentes partes del mundo, pescadores adicionan grandes cantidades de sustratos vegetales (bambú, ramas de árboles, etc.) para mejorar la pesca. Los peces aprovechan estos sustratos para refugiarse de los depredadores, para establecer nidos y para alimentarse del perifiton. Estos sistemas son denominados Acadjas en África del oeste, Kathas en Bangladesh y Samarahs en Camboya. (Milstein *et al*, 2006). (Fig. 1).

En Israel, la acuicultura basada en perifiton fue probada en un estanque de tilapia en el que se sumergieron viejos tubos de irrigación como sustratos para el crecimiento del perifiton; después de cuatro meses, tanto las tilapias alimentadas con perifiton natural como las alimentadas con balanceado registraron el mismo peso final, rendimiento, supervivencia y tasa de crecimiento, lo que demostró que la acuicultura basada en el perifiton, es una tecnología apropiada para reducir costos y para desarrollar una producción orgánica rentable de este organismo. (Milstein *et al*, 2006).

En la India se realizaron pruebas para determinar los efectos del perifiton sobre la producción de carpas (Rohu, *Labeo rohita* y Gonia, *Labeo gonius*), para ello se compararon los resultados obtenidos entre el sistema de cultivo tradicional y uno que incluía fragmentos de bambú como sustrato para el desarrollo del perifiton; la producción de Rohu, fue superior en un 75 % en el sistema de cultivo con bambú que el tradicional, mientras que para Gonia, no hubo mayores variaciones entre ambos sistemas. (Azim *et al* 2001a).

Otros estudios, donde se evaluaron la influencia del sustrato AquaMats® (Fig. 3) en la producción de camarón *Litopenaeus vannamei*, indican que la supervivencia en la fase de larvicultura, hasta el estadio de mysis, fue incrementada en más de 75 % con la utilización de éste material, sobre los tanques control o de referencia.

En Venezuela, datos de 8 ciclos de cultivo larvario demostraron que el uso de AquaMats[®], reduce en un 60 % el alimento suplementario y aumenta la supervivencia del 74 a 82 %; mientras que en Ecuador, se utilizaron los sustratos AquaMats[®] para cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*, con los siguientes resultados: un ahorro de 4 días en el ciclo de cultivo, 50 % de ahorro en el uso de artemia, y un 85 % de supervivencia PL-1 y PL-12. (Campaña 2004).

Cabe destacar que uno de los principales grupos que constituyen el perifiton son las microalgas. Siendo, las diatomeas bénticas las que representan un alto potencial como fuente de alimento vivo para los organismos que se cultivan y que presenten hábitos bentónicos al menos en alguna fase de su ciclo de vida. (Siqueiros *et al*, 2004).

Dado que los camarones peneidos son omnívoros bentónicos a partir del estadio de postlarva y consumen diatomeas bentónicas, directa e indirectamente; por lo tanto el manejo de microalgas bentónicas, a partir de dichos estadios representaría una fuente de alimento de alta calidad, debido a que el pastoreo (bidimensional) de éste resultan ser, mecánicamente, más eficiente que la filtración (tridimensional) de fitoplancton (Goldman y Horne. 1994).

1.1. JUSTIFICACIÓN.

El cultivo de camarón representa una de las principales fuentes de ingreso y es la segunda actividad acuícola en términos de valor que genera cerca de 14000 billones de dólares anuales (FAO 2008). Pero, para que dicho sistema de producción se consolide como una actividad económicamente viable y ecológicamente sustentable, debe superar varias barreras entre las que destacan:

- Reducir el impacto de enfermedades infecciosas de origen viral (WSSV, IHHNV, BP, TSV) y bacteriano (ricketsia NHP), a través de la puesta en marcha de medidas de prevención basadas en la utilización exclusiva de larvas sanas provenientes de reproductores certificados, y a mediano plazo, la selección genética de líneas resistentes.
- Reducir los costo de producción; el costo del alimento puede representar hasta el 60 % de los costos totales dentro del cultivo de los camarones peneidos (Akiyama *et al.* 1992). Con la disminución de la disponibilidad

de harina y aceite de pescado, los precios del alimento balanceado se han incrementado a una velocidad remarcable.

- Limitar la producción y/o acumulación de nutrientes, como consecuencia del incremento de los costos de producción y para que los cultivos conserven su rentabilidad se ha optado por intensificar las producciones; en consecuencia, las densidades de cultivos aumentan provocando una acumulación de los compuestos nitrogenados y fosfatados producidos por la descomposición de los desechos de los animales y del alimento no consumido. La acumulación de estos nutrientes tiene un impacto negativo tanto para los cultivos, por efecto de toxicidad, como para el medio ambiente por efecto de eutrofización.

El uso del perifiton se presenta como una solución interesante para estos dos últimos desafíos. La asociación de estos tipos de microorganismos, con capacidad de fijación sobre un soporte, presenta varias ventajas en relación con los microorganismos libres:

- Su productividad resulta ser superior.
- Tienen mayor capacidad de fijación de carbono (Azim *et al.*, 2005).
- El reciclaje de los nutrientes es más eficiente.
- Los microorganismos fijados están más disponibles y asimilables (Dempster *et al.*, 1993).

- La adición de sustratos aumenta artificialmente la superficie de cultivo.

En definitiva, el perifiton presenta la ventaja de alimentar a los camarones con masa microbiana que se estaría regenerando a través de la absorción de los nutrientes del agua. Pero la presencia natural de microorganismos patógenos en el agua de mar implica cierto riesgo al favorecer el cultivo incontrolado de las comunidades microbianas. Por esa razón, el proceso requiere un control total o sea una “domesticación”, así el uso de perifiton domesticado (asociación de microorganismos fijados sobre un sustrato), se presenta como una estrategia interesante para resolver este tipo de problemas.

Por lo que el presente estudio se enfocó en la domesticación del componente microalgal del perifiton, fundamentado principalmente en tres etapas:

- El aislamiento, con el fin de obtener un banco de cepas bentónicas;
- El cultivo, relacionado con la producción a niveles masivos y por último;
- La selección, a través de bioensayos, recuperar aquellos microorganismos que presenten mejores condiciones de fijación a sustratos artificiales y que a su vez resulten ser beneficiosas para el sistema de cultivo de camarón en términos de supervivencia, crecimiento. (Fig. 2).

1.2. HIPÓTESIS.

La utilización de geotextiles inoculados con diatomeas bentónicas dentro del sistema de producción de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* ayudará a mejorar los niveles de supervivencia y crecimiento de estos organismos.

1.3. OBJETIVO GENERAL.

- ✓ Obtener cepas de diatomeas bentónicas asociadas al perifiton a partir de bioensayos de fijación en sustratos artificiales que permitan la evaluación de sus efectos beneficiosos en el sistema de cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✓ Identificar los organismos aislados a partir de sustratos artificiales, mediante técnicas moleculares para corroborar los estudios taxonómicos registrados por microscopía de estas microalgas.

- ✓ Cultivar las especies aisladas a niveles masivos de producción para su aplicación en el sistema de cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

- ✓ Establecer un protocolo óptimo de fijación masiva de diatomeas bentónicas empleando sustrato artificial (geotextiles) que serán utilizados en el sistema de cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

- ✓ Evaluar la supervivencia y crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante bioensayos con geotextiles inoculados con diatomeas bénticas que permitan comprender los beneficios que ofrece la aplicación de soporte artificiales en el sistema de cultivo de este organismo.

CAPÍTULO II

PRODUCCIÓN ACUÍCOLA

La acuicultura es el sector de producción de alimento de más rápido crecimiento, su contribución al suministro mundial de pescado, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos ha aumentado de un 3.9 % de la producción total en peso en 1970 a un 36.0 % en 2006. Además, entre 2004 y 2006, la producción acuícola mundial, registró tasas de crecimiento anual del 6.1 % en volumen y del 11.0 % en valor. (FAO 2008).

Debido a ello, la actividad acuícola se ha considerado desde hace varios años como una alternativa de producción en muchas regiones del mundo y participa de manera importante en la solución de los problemas de desempleo y alimentación. (Valenzuela M., *et al.* 2002).

2.1.1. Producción de Crustáceos

Si bien, más de la mitad de la producción mundial de la acuicultura en 2006 consistió en peces (54 % Peces de agua dulce, 6 % Peces diádromos y 3 % Peces marinos); los crustáceos, aunque en un porcentaje mucho menor (9 %), alcanzaron uno de los valores significativamente mayores: 17950 millones de dólares (23 % Producción acuícola en términos de valor). (FAO 2008). Esto se dio

como resultados de los logros alcanzados en el control sobre la reproducción de las especies, al mejor conocimiento de su biología, a las innovaciones tecnológicas y al desarrollo de alimentos específicos. (APROMAR. 2004).

Además, es importante considerar que el suministro mundial de crustáceos dado a partir de la actividad acuícola, representó cerca del 42 % de la producción total en 2006. (FAO 2008).

2.1.2. Camaronicultura.

Uno de las actividades acuícolas más importante en el comercio internacional es el cultivo de camarón. En el año 2006, la producción acuícola, proporcionó el 70 % de los camarones y gambas (Peneidos) producidos en todo el mundo (FAO 2008). Cerca de las tres cuartas partes de dicha producción provienen del continente asiático, destacándose, Tailandia, China e Indonesia, que proveen el 60 % de la oferta mundial. (Rosenberry R. 2003).

Las principales especies de camarón producidas en cautiverio pertenecen a la familia Penaidae, entre ellas tenemos: *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*, *Penaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus* y *Litopenaeus vannamei* (Rosenberry R. 2003).

La especie cultivada en Ecuador y Perú es el *Litopenaeus vannamei* o camarón blanco, dicha especie es la que obtiene los mejores rendimientos de crecimiento y la que tolera mejor las condiciones ambientales en cautiverio propias de estas zonas. (Morales V. 1990).

En Perú, el cultivo de camarones peneidos, se inició en la década de los 70, en el departamento de Tumbes; y rápidamente adquirió un importante rol en la economía de esta región, y por muchos años ha sido la principal actividad de la acuicultura peruana (Quispe M., y Berger C. 2006). Debido, principalmente, al aumento de la demanda mundial, al aumento de los volúmenes obtenidos por cosecha, la rentabilidad de su cultivo y a su gran importancia como generador de divisas. (Aquavisión 2009).

Mientras que en Ecuador, la actividad camaronera nació por el año de 1968 en la provincia de El Oro y en la actualidad posee una capacidad de producción mucho mayor a la de Perú, debido a la gran área disponible habilitada para el cultivo (aproximadamente 100 000 Ha). (Quispe M., y Berger C. 2006).

A pesar de que los niveles de producción se han incrementado en los últimos años, la industria camaronera ha experimentado problemas de tipo económico que han impedido que alcance un mayor crecimiento. Todo ello debido a que los precios del camarón cultivado disminuyeron como consecuencia de la reducción de la demanda en los mercados internacionales. (FAO 2008).

A su vez, necesita sobrellevar problemas relacionados con escasez en el abastecimiento de proteínas alimenticias. La producción harina de pescado, principal componente del alimento balanceado, registró en el 2006 (20.2 millones de toneladas) una disminución del 14 % en comparación con las cifras de 2005 (FAO 2008); lo que llevado a incrementar su precio que durante el período 2000 – 2005 se mantuvo entre 500 y 700 dólares por tonelada, para el 2006 alcanzó un valor de 1400 dólares. (Klinkhardt M. 2007). Otro problema son los daños ambientales ocasionados a partir de la contaminación del agua de cultivo por excesos de materia orgánica y de nutrientes, principalmente en los cultivos intensivos. (Schryvera P., *et al.* 2008).

Para resolver tales desafíos, se han puesto en marcha varios estudios enfocados en optimizar el manejo de bio-flocs (Taw *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2009) y así como también implementar sistemas de producción basados en el uso de perifiton (Van Dam, *et al.* 2002; Khatoon, *et al.* 2007). Dichas investigaciones están destinadas a evaluar la composición y valores nutricionales de este tipo de comunidades; además de, establecer la factibilidad de producción de nueva biomasa (microalgas y bacterias heterotróficas) cultivadas a partir de los desechos de nutrientes del mismo sistema acuícola. Para que éstos reemplacen tanto el tratamiento de agua como el suministro de proteína que hasta ahora se basa en el suministro de los productos de la pesca. (Schryvera P., *et al.* 2008).

PERIFITON

2.2.1 Definición.

El término perifiton se refiere al grupo de microorganismos autótrofos o heterótrofos que viven adheridos o asociados a sustratos sumergidos sean estos naturales o artificiales (Roldán 1992).

2.2.2 Composición.

De manera general el perifiton esta compuesto por: Biomasa celular y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). La biomasa celular puede representar del 10 – 90 % de la materia orgánica (Christensen y Characklis. 1990) y está integrado por bacterias, hongos, protozoarios, microalgas bénticas y una gran diversidad de microinvertebrados. (Azim y Asaeda. 2005). Mientras que los EPS pueden abarcan cerca del 50 – 90 % y comprende diferentes tipos de polisacáridos (Cooksey 1992) y otros tipos de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos (Christensen 1989).

2.2.2.1 Microalgas Bénticas.

Dentro del perifiton, el grupo más representativo lo constituyen las microalgas bénticas; organismos autótrofos fotosintéticos, en su gran mayoría son unicelulares, coloniales o filamentosas, no tienen movimiento o resulta ser muy limitado.

Generalmente está formado por diatomeas (Bacillariophyceae), cianobacterias y algas verdes (Chlorophyta) (Stevenson *et al.*, 1996). (Fig. 4).

A diferencia de fitoplancton, estos microorganismos muestran una variedad de mecanismos para adaptarse a la vida sedentaria; como la producción de secreciones mucilaginosas, que puede ser amorfa (en cianobacterias o Chlorophytas unicelulares) u organizada dentro de cápsulas o túbulos (en diatomeas). (Hoagland *et al.* 1982).

Dichos organismos, como productores primarios, juegan un papel muy importante en el desarrollo de todo ecosistema, ya que constituyen el primer eslabón de la cadena alimenticia; así, dentro de las comunidades perifíticas, el desarrollo de los organismos heterotróficos depende de su producción algal (Haack y McFeters, 1982; Romani y Sabater, 1999 Liboriussen, 2003).

Además, las microalgas perifíticas representan una de las comunidades con mayor variabilidad espacial en términos de biomasa y composición, ninguna de la

especies mantiene a lo largo del año un tamaño considerable de su población, en parte debido a que las perturbaciones en los ecosistemas modifican su estructura.

2.2.2.1.1 Diatomeas Bénticas.

Las diatomeas pennadas (simetría bilateral) constituyen uno de los grupos taxonómicos más representativos dentro de la comunidad perifítica, principalmente debido a la facilidad que éste grupo de algas tiene para formar colonias y adherirse al sustrato (Peterson 1996).

Este tipo de diatomeas poseen unas estructuras denominadas rafe, presentes a cada lado de los frústulos. Las sustancias mucilaginosas que le sirven para adherirse al sustrato son secretadas a través de estos poros e inclusive puede ser usado para el desplazamiento. (Azim y Asaeda. 2005).

Hudon y Bourget (1981) determinaron que dentro del perifiton, las diatomeas se encuentran estructuradas de la siguiente forma:

- Grupos coloniales no móviles. Comprende colonias en forma de abanico (*Synedra*), formas arborescentes (*Gomphonema*, *Licmophora*) y cadenas lineales (*Biddulphia*, *Fragilaria*, *Melosira*). Toleran bajo niveles de luz.

- Células solitarias poco móviles: Poseen una gran capacidad de fijación pero con patrones de colonización limitados. Pueden soportar condiciones de oscuridad total y falta de oxígeno por varios días. (*Cocconeis* y *Amphora*).
- Células solitarias muy móviles: No toleran bajo niveles de luz, eventualmente pueden formar capas sobre el sustrato en asociación con las especies coloniales que forman cadenas.

Las diatomeas bénticas o bentónicas pueden llegar a representar 50 al 90 % del total de microalgas perifíticas. (Van Dijk, 1993), pero tanto la abundancia y diversidad, varía según el tipo de sustrato, la temperatura, la intensidad de la luz, el pastoreo, la influencia de la corriente, el oleaje, la salinidad, el pH, la disponibilidad de nutrientes, etc. (Jackman *et al.* 1992).

Estudios realizados por Stelzer y Lamberti (2001) demostraron que dentro del perifiton, las diatomeas fueron el grupo algal de mayor abundancia, llegando a representar el 93 % biomasa algal promedio. Siendo las especies más representativas: *Achnanthydium*, *Amphipleura*, *Fragilaria*, *Cymbella*, *Navicula*, *Ghomphonema*, *Nitzschia* y *Synedra*.

Khant *et al* (1987), para evaluar la colonización del perifiton, colocaron fragmentos de vidrio en un río tropical y determinaron que las diatomeas fueron

las especies más abundantes y las de mayor diversidad. Comúnmente observaron: *Achnanthes*, *Cymbella* y *Cocconeis*.

Shamsudin y Sleight (1995) investigaron durante un año los cambios estacionales de las algas perifíticas sobre una macrofita *Ranunculus penicillatus*, y establecieron que las diatomeas integraron 65 – 98 % del total de las células epifíticas alcanzando máximos niveles de abundancia durante la primavera; especies como *Cocconeis placentula* predominaron durante el invierno; *Navicula gracilis* y *Meridion circulare* fueron importante durante la primavera, otoño e invierno pero no durante el verano. Por el contrario *Achnanthes lanceolata*, *Cymbella ventricosa* y *Gomphonema sp.*, empezaron a incrementarse en la primavera y fueron predominantes durante el verano.

2.2.3 Procesos de Colonización.

En general, la colonización del perifiton en un determinado sustrato empieza por el asentamiento de una capa de sustancias orgánicas disueltas (principalmente aminoácidos y mucopolisacáridos) (Cowling *et al.* 2000; Van Dam *et al.* 2002); luego, en cuestión de horas, se empieza a formar una capa de bacterias (primeros microorganismos colonizadores) que se fijan al sustrato mediante sustancias mucilaginosas; la producción de dichas sustancias ofrece sitios de unión potenciales para una variedad de elementos coloidales, orgánicos e inorgánicos

(del sustrato y del agua circundante), que emplean las bacterias para adherirse y como sustrato para su metabolismo. (Carrias *et al.* 2002).

Las bacterias producen además enzimas extracelulares destinadas a la transformación de las sustancias orgánicas fijadas, especialmente para degradar moléculas orgánicas de cadenas largas en moléculas asimilables de menor peso, así como también en sustancias inorgánicas. (Marxsen y Witzel, 1991).

Después de pocos días de la colonización bacteriana, pequeñas diatomeas pennadas empiezan a adherirse a la matriz orgánica secretada por las bacterias; estos son seguidos por la colonización de especies de diatomeas que se fijan al sustrato a partir de estructuras a manera de pedúnculos, que les permite elevarse por encima de las demás y acceden así a una mayor captación de luz. Luego aparecen formas coloniales de diatomeas que presentan estructuras a manera de abanico, arborescente y cadenas lineales. (Azim y Asaeda. 2005).

Cabe destacar que las especies que llegan primero facilitan o inhiben la colonización de las especies que llegan posteriormente; además los factores fisicoquímicos y las interacciones biológicas son la influencia principal que determinan las etapas de la sucesión en la comunidad (Oshurkov 1992).

Durante el climax de la colonización, aparecen algas de mayor tamaño como las algas verdes filamentosas (Azim y Asaeda. 2005), su mayor porte les permite una

mejor captación de la luz; a su vez, una mayor relación superficie/volumen facilita la absorción de nutrientes. Todo esto les ayuda a crecer más rápido, en ocasiones, estas algas filamentosas crecen tanto que las bacterias y diatomeas pioneras las utilizan como nuevos sustratos ya que les permite estar más cerca de la superficie de agua y por tanto de la luz. Al final de la colonización, si la disponibilidad tanto de luz como de nutrientes se ha reducido y la influencia del pastoreo ha sido mayor, las diatomeas entran a un estado de senescencia o incluso llegan a morir y a desaparecer (Azim y Asaeda. 2005), dando paso a la proliferación y al establecimiento de cianobacterias (McCormick *et al.* 2001).

2.2.4 Importancia

La importancia que representa el perifiton radica en su componente algal; las algas bénticas son importantes para la ecología de los sistemas acuáticos por ser responsables de gran parte de la productividad y la base de la cadena trófica (Lamberti, 1996). Además son reguladores de la química del agua al cambiar muchos compuestos de forma inorgánica a orgánica; participan en el proceso de purificación del agua al atrapar los nutrientes y otros compuestos orgánicos; por último, aumentan la diversidad de organismos, al servir de hábitat y alimento para los invertebrados y los peces (Stevenson 1996); constituyendo de esta manera una alternativa para incrementar la producción de los sistemas acuícolas.

2.2.4.1. Perifiton Como Base de la Cadena Alimenticia.

El perifiton es importante en los sistemas acuáticos ya que proporciona una comunidad estructurada y a su vez contribuye con la producción primaria que soporta un amplio rango de organismos acuáticos. Mediante la fotosíntesis, las microalgas, proporcionan oxígeno al cuerpo de agua y por medio de la fijación del carbono, se convierten en fuente alimenticia para niveles tróficos superiores. (Azim M. *et al.* 2005).

Además las comunidades que componen el perifiton son fácilmente pastoreadas por pequeños invertebrados, peces y camarones, por lo tanto contribuye considerablemente a la productividad de ecosistemas acuáticos, naturales o artificiales. (Azim M. *et al.* 2005). En la mayoría de los cuerpos de agua, la contribución de la comunidad perifíticas a la producción es mayor que la del fitoplancton. En algunos casos, la productividad primaria anual del perifiton puede ser mayor a 1 kg C/m². (Goldsborough y Robinson. 1996). Estudios realizados por Moreira (1988) determinaron que el perifiton contribuye con el 70 % de la materia orgánica a la productividad total.

A su vez, varias investigaciones muestran que puede tener una participación importante en la producción total anual, especialmente de lagos poco profundos. En lagos oligotróficos, por ejemplo, el perifiton contribuyó con el 43 – 97 % de la productividad en zonas poco profundas (2 – 3 m.). (Loeb *et al.* 1983).

En general los máximos valores de productividad perifítica se encuentran en los sistemas de arrecifes de coral, con valores entre 1 - 3 g C/m²/día. (Klumpp y Polunin. 1989).

2.2.4.2. Perifiton Como Regulador de la Calidad del Agua.

Dentro de los sistemas de producción acuícola, la adición de fertilizantes y alimento no solo aumenta la producción de la especie cultivada; sino también incrementa las comunidades de organismos autotróficos y heterotróficos, por lo tanto influyen en la calidad del agua.

La calidad del agua en todo sistema acuático, depende de la presencia de organismos autotróficos (microalgas y macrofitas) y de organismos heterotróficos (bacteria, protozoarios y hongos). Además, en un sistema producción acuícola tradicional, los organismos autotróficos predominantes lo constituyen los organismos fitoplanctónicos; y su actividad se produce en las capas superiores del agua, mientras que la actividad heterotrófica tiene lugar principalmente en el fondo del estanque.

Sin embargo en un sistema acuícola basado en el perifiton, a más de los microorganismos del fitoplancton y del fondo, la adición de superficies sólidas en la columna de agua permite el desarrollo de las poblaciones de organismos

autótrofos y heterótrofos sésiles. De esta manera la captación de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, puede ser incrementada ante la presencia de este tipo de comunidad, que se sumaría al ciclo de nutrientes entre la columna de agua, el fondo del estanque y, finalmente las especies cultivadas. Dichas comunidades participarían de manera directa en los procesos de transformación y remineralización de nutrientes (Milsteim et al 2003); por ejemplo: los sustratos empleados darían paso al asentamiento de microorganismos nitrificantes y desnitrificantes que pueden proporcionar mejor calidad de agua en el cultivo al convertir el nitrógeno tóxico residual en formas menos tóxicas. (Otoshi *et al.* 2006).

Es así que la presencia de organismos perifíticos puede tener un impacto en la ecología del estanque al interactuar con las comunidades presentes en el sistema de cultivo.

Bratvold y Browdy (2001) estudiaron los efectos del perifiton en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, usando tratamientos con y sin la adición de sustratos; determinaron que las superficies verticales (AquaMats®) permiten el desarrollo de microalgas bénticas y de otro tipo de poblaciones microbiales que, además de proveer de alimento para el camarón, condujo a la obtención de tasas de crecimiento, producción y supervivencia más altas con un factor de conversión alimenticia menor; así como también afectó la calidad general del agua en el tanque.

Un pH alto registrado en los tratamientos con las superficies verticales se relacionó con una mayor absorción de dióxido de carbono, como producto de mayores tasas de fotosíntesis y fijación de carbono. A su vez, la combinación de un pH alto con concentraciones de amonio y ortofosfato menores, se debe a una mayor actividad algal. Además, el aumento de las tasas de nitrificación en la columna de agua sugirió que la recirculación de nutrientes puede ser mayor en presencia de los organismos adheridos a las superficies verticales. Trabajos realizados por Azim *et al.*, 2002., usando bambú como sustrato a una densidad aproximada de 1 m² por cada m² del área del estanque, registraron una concentración de amonio total de 0.56 mg/L, el mismo que resultó ser significativamente menor al registrado en los estanques sin sustratos (0.95 mg/L); las bajas concentraciones de amonio en los estanques con bambú coincidieron con un aumento del 80 % en la producción de peces.

Es importante destacar que los organismos autotróficos, las bacterias nitrificantes y heterotróficas compiten por espacio y nutrientes dentro de las comunidades perifíticas; pero todos pueden contribuir a la absorción del amonio. Las algas prefieren amonio como fuente de nitrógeno, solo cuando éste se encuentra en concentraciones inferiores a 0.03 mg/L, asimilan nitrito o nitrato. Las bacterias nitrificantes prefieren condiciones ligeramente alcalinas, son litotróficas y prefieren un sustrato para adherirse; mientras que las bacterias heterotróficas prefieren la materia orgánica como fuente de nitrógeno, pero pueden tomar el

amonio de la columna de agua cuando la cantidad de nitrógeno presente en la materia orgánica no es suficiente para mantener su crecimiento.

Estudios realizados por Milsteim *et al.* (2003), sobre la calidad del agua en estanques con o sin sustratos (bambú), con o sin peces (carpas), y con la fertilización estándar y con el incremento del 50 % (dosis de fertilizante tradicional utilizado en Bangladesh: estiércol de vaca, urea y triple superfosfato 3000, 100 y 100 kg/ha, respectivamente), permitieron destacar los siguientes puntos:

- ✓ El flujo de fósforo está vinculado con la actividad del fitoplancton en la columna de agua y la descomposición en el fondo del estanque. La descomposición, además del consumo de nitrato y producción de CO₂, que a su vez reduce el pH, tiende a liberar fosfato en la columna de agua; este proceso está relacionado a la actividad de microorganismos autótrofos y heterótrofos que tiene lugar en el perifiton; además del fondo del estanque.

- ✓ En consecuencia, la presencia de peces de hábitos bentónicos promueve el flujo del fosfato, mientras que el desarrollo de perifiton mejora el ciclo del nitrógeno.

- ✓ El suministro de fertilizantes y sustratos mejora el balance de oxígeno y nitrógeno; cuando se instalaron las cañas de bambú dentro de sistema de

cultivo, los organismos perifíticos crecieron en ellas y se incrementó la producción fotosintética aumentando el suministro de oxígeno en el agua, mientras que el desprendimiento de tales poblaciones aumentó la turbidez y contribuyó con materiales para la descomposición y a su vez proporcionó amonio para la fotosíntesis y la nitrificación. De igual forma cuando se aplicó la dosis de fertilizante (50 % superior) en los estanques con bambú se produjo mejoras relacionados con la recirculación del nitrógeno, el nitrógeno suplementario inorgánico y el abono orgánico correspondiente a la dosis alta de fertilización fomentaron la fotosíntesis, la descomposición y la nitrificación

2.2.4.3. Perifiton en la Producción Acuícola.

Generalmente se ha considerado desde hace varios años a la comunidad fitoplanctónica como el componente más importante de la cadena alimenticia, de manera particular dentro de los sistemas de producción acuícola, en términos de fijación de energía y abastecimiento de alimento. Razón por la cual, en la acuicultura tradicional, las estrategias adoptadas para la reducción de los insumos y para aumentar la eficiencia de la producción acuícola se han centrado en la optimización de la explotación del fitoplancton. Sin embargo, el empleo del perifiton como base de las redes alimenticias, ofrece posibilidades para la optimización de los niveles de producción acuícola dentro de los sistemas de cultivo tanto extensivos como semi-intensivos. (Azim *et al.* 2005).

El perifiton puede contribuir sustancialmente a la producción primaria, además constituye una fuente importante de alimento para una gran variedad de especies acuáticas de entornos naturales y controlados; de manera general peces e invertebrados bentónicos tales como gasterópodos, oligoquetos y varios grupos de crustáceos, los mismos que incluyen al perifiton en su dieta. (Saikia y Das. 2009).

Los sistemas de producción acuícola basados en el uso de perifiton, consisten en la introducción de superficies sólidas (naturales o artificiales) en la columna de agua, destinadas a proporcionar un sustrato para el desarrollo de poblaciones sésiles autótrofas y heterótrofas, que tienden a aumentar la productividad natural y a optimizar el flujo de nutrientes y energía (Azim *et al.* 2001b) y a su vez sirven de alimento para los organismos cultivados (Milstein *et al.*, 2006), consiguiendo de esta manera una reducción de la tasa de conversión alimenticia (Vinatea 2006).

El perifiton ha sido probado para aumentar la producción de cultivos de peces y crustáceos de hábitos bentónicos, principalmente tilapias (Dempster *et al.*, 1995; Milstein *et al.*, 2006), carpas (Azim *et al.*, 2001a; Keshavannath *et al.*, 2002) y camarones (Bratvold y Browdy., 2001).

2.2.4.3.1. Perifiton en el Sistema de Cultivo de Camarón.

El uso de sustratos para el desarrollo del perifiton es una práctica no estandarizada en el cultivo del camarón. Sin embargo, superficies verticales han sido usadas en algunas instalaciones de producción, y los efectos registrados son un área de activa investigación destinadas a obtener una mejor tasa de crecimiento semanal (reducir los días de cultivo); mejor supervivencia; y un menor factor de conversión. (Tidwell y Bratvold. 2005).

Considerando las diferencias en la preferencia de hábitat y las necesidades dietéticas de las especies a través de su ciclo de crecimiento sugiere que la adición de superficies puede tener efectos variados en el cultivo de camarón. (Tidwell y Bratvold. 2005). Los factores que pueden afectar la obtención de estos resultados incluyen la especie, tamaño, fase de crecimiento, densidad de cultivo y el tipo de sustrato seleccionado. Como por ejemplo los materiales usados, como sustratos, en el sistema de cultivo inciden en el desarrollo de las comunidades del perifiton; el asentamiento en el sustrato, depende de la conformación de la superficie, del tiempo para la colonización y de las modificaciones que otros organismos, como las bacterias hagan sobre el mismo. (Gualtero 2007).

2.2.4.3.1.1. Perifiton - Larvicultura.

Los estadios de Nauplius, Zoea, Mysis y PL1-PL4 son estadios larvarios planctónicos. Durante la fase naupliar se alimenta a partir de sus reservas vitelinas; posteriormente, en el medio natural, las larvas se alimentan de una

variedad de microorganismos: bacterias, microalgas, ciliados, etc., que encuentran en la superficie del mar. Con el avance de estadíos, las necesidades nutritivas evolucionan de una dieta constituida por algas, en los primeros estadíos, hacia una alimentación más omnívora.

Después de PL4, las larvas al llegar a las zonas estuarinas comienzan a adoptar un comportamiento bentónico (Rothlisberg, 1998); se encuentran de manera general en praderas marinas costeras, siendo las diatomeas y los organismos epifíticos una fuente potencial para su nutrición.

Investigaciones realizadas por Lemos *et al.* (2002), sobre la actividades enzimáticas durante los estadíos larvales, indican cambios dietéticos de tipo herbívoro a carnívoro entre los estadíos zoea y PLs; sin embargo, la regulación de dichos cambios puede variar entre especies del mismo género (Puello-Cruz *et al.*, 2002).

Los posibles efectos beneficiosos, comúnmente considerados a partir de la adición de sustratos en el sistema de larvicultura del camarón son: (I) Disponibilidad de alimento adicional y/o nutrientes traza; (II) mejoramiento del ciclo de nutrientes y calidad del agua; y (III) reducción del stress o respuesta a la depredación. (Tidwell y Bratvold. 2005).

Crococ *et al.*, (2003) evaluaron la aplicación de sustratos artificiales en el crecimiento de larvas de *P. monodon* y determinaron un aumento del 20 % de

biomasa en el sistema con sustrato después de 8 semanas de cultivo; también compararon los efectos de dos sustratos a partir de tres tratamientos (AquaMats[®], mallas de polietileno y la combinación de ambos), en larvicultura de *P. esculentus* con densidades de 3000 a 11000 PLs/m³ y no observaron diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia entre estos sustratos. Los efectos de la adición de sustratos versus el control no fueron probados en este estudio, pero ha sido reportado que la producción de larvas de *P. esculentus* es mejorada con la adición de sustratos verticales (Keys, 2003).

Además, sustratos artificiales han sido aplicados con éxito en el cultivo superintensivo de *P. esculentus*, en raceways con PL de 1 g a una densidad de 4000 ind/m² (Keys, 2003; Arnold *et al.*, 2005). Burford *et al* (2004) evaluaron la influencia del perifiton en el sistemas de larvicultura de *P. esculentus* con altas densidades (3000, 6000 and 11000 PL/m³), a partir del empleo de tres sustratos (mallas de polietileno y dos tipos de AquaMats[®]); encontró que 40 - 50 % del carbón asimilado por el camarón en este sistema provino de la biota natural versus el alimento artificial. El diseño de este estudio no distingue el aporte del plancton y del perifiton, limitando así sus conclusiones con respecto a los beneficios de la adición de sustrato.

Estudios sobre el cultivo de *Farfantepenaeus* en jaula de pre-criaderos sugieren que tanto el crecimiento como la supervivencia son beneficiados con la adición de sustratos (Ballester *et al.*, 2003). Un mayor crecimiento se observó en las jaulas de

pre-cría que registraron una mayor biomasa perifítica, lo que sugiere que la ganancia en el crecimiento se da como resultado de la presencia del perifiton.

Otros estudios, donde se evaluaron la influencia del sustrato AquaMats® en la producción de camarón *Litopenaeus vannamei*, indican que la supervivencia en la fase de larvicultura, hasta el estadio de mysis, fue incrementada en más de 75% con la utilización de éste material, sobre los tanques control. Además no hubo diferencia estadística significativa entre las tasas de supervivencia en tanques donde el crecimiento biológico natural en los AquaMats® era la única fuente de nutrición; en comparación con los otros tratamientos, donde a más del AquaMats® se suplementó con otros alimentos (inicialmente con *Chaetoceros* hasta zoea III y en adelante una mezcla de *Chaetoceros* con nauplios de *Artemia* cuatro veces al día). En estos grupos se obtuvieron una supervivencia de aproximadamente 77 %, mientras que en los tanques control sin sustrato resultó cerca del 44 %. Los resultados obtenidos, durante la fase de engorde de éste estudio demostraron que altas densidades de cultivo (hasta 160 Pls/m²), pueden ser mantenidas por los primeros 45 días con supervivencias y tasas de crecimiento aceptables, utilizando AquaMats® sin alimento artificial. (Meridian Applied Technology Systems).

Snadifer *et al.* (1987) reportó un incremento del 27 % en la supervivencia en precriaderos de *Litopenaeus vannamei* con la adición de pantallas de fibra de vidrio ubicados a 60° de inclinación. Moss y Moss (2004) desarrollaron estudios con sustratos artificiales en los sistemas de larvicultura de *Litopenaeus vannamei*,

con varias densidades (de 778 a 1556 PL/m²), y reportaron un incremento en el crecimiento del 17 al 35 % en los tratamientos con AquaMats[®]

2.2.4.3.1.2. Perifiton - Sistema de Engorde

Los efectos relacionados con la adición de superficies en el sistema de cultivo de juveniles de camarón, depende en gran parte de las diferencias a nivel de género de los requerimientos nutricionales de las diferentes especies, de las preferencias de hábitat entre especies y de los cambios dietéticos (Tidwell y Bratvold. 2005); esto sugiere que los beneficios nutricionales del perifiton asociada con la adición de superficies quizás varían con la fase de crecimiento.

Estudios relacionados con mediciones de actividad de enzimas digestivas en camarón han sido usadas para evaluar este tipo de cambios, considerando que las variaciones en la actividad enzimática está dada en función de la dieta (Guzman *et al.* 2001), del tamaño de los organismos (Gamboa *et al.*, 2003) y del stress (Córdova *et al.* 2004).

El peso del camarón fue correlacionado positivamente con amilasas y material vegetal y negativamente con proteínas y detritus a nivel intestinal; estos cambios indican que animales mayores de 6 g poseen una baja dieta proteica y ésta más bien comprende material vegetal, por lo menos el 65 % macrofitas. (Gamboa *et al.*, 2003).

Con respecto a la adición de sustratos, es posible que las especies que cambian a dietas proteicas bajas, quizás sean capaces de obtener grandes beneficios nutricionales de algas bentónicas durante el estadio juvenil-mediano que durante los estadios carnívoros (estadios juveniles temprano), pero esto aun no ha sido demostrado (Tidwell y Bratvold. 2005).

Los efectos relacionados con la adición de sustrato (AquaMats[®]) en cultivos de *Litopenaeus vannamei*, juveniles de 2.3 g (79 ind/m²) fueron evaluados por Montgomery *et al* (2003); quienes observaron un crecimiento, 27 % superior en los tratamientos con sustratos en relación con los tanques control.

Domingos (2003) analizó el efecto de la adición de diferentes cantidades de sustratos artificiales (0, 15, 30 y 45 % del área del fondo) sobre el crecimiento, la supervivencia, la demanda de alimento, la productividad y la tasa de conversión alimenticia en el cultivo semi-intensivo de *L. vannamei* (30 ind./m²) utilizando rediles de 12.5 m² de superficie; los camarones fueron alimentados tres veces al día (35 % Proteína Bruta) durante 6 semanas. En relación con el grupo control, no se observaron mejoras en el crecimiento (10.93 g) ni en la conversión alimenticia (1.07) ($P > 0.05$) con la adición de sustratos; sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la supervivencia del control (71.10 %) y el tratamiento de 15 % (93.40 %), del mismo modo, para la biomasa final, siendo 2.91 kg para el control y 3.58 kg para el tratamiento de 15 %.

Saldarriaga y Alvarado (2008). Desarrollaron experimentaciones para evaluar el efecto del perifiton fijado a sustratos artificiales en cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei* (0.75 g a una densidad de 25 ind./m²) por un periodo de 14 semanas. Para ello instalaron alrededor de 16 rediles de 15 m² en un estanque de 1.33 Ha y en cada cuatro de ellos colocaron sustratos a razón de 20 %, 30 % y 40 % con respecto al área de fondo, además incluyeron cuatro rediles sin sustratos (control). Concluyeron que el crecimiento de los juveniles de *L. vannamei* que consumieron perifiton en los sustratos artificiales al 20 %, fue significativamente igual al crecimiento obtenido en el tratamiento sin sustratos artificiales, pero significativamente mayores en 12 % al crecimiento obtenido en los tratamientos con 30 % y 40 % de sustratos artificiales. El Factor de Conversión alimenticia obtenido con 20 % y 30 % de sustratos artificiales fue 25 % a 19 % menor al obtenido en el tratamiento - control.

Otros estudios en sistemas de cultivo intensivo (125 - 140 ind./m²) de *L. vannamei* demostraron que el uso de AquaMats[®] permite alcanzar un incremento del 6 % en la producción y del 5 % en la supervivencia. (Browdy *et al* 2001)

DIATOMEAS

2.3.1 Generalidades.

Las diatomeas comprenden un grupo amplio de microalgas que se puede encontrar en casi todos los entornos. Se estima que son responsables de casi el 40 % de la producción marina total de carbono.

Existen aproximadamente más de 250 géneros que podrían representar alrededor de 100000 especies, divididas de acuerdo a su simetría en diatomeas céntricas o pennadas.

En su mayoría las diatomeas céntricas son pelágicas o planctónicas, mientras que las diatomeas pennadas son bentónicas, aunque pueden encontrarse dentro del plancton en ausencia de un determinado sustrato.

2.3.2 Importancia de las Diatomeas en la Acuicultura.

En la acuicultura, la mayoría de los sistemas de cultivo utilizan al menos una especie de diatomeas. A pesar de la gran diversidad disponibles en la naturaleza,

sólo muy pocas especies y principalmente las céntricas, han sido cultivadas con fines acuícolas (Lebeau y Robert, 2002).

Entre ellas tenemos *Skeletonema*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira*, siendo estas dos últimas las que comúnmente son empleadas en la producción de camarón a nivel mundial como fuente principal de alimento vivo. (Pina *et al.* 2005). La microalga *Chaetoceros sp.*, ha sido empleado también para el cultivo de cangrejos (*Orithya sinica*) (Jee *et al* 2007) y de artemia (*Artemia franciscana*) (Koi *et al* 2006).

Mientras que para el cultivo de moluscos, se han utilizado diferentes especies de *Chaetoceros* y *Skeletonema*, entre ellas destacan: *Chaetoceros Sp.*, *C. muelleri*, *C. gracilis*, *C. calcitrans*, *Skeletonema sp.* y *S. costatum* ya sea para la cría o el engorde de larvas de vieiras, ostras y almejas (Martínez y Southgate. 2007; Gouda *et al.* 2006).

Si bien, los cultivos de diatomeas céntricas han sido desarrollados, la producción de diatomeas pennadas en la actualidad es de gran interés; dicha producción está destinada a diversificar la dieta de diversos organismos de hábitos bentónicos. (Alfonso, *et al.* 2004). Ejemplo de aquello es la producción de biopelículas de diatomeas para el cultivo de abulón (*Haliotis sp.*), porque éstas son determinantes para el asentamiento, el crecimiento y la supervivencia de larvas de esta especie. (Roberts. 2001).

Varios estudios han sido realizados con la finalidad de producir biofilm de microalgas, ya sea de manera espontánea (Daume *et al.* 2000; Gallardo y Buen. 2003) o a partir de monocultivos o mezclas de diatomeas (Daume *et al.* 2000; Gordon *et al.* 2006); siendo las especies de *Navicula*, *Nitzschia*, *Cocconeis* y *Amphipropra* las comúnmente empleadas (Chen 2007).

El uso de combinaciones de diatomeas planctónicas y bentónicas se han descrito para el cultivo de diferentes especies de microcrustáceos filtradoras planctónicas, tales como: *Daphnia magna* (Siehoff *et al.* 2009) o de *Artemia franciscana* (Zmora y Shpigel 2006).

Experimentaciones a nivel de larvicultura en *Penaeus monodon* con tres tipos de diatomeas pennadas (*Amphora*, *Navicula* y *Cymbella*) durante 19 días, demostraron que su uso permite obtener un aumento en la tasa de crecimiento (0.27 g) y en la supervivencia (56.3 %) en comparación con el control; (crecimiento: 0.20 g y supervivencia 36.0 %). Este tipo de diatomeas constituyen una fuente rica de proteínas, lípidos, EPA, DHA y aminoácidos esenciales, elementos que se encontraron en mayor proporción en las larvas tratadas; lo que indica una transferencia eficaz de los nutrientes. (Khatoon *et al.* 2008).

2.3.2.1. Importancia de las Diatomeas Bentónicas en el sistema de cultivo de camarón.

Se conoce que los nutrientes para el crecimiento y la supervivencia del camarón en estanques provienen de dos fuentes: los alimentos suplementarios y la productividad natural existente en el sistema.

Los alimentos suplementarios pueden ser ingeridos directamente tanto por los camarones como por los organismos del bentos que luego a la vez, se convierten en parte del alimento del camarón.

Pero bajo estas condiciones de cultivo, el alimento natural (plancton y/o perifiton) es de gran importancia para la nutrición de camarones, constituye una fuente de nutrientes que no está presente en las dietas artificiales (Hunter *et al.* 1987); además, podría reducir los costos de producción y los riesgos relacionados a la utilización de alimento artificial (Cuzon *et al.*, 2004); mejorando la calidad del agua en los estanques y efluentes (Martínez-Córdova *et al.* 2006) y disminuyendo de ésta manera la contaminación ambiental; porque a partir de los desechos de nutrientes del mismo sistema acuícola se produce de manera continua una nueva biomasa (microalgas y bacterias heterotróficas), la misma que representa una fuente alternativa de alimento. (Schryvera P., *et al.* 2008).

Focken *et al.* 1998, determinaron que el tipo de material vegetal presente en los estanques de cultivo es frecuentemente encontrado en el contenido estomacal de los camarones y está representado por diatomeas, algas filamentosas, masas de cianobacterias y fragmentos de macrofitas acuáticas y terrestres. Además, algunos estudios han mostrado que más del 70 % de la nutrición del camarón deriva de la

productividad primaria y sólo un 10 a un 30 % proviene del alimento balanceado en sistemas semi-intensivos. (Bonilla y Massaut. 2002; Gamboa J. 2001).

Dichas observaciones son confirmadas a partir de estudios basados en la aplicación de isotopos estables (carbono y nitrógeno) que permiten deducir las principales fuentes de alimento incorporadas en camarones juveniles: Parker *et al.*, 1989 establecieron que *Litopenaeus vannamei* de 1.5 g (20 ind/m²) obtiene la mitad del nitrógeno y cerca del 44 - 86 % del carbono de la producción natural y el resto del alimento artificial; A su vez, Epp *et al.*, 2002 observaron que organismos de 3.5 g (50 ind /m²) obtienen el 35 % del nitrógeno de la biota.

Es importante destacar que el camarón *L. vanammei* representa una de las especies menos carnívora, por lo que es posible que su alimentación dependa más del consumo de organismos autótrofos. Considerando que la mayor parte de su ciclo de vida, su comportamiento es de tipo bentónico, razón por la cual, el consumo de alimento natural está representada por organismos propios de estos ambientes (bentos y perifiton); como fue demostrado a partir de los estudios realizados por Soares *et al.* (2005) quienes observaron que la dieta del camarón está integrada por importantes proporciones de detritus y organismos del perifiton y además su consumo (diatomeas y nemátodos) mejora significativamente el crecimiento del camarón. (Pissetti, 2004).

Además, el consumo de diatomeas bentónicas se relaciona con el crecimiento del camarón. Gamboa *et al.* (2003), observó que el 15 y 29 % del alimento presente

en el estómago de camarones de 8 y 10 g respectivamente, estaban representados por diatomeas, entre ellas *Cocconeis*, *Cymbella*, *Navicula*, *Amphora* y *Gyrosigma*. La presencia de tales diatomeas también inciden en el mantenimiento de la calidad del agua, Thompson *et al.* (2002) determinó, en un sistema de cultivo intensivo de camarón, que un biofilm maduro era capaz de mantener los niveles de amonio y fosfato bajos y estuvo en su mayoría compuesto por diatomeas pennadas *Amphora*, *Campylopyxis*, *Navicula*, *Synedra*, *Hantzschia* y *Cylindrotheca*. Lo que demuestra que la importancia de las diatomeas bentónicas dentro de los sistemas de producción para incrementar la productividad de los mismos en términos de crecimiento y supervivencia.

Pero la presencia de tales diatomeas, como microorganismos propios del perifiton, se limita sólo al fondo del estanque; razón por la cual es necesario el empleo de sustratos para su producción y desarrollo.

Pero el simple hecho de introducir sustratos da paso al asentamiento de una variedad de microorganismos (perifiton natural). Aunque el componente algal resulta ser el predominante en la mayoría de los casos, en ciertas ocasiones, los sustratos son colonizados por microorganismos que no son beneficiosos para mantener la calidad e inclusive podrían ser dañinos para el sistema de cultivo (King R., *et al.* 2004).

Ejemplo de aquello son los resultados obtenidos a partir de las experimentaciones realizadas por Kumlu y Eroldogan (2000), quienes concluyeron que el crecimiento y la supervivencia de PLs de *P. semisulcatus* no mejoraron por la adición de superficies verticales (redes de cerco); e inclusive en otras pruebas, con la adición de superficies horizontales (mallas plásticas) después de 30 días de cultivo de *M. monoceros* se obtuvo una biomasa del 40 % más bajo comparado con el control sin sustratos adicionales (Kumlu *et al.*, 2001).

Una solución para reducir los riesgos debido al desarrollo de organismos dañinos dentro de un perifiton natural podría ser el desarrollo del mismo pero a partir de una selección de especies, principalmente diatomeas bentónicas; para producir un perifiton domesticado (Khatoon *et al.* 2007).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Área de Estudio.

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la camaronera MARINAZUL S.A. ubicada en el distrito de Aguas Verdes de la provincia de Zarumilla del departamento Tumbes – Perú ($3^{\circ}28'20''S$ y $80^{\circ}15'58''O$) durante los meses de junio a noviembre del 2009. (Fig. 5).

La empresa, cuenta con un área de producción de 200 Ha de cultivo semi-intensivo y 20 Ha de cultivo intensivo; a su vez posee 12 piscinas experimentales de 1200 m^2 , seis con fondo de tierra y seis con fondo cubierto de liner. Además posee un laboratorio de bacteriología y de seguimiento de plancton, un laboratorio de perifiton equipada para el aislamiento, cultivo y criopreservación de microorganismos; así como también de una unidad experimental provista de 10 tanques de 20 m^2 .

Los análisis relacionados con taxonomía molecular se desarrollaron en “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino - Marinazul S.A.”, ubicada en el Departamento de Tumbes, Provincia del Contralmirante Villar, distrito de Canoas de Punta Sal, caleta de Punta Mero (Latitud Sur 03°54’26’’S y 80° 52’43’’O) (Fig. 6), que cuenta con un laboratorio de biología molecular completo (real-time PCR, termocicladores, transiluminador, microcentrífuga, centrifugadora refrigerada, equipamiento de electroforesis, bañomaría, micropipetas), un microscopio invertido con contraste interferencial y epifluorescencia, además de un microscopio confocal a barrido láser para análisis espectral múltiple.

3.2. Materiales y Reactivos.

3.2.1. Aislamiento.

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| ✓ Cajas Petri. | ✓ Micropipeta de 100 - 1 000 µL. |
| ✓ Tubos de ensayo. | ✓ Micropipeta de 10 - 100 µL. |
| ✓ Tubos Falcon de 50 mL. | ✓ Micropipeta de 0.5 - 10 µL. |
| ✓ Tubos Falcon de 15 mL. | ✓ Parafilm. |
| ✓ Matraz de 500 mL | ✓ Papel aluminio. |
| ✓ Láminas Portaobjetos y cubreobjetos | ✓ Papel Kraft. |
| ✓ Microplacas de 96 pocillos. | ✓ Bacto agar. |

- ✓ Microplacas de 4 pocillos.
- ✓ Asa de platino.
- ✓ Espátula de drigalsky.
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Tijeras quirúrgicas.
- ✓ Pinzas quirúrgicas.
- ✓ Bisturí.
- ✓ Puntas de 100 - 1000 μL .
- ✓ Puntas de 10 - 100 μL .
- ✓ Puntas de 0.5 - 10 μL .
- ✓ Medio Guillard F/2 (Solución 1: Nitratos - Fosfatos, Solución 2: Metasilicatos, Solución 3: EDTA, cloruro férrico y metales traza, Solución 4: Vitaminas).
- ✓ Agua de mar estéril.
- ✓ Microscopio Invertido (Olympus IX-FLA).
- ✓ Geotextil.

3.2.2. Purificación.

- ✓ Cajas Petri.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Tubos Falcon de 15 mL.
- ✓ Microplacas de 96 pocillos.
- ✓ Espátula de drigalsky.
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Puntas de 100 - 1000 μL .
- ✓ Puntas de 10 - 100 μL .
- ✓ Micropipeta de 100 - 1000 μL .
- ✓ Micropipeta de 10 - 100 μL .
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Medio Guillard F/2 (Solución 1: Nitratos - Fosfatos, Solución 2: Metasilicatos, Solución 3: EDTA, cloruro férrico y metales traza, Solución 4: Vitaminas).
- ✓ Bacto agar.
- ✓ Medio Tryptic Soy Broth (TSB).
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Peróxido de Hidrógeno. (H_2O_2).

- ✓ Parafilm
- ✓ Microscopio Invertido (Olympus IX-FLA).

3.2.3. Conservación.

- ✓ Tubos para criopreservación (Criotubos 0.5 mL).
- ✓ Láminas Portaobjetos y cubreobjetos.
- ✓ Puntas de 100 - 1000 μ L.
- ✓ Puntas de 10 - 100 μ L.
- ✓ Micropipeta de 100 - 1000 μ L.
- ✓ Micropipeta de 10 - 100 μ L.
- ✓ Cryopreservantes (DMSO).
- ✓ Medio Guillard F/2 (Solución 1: Nitratos - Fosfatos, Solución 2: Metasilicatos, Solución 3: EDTA, cloruro férrico y metales traza, Solución 4: Vitaminas).
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Tanque de Nitrógeno Líquido.
- ✓ Centrífuga modelo 2-16A.
- ✓ Microscopio Invertido (Olympus IX-FLA).

3.2.4. Identificación: Taxonomía Clásica

- ✓ Microtubos de 1.5 mL
- ✓ Láminas Portaobjetos y cubreobjetos.
- ✓ Puntas de 100 - 1000 μ L.
- ✓ Agua destilada
- ✓ Permanganato de Potasio (KMnO_4).
- ✓ Ácido sulfúrico (H_2SO_4).

- ✓ Micropipeta de 100 - 1000 μ L
- ✓ Centrífuga Tehnica Centric 200
- ✓ Microscopio Confocal (Olympus FLUOVIEW 1000).
- ✓ Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).
- ✓ Microscopio invertido (Olympus IX-FLA).
- ✓ Claves de identificación

3.2.5. Identificación: Taxonomía Molecular

- ✓ Kit de extracción de ADN.
- ✓ Kit de PCR p23SrV-f1/r1
- ✓ Kit de PCR ITS1-DiatomF/R
- ✓ Microtubos de 1.5 mL
- ✓ Tubos PCR 0.2 mL
- ✓ Puntas de 100 - 1000 μ L.
- ✓ Puntas de 20 - 200 μ L.
- ✓ Puntas de 0.5 - 10 μ L
- ✓ Micropipeta de 100 - 1000 μ L
- ✓ Micropipeta de 20 - 200 μ L
- ✓ Micropipeta de 0.5 - 10 μ L
- ✓ Geles de agarosa 1.5 %
- ✓ Marcador de Peso Molecular Centrífuga Tehnica Centric 200
- ✓ Incubadora JB Aqua 5
- ✓ Cámara de electroforesis Mudip-exu
- ✓ Termociclador Biometra ®
- ✓ Transiluminador ECX-20M

3.2.6. Cultivo de Microalgas

- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Frascos de vidrio de 20 mL
- ✓ Fundas de 500 mL - 2 L - 20 L
- ✓ Tanques de 150 L - 1.2 T
- ✓ Medio Guillard F/2 (Solución 1: Nitratos - Fosfatos, Solución 2: Metasilicatos, Solución 3: EDTA, cloruro férrico y metales traza,

- ✓ Puntas de 1000 μL
- ✓ Micropipetas de 100 a 1000 μL
- ✓ Malla de 5 - 10 μm
- ✓ Autoclave
- ✓ Mangueras
- ✓ Piedras Difusoras
- ✓ Varillas de vidrio
- ✓ Balanza analítica Ohaus-TravelerTM
- Solución 4: Vitaminas).
- ✓ Nutrientes grado técnico
- (Solución 1: Nitrato - Fosfato,
- Solución 2: metasilicato y
- Solución 3: sequestrene).
- ✓ Hipoclorito de sodio - NaClO
- ✓ Thiosulfato de sodio - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

3.2.7. Dinámica de crecimiento

- ✓ Lector de Elisa - Sunris Basic
- TECAN.
- ✓ Tubos Falcon 15 mL
- ✓ Cámara Neubauer
- ✓ Puntas de 20 a 200 μL
- ✓ Puntas de 100 a 1000 μL
- ✓ Micropipetas de 20 a 200 μL
- ✓ Micropipetas de 100 a 1000 μL
- ✓ Microplacas de 96 pocillos
- ✓ Medio Guillard F/2 grado análisis
- ✓ Microscopio invertido (Olympus
- IX-FLA).

3.2.8. Producción: Perifiton Domesticado

- ✓ Tubos Falcon 15 mL - 50 mL
- ✓ Puntas de 20 a 200 μL
- ✓ Micropipetas de 20 a 200 μL
- ✓ Puntas de 100 a 1000 μL
- ✓ Mangueras.
- ✓ Piedras Difusoras.
- ✓ Nutrientes grado técnico
- (Solución 1: Nitrato - Fosfato,

- ✓ Micropipetas de 100 a 1000 μL
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Geotextil (Pedazos 50 x 40 cm).
- ✓ Solución 2: metasilicato y Solución 3: sequestrene).
- ✓ Microscopio invertido (Olympus IX-FLA).

3.2.9. Evaluación de la Colonización

- ✓ Microtubos de 1.5 mL
- ✓ Puntas de 20 a 200 μL
- ✓ Micropipetas de 20 a 200 μL
- ✓ Micropipetas de 0.5 a 10 μL
- ✓ Placas porta y cubreobjetos
- ✓ Puntas de 0.5 a 10 μL
- ✓ Pinzas estériles
- ✓ Bisturí
- ✓ Bromuro de etidio

3.2.10. Evaluación del Valor Nutricional

- ✓ Malla de 300 μm
- ✓ Recipientes plásticos 7 L.
- ✓ Tanque de 150 L
- ✓ Post-larvas PL10
- ✓ Termómetro
- ✓ Refractómetro
- ✓ pHmetro
- ✓ Oxímetro
- ✓ Alimento balanceado (35 % proteína).
- ✓ Balanza analítica marca Ohaus-TravelerTM
- ✓ Geotextil colonizados
- ✓ Microscopio Confocal (Olympus FLUOVIEW 1000).

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Preparación de Materiales y Medios de Cultivo.

3.3.1.1. Limpieza y Esterilización de Materiales de Vidrio.

Los materiales de vidrio (cajas petri, tubos de ensayo, matraces) fueron lavados con jabón líquido neutro, luego fueron sumergidos en una solución de 50 ppm de cloro durante 30 min, para finalmente ser enjuagados con abundante agua. Una vez secados, se envolvieron en papel kraft y se esterilizaron en autoclave a 120°C, 15 lb/plg² por 15 min.

3.3.1.2. Tratamiento y Esterilización del Agua.

Se utilizó agua de mar, cuya salinidad fue ajustada de acuerdo a las salinidades registradas en los estanques donde se ubicaron los sustratos. Se filtró con malla de 10 y 1 µm y luego se esterilizó en autoclave a 120 °C, 15 lb/plg² por 15 min.

3.3.1.3. Preparación de medio de cultivo líquido.

Consistió en adicionar por cada litro de agua de mar estéril 1 mL de cada una de las cuatro soluciones que componen el medio Guillard F/2. (Solución 1: nitratos y fosfatos, Solución 2: metasilicatos, Solución 3: cloruro férrico, EDTA y metales traza, Solución 4: vitaminas).

3.3.1.4. Preparación de Medio de Cultivo Sólido.

Se adicionaron 2 g de bacto-agar en 100 ml de agua mar estéril, esta solución se calentó hasta disolver completamente el agar, luego se esterilizó en autoclave (120°C, 15 lb/plg² por 15 min). Los nutrientes del medio Guillard F/2 fueron adicionados cuando la solución se enfrió justo antes de la repartición en placas Petri, manteniendo la relación 1 mL de cada solución por litro de medio a preparar.

3.3.2. Obtención y Preservación de Cepas de Diatomeas Bentónicas.

Para la obtención de cepas de diatomeas bentónicas se empleó fragmentos de geotextil (fibras de polipropileno) como sustrato (Fig. 7), a fin de proporcionar un medio de fijación para tales microorganismos, los mismos que se ubicaron en sentido vertical como lo recomienda Lane *et al* (2003) para el estudio de comunidades perifíticas, para ello dichos fragmentos (1 x 0.5 m.) fueron

acondicionados con pesos y flotadores a los extremos para mantenerlos estables en el medio (Fig. 8).

Los sustratos se colocaron en estanques de cultivo tanto semi-intensivo como intensivo. (Fig. 9 y 10).

3.3.2.1. Recolección y Tratamiento de Muestras. (Esquema 1).

Luego de siete días de haber sido ubicado los sustratos, se procedió a la recolección de muestras, las mismas que se obtuvieron a partir de cortes de un área de 25 cm², a unos 25 a 30 cm de profundidad; según lo reportado por Keshavannath *et al.* (2001), quien indica que los máximos niveles de biomasa perifíticas se encuentran entre 0 a 60 cm de profundidad (profundidad de compensación fotosintética) (Fig. 11). Con la finalidad de desprender las microalgas que se encontraban adheridas a las fibras del geotextil, las muestras fueron suspendidas en 50 mL de agua de mar estéril y sometidas a agitación constante por varios minutos. El producto obtenido fue resuspendido en 450 mL de agua de mar nutrida con medio Guillard F/2. Se mantuvo con aeración e iluminación constante a temperatura ambiente hasta obtener un bloom natural y así dar paso al aislamiento de microalgas.

3.3.2.2. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas.

El aislamiento de las cepas de diatomeas bentónicas se desarrolló a partir de la combinación de varios métodos, cada uno de ellos se realizó bajo condiciones asépticas.

3.3.2.2.1. Diluciones sucesivas. (Esquema 2; Fig. 12).

Las diluciones sucesivas (1 en 10) se realizaron en microplacas de 96 pocillos, provistos cada uno con 180 μL de medio Guillard F/2; se tomó una muestra de 10 mL del bloom natural, a continuación se extrajeron alícuotas de 20 μL y se inocularon en los pocillos de la primera fila de la microplaca, obteniendo así diluciones 1:10; de estos. Se transvasaron verticalmente 20 μL al siguiente pocillo para obtener diluciones de 1: 10²; este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener diluciones de 1: 10⁴. Luego, el volumen de los pocillos de las diluciones 1: 10⁴ se repartieron en diez nuevos pocillos en otra microplaca, obteniéndose así diluciones de 1:10⁵. Las microplacas fueron incubadas durante un período de 5 a 7 días a temperatura ambiente, bajo luz continua.

Durante este período, con ayuda del microscopio Invertido (Olympus IX-FLA) se observaron cada uno de los pocillos y se seleccionaron los que presentaban uno, dos o tres especies de diatomeas bentónicas distintas; convirtiéndose en puntos de partida para la aplicación, tanto de diluciones seriadas como para el aislamiento en placas.

3.3.2.2.2 Captura con micropipeta. (Fig. 13 - Esquema 3).

La aplicación de la técnica de captura con micropipeta se la realizó, debido a que ésta, permite ser selectivo en cuanto a la especie que se pretende aislar.

Para ello, se colocaron varias alícuotas de 500 μL de medio Guillard F/2 sobre una placa petri; en una de estas, se diluyó 50 μL del bloom natural; luego empleando el microscopio invertido (Olympus IX-FLA), se localizó un campo con la menor cantidad de células de interés y se procedió a capturar a la microalga seleccionada con la micropipeta, tomando una pequeña cantidad de líquido (5 - 10 μL). Esta operación se repitió hasta que en toda la gota de agua se observó la presencia de una sola célula, luego dicho volumen se inoculó en microplacas de 4 pocillos. (500 μL).

Las microplacas se incubaron a temperatura ambiente y a luz continua durante 10 a 15 días.

Finalmente se seleccionaron aquellas microplacas en cuyos pocillos se registró crecimiento celular, para la aplicación diluciones seriadas y siembra en medio sólido.

3.3.2.2.3 Siembra en placas. (Esquema 4; Fig. 14).

Se sembró con ayuda del asa de Drigalsky, 20 μL de muestras del bloom natural en placas petri con medio Guillard F/2 solidificado con bacto-agar a razón de

20 g/L; el inóculo se esparció sobre la superficie, hasta su absorción total por el medio de cultivo. Las placas sembradas se incubaron a temperatura ambiente, bajo luz continua durante 5 a 7 días.

Una vez obtenidas las colonias de microalgas bien desarrolladas y aisladas, se tomaron muestras de cada una de ellas y se diluyeron en 20 μ L de medio F/2; para ser sembradas nuevamente, aplicando la técnica de siembra por esparcimiento.

Este proceso también se aplicó para las muestras tomadas de las microplacas de diluciones y de las capturadas con micropipeta.

3.3.2.3. Purificación de Cepas de Diatomeas Bentónicas.

La purificación de las cepas se realizó aplicando las mismas técnicas de aislamiento anteriormente descritas; de manera especial, la siembra en placas, ya que esta permite purificar el cultivo a través de las resiembras clonales sucesivas; considerando, que a menudo los cultivos obtenidos a partir de la aplicación de las técnicas de diluciones sucesivas y captura con micropipeta no quedan completamente separados; por lo general se suelen observar algunos ejemplares de otras especies que en ocasiones proliferan y compiten con la cepa de interés.

Otro tipo de contaminante común en los cultivos microalgales los constituyen los microorganismos de tipo bacteriano, los cuales proliferan ante la presencia de células muertas. Si la carga bacteriana es excesiva puede inhibir el crecimiento

algal o bien hacerlo no apto para su utilización. Ante la presencia de este problema, la limpieza de estos cultivos mediante diluciones y siembra en medio sólido resulta ser lenta (Fig. 15), por lo que se aplicó varias concentraciones de peróxido de hidrógeno para purificar las cepas aisladas.

3.3.2.3.1. Purificación con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂). (Esquema 5)

El Peróxido de Hidrógeno constituye un producto químico con un gran poder oxidante, lo que lo hace muy reactivo frente a la materia orgánica, y por tanto posee un amplio rango de acción frente a microorganismos (Rach *et al.*, 2000); actúa principalmente contra organismos procariotas, ya que los organismos eucariotas necesitan altas concentraciones para ser eliminados.

Xenopoulos y Bird (1997) determinaron que el uso de H₂O₂ a concentraciones de 0.017 ppm inhibía la producción bacteriana, mientras que a 0.034 ppm el crecimiento bacteriano se reducía a un 40 %. A su vez investigaciones realizadas por Drábková *et al.* (2007), establecieron que dentro del grupo de microalgas, las cianobacterias son aproximadamente 10 veces más susceptibles al peróxido de hidrógeno que las algas verdes y diatomeas; empleando concentraciones de 0.27 ppm de H₂O₂ inhibían cerca del 50 % del crecimiento de *Microcystis aeruginosa*.

Además, es importante destacar que el H_2O_2 se descompone rápidamente en H_2O y O_2 con liberación de calor, por tanto, no se acumula ni da lugar a la formación de complejos reversibles o metabolitos tóxicos.

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno se determinaron con la finalidad de establecer aquella que permita eliminar o reducir la carga bacteriana sin afectar la viabilidad de las cepas de microalgas.

En frascos de vidrio estériles, se agregaron 10 mL de cultivo y a su vez se adicionaron 0, 10, 20, 30 y 50 μ L de una solución madre de 10000 ppm de H_2O_2 (180 volúmenes equivalente al 50 %) para obtener concentraciones de 0, 10, 20, 30 y 50 ppm respectivamente. (Fig. 16).

Los frascos fueron incubados a temperatura ambiente y luz constante durante una hora, luego se tomaron muestras de 50 μ L para ser sembradas en medio Guillard F/2 solidificado (Fig. 17). A partir de alícuotas de 20 μ L se determinó el nivel de la carga bacteriana mediante diluciones sucesivas (1 en 10) en microplacas hasta la dilución correspondiente a 10^{-8} . Se consideró como control positivo el tratamiento correspondiente a 0 ppm de H_2O_2 y control negativo medio TSB (Tryptic Soy Broth). (Fig. 18).

3.3.2.4. Conservación de las Cepas de Diatomeas Bentónicas.

Una vez obtenidas las cepas de microalgas, éstas fueron conservadas en medio Guillard F/2 líquido y sólido a 4°C. Este proceso se realizó a partir de inóculos de 500 µL de cepa en tubos de ensayo con 9500 µL de medio Guillard F/2 (Fig. 19) y a partir de la siembra en placas, por esparcimiento, de 20 µL de cada cepa. (Fig. 20). Tanto los tubos de ensayo como las placas (4 replicas de cada uno) se mantuvieron a 20 – 21 °C a luz constante durante 5 a 7 días hasta que se observó un crecimiento. Luego fueron envueltas en papel aluminio y almacenadas a 4 °C; cada mes se extrajeron muestras de cada una de las cepas de microalgas para evaluar su viabilidad y así establecer el periodo óptimo en el que podían ser conservadas bajo estas condiciones.

Además, se aplicaron técnicas de criopreservación (Fig. 21), ya que éste tipo de proceso permite la conservación de microorganismos a largo plazo (varios años) sin afectar su viabilidad, debido a que el metabolismo celular se pone en latencia biológica, disminuyendo así las funciones vitales de la célula e inclusive las reacciones bioquímicas relacionadas con la muerte celular, quedan detenidas.

3.3.2.4.1. Conservación de las Cepas de Diatomeas Bentónicas: Criopreservación. (Esquema 6).

La criopreservación es un proceso relacionado con el mantenimiento de la viabilidad de células y tejidos a muy bajas temperaturas, entre – 80 °C y – 196 °C.

Constituye una técnica útil para el mantenimiento de colecciones de cepas de fitoplancton (Day y Brand. 2005), porque reduce la contaminación y cambios genéticos, así como también, permite ahorrar tiempo, esfuerzo y espacio implicado con el mantenimiento de las cepas bajo condiciones de cultivo. (Mitbavkar y Anil 2006).

Las pruebas de criopreservación de las cepas de diatomeas se realizaron en base a la técnica citada por Mitbavkar y Anil. 2006, utilizando como criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO), que tiene la capacidad de pasar a través de las membranas celulares con mayor facilidad y debido a su rápida transferencia resulta ser mucho más fácil de remover de las células que el glicerol.

Se tomaron muestras de las cepas de microalgas, durante la fase exponencial, y se depositaron en criotubos (4 replicas de cada cepa). Mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min., los cultivos se concentraron hasta obtener densidades cercanas a 1×10^6 células/mL, luego se resuspendieron en 250 μ L de medio Guillard F/2 con DMSO a 2 M., y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 min., posteriormente los criotubos se transfirieron a 4 °C por 5 minutos y luego a - 4°C por otros 5 minutos. A continuación, fueron almacenadas en nitrógeno líquido (- 196 °C).

Luego de 24 horas, las muestras se sacaron del nitrógeno líquido y se descongelaron exponiéndolas a temperatura ambiente. A continuación, fueron

lavadas vía centrifugación con medio Guillard F/2 (500 µL) para remover el criopreservante, este proceso se repitió cinco veces. Cada muestra fue sembrada en tubos de ensayo estériles con 5 mL medio Guillard F/2 y expuesta a condiciones de cultivo para establecer si su viabilidad se vio afectada durante este proceso.

A su vez las muestras criopreservadas, inmediatamente después de ser recuperadas de nitrógeno líquido fueron observadas para determinar algún cambio morfológico tales como forma celular, tamaño celular y estructura del cloroplasto (intacto o roto).

3.3.3. Identificación de las Cepas de Diatomeas Bentónicas. (Esquema 7)

De cada una de cepas de microalgas, se hicieron observaciones de sus principales características morfológicas con ayuda del microscopio invertido Olympus IX-FLA (Fig. 22); realizando montajes de las mismas en las láminas portaobjetos.

Pero para identificar diatomeas hasta género, se debe primero limpiar la muestra, para ello se empleó la metodología descrita por Gualtero, 2007, que consiste en oxidar el material orgánico, de manera que solo quede el sílice de la pared celular de las diatomeas.

En microtubos de 1.5 mL, se tomaron 1 mL de cada cepa y se concentraron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 5 min. Este paso se repitió tres veces; en cada centrifugación, el sobrenadante era eliminado y se adicionaba 1 mL de muestra, hasta que finalmente el pelet obtenido fue resuspendido en 300 μ L de agua destilada.

Para oxidar la muestra, se adicionaron 300 μ L KMnO_4 (10 %) y se mantuvo en oscuridad durante 24 h. Luego, se añadieron 30 μ L de H_2SO_4 concentrado y se adicionó alícuotas de 50 μ L de H_2O_2 (30 %), hasta que la muestra quedó incolora.

A continuación se procedió a centrifugar las muestras a 10000 rpm por 5 min (6 veces), para eliminar el exceso de ácido; en cada centrifugación se descartó el sobrenadante y se añadió 500 μ L de agua destilada.

Se realizaron montajes de las muestras obtenidas en las láminas portaobjetos para ser analizados por microscopia Confocal (Olympus FLUOVIEW 1000) (Fig. 23).

La identificación de las mismas se realizó tomando en cuenta las características morfológicas, usando bibliografía especializada (Siqueiros *et al*, 2004; Sabbatini, *et al* 2005; Gualtero 2007; <http://craticula.ncl.ac.uk/EAdiatomkey> y <http://rbg-web2.rbge.org.uk>).

Además se procedió a tomar fotografías de cada uno de los organismos observados, para comparar dichas imágenes con las presentadas en otros estudios y de ésta manera establecer su respectiva División, Clase, Familia, Género y especie.

3.3.3.1. Taxonomía Molecular. (Esquema 8).

La identificación de diatomeas a nivel de género y especie, está basada casi exclusivamente en el análisis de las características morfológicas del frústulo y en menor grado en el estudio de las características estructurales de la célula viva. (Beszteri B., *et al.* 2001). Pero la aplicación de este tipo de técnicas resultan ser tediosas y a su vez requieren varios años de práctica. (Jahn R. 2007).

Además los detalles morfológicos que permiten establecer diferencias entre especies sólo pueden discernirse bajo las mejores condiciones ópticas y a menudo se requiere la observación con microscopio electrónico para una identificación fiable. (Guillou *et al.* 1999).

Con el desarrollo de las tecnologías de taxonomía molecular, los conocimientos en biología molecular son suficientes para poder identificar especies; se utilizan sondas de ADN (primers) específicos y complementarios a regiones genómicas conservadas al nivel del filo. En estas regiones conservadas existen variaciones nucleotídicas específicas que permiten identificar un microorganismo al nivel de especie.

Esta identificación se realiza gracias a la amplificación por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de los amplicones obtenidos de las regiones conservadas extraídas del ADN de los microorganismos aislados. Las secuencias son analizadas por diferentes programas que permiten identificar los microorganismos más cercanos a la secuencia en cuestión. (Fig. 24).

Para la caracterización molecular de cepas de microalgas aisladas del perifiton, se utilizó protocolos de extracción de ADN y PCR (Conceptazul S.A.). La extracción de ADN de las microalgas se realizó para cada especie con cultivos monoespecíficos, como se detalla a continuación:

3.3.3.1.1. Extracción de ADN.

En un microtubo se colocó 1.5 mL de cultivo, se centrifugó 13000 rpm por 8 minutos; una vez descartado el sobrenadante, se añadieron 400 µL de TENS, más 2 µL de proteinasa K; luego se incubó a 37 °C por 1 hora y se adicionó 200 µL de Fenol y 200 µL de Cloroformo: Isoamyl; homogenizando lentamente; luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos; la fase superior fue transferida, con mucho cuidado, a un tubo nuevo con 400 µL de etanol absoluto helado y se dejó en hielo durante una hora.

A continuación se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pelet obtenido fue lavado con 300 μ L de etanol 75 % helado, luego se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante y se dejó secar cerca del mechero. Finalmente el pelet se resuspendió en 50 μ L de TE y se almacenó a - 20 °C.

3.3.3.1.2. Amplificación por PCR .

Se empleó dos juegos de primers p23SrV-f1/r1 (Sherwood *et al.*, 2007) y ITS1-DiatomF/R (Creach *et al* 2006), cuyas características se resumen en la tabla I. Por cada reacción de PCR se adicionó: 45.8 μ L de premix, 1 μ L de sondas Forward, 1 μ L de sondas Revers, 0.2 μ L de TaqDNApol y 2 μ L del ADN extraído.

En la tabla II, se detallan las condiciones de amplificación empleadas para cada juego de primers.

3.3.3.1.3. Migración en electroforesis.

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas de ADN dentro de una matriz según su tamaño, dicha matriz actúa como una malla que detiene las moléculas más grandes y deja pasar los fragmentos pequeños con mayor facilidad a partir aplicación de un campo eléctrico.

La migración de los amplicones (15 µL) se realizó en geles de agarosa al 1.5 % conteniendo bromuro de etidio como sustancia de revelado (0.5 mg/mL), se utilizó como tampón de migración TAE 0.5 X (Tris - Ácido acético - EDTA) y como tampón de depósito azul de bromofenol al 5 %. El voltaje empleado fue de 100 voltios durante 10 minutos. Finalmente las bandas se visualizaron con UV, considerado que la obtención de una banda luminosa significa la presencia de fragmento de ADN de un único tamaño, mientras que la ausencia de bandas en los controles de extracción y PCR permitieron verificar que no hubo contaminaciones durante las manipulaciones. Una vez que se comprobó que los amplicones son correctos (presencia de una sola banda y del tamaño esperado), estos se enviaron a secuenciar.

3.3.3.1.4. Secuenciación y clasificación taxonómica

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en los programa Blast : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blast&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on., y Alga Terra: <http://www.algatterra.net/ATDB/Molecular/MolecularMain.cfm>. Ambos programas constituyen una base de datos que contiene numerosas secuencias que permiten la caracterización de diferentes cepas de organismos.

3.3.4. Cultivo de Microalgas. (Esquema 9).

Para el desarrollo del sistema de producción de microalgas, se empleó agua de mar (34 ‰) filtrada a 5 µm y esterilizada a 15 libras/pulgadas², 121 °C durante 20 minutos para volúmenes menores (hasta 1 litro), mientras que para volúmenes mayores (15 L a 1 T) el agua fue tratada con 10 ppm de Hipoclorito de sodio y neutralizada con 20 mL de una solución de Thiosulfato de sodio (20 g/L) por cada 100 mL cloro aplicado.

Como medio de cultivo se empleó el medio Guillard “F/2”, el mismo que ha sido utilizado con éxito en la producción de microalgas bentónicas (Almaguer *et al.* 2004) cuya formulación y preparación se detallan en las tablas III - V.

En la tabla VI, se describen los volúmenes utilizados en el aumento progresivo de los cultivos. Se tomó como punto de partida las cepas conservadas en medio sólido, para ello se sembró de una o más colonias en tubos de ensayos con 5 mL de medio (tubo – cepa) y se incubaron durante 5 a 10 días a 20 - 22 °C con iluminación constante.

Posteriormente se dio paso al aumento progresivo del volumen, se tomó 1 mL del tubo - cepa y se inoculó en frascos de vidrio con 9 mL de agua de mar nutrida con medio Guillard F/2 (10 mL volumen final). Los cultivos de 10 mL se repicaron a 100 mL, luego se llevaron a 1 L y a continuación a 10 L (relación 1:9), para los repiques correspondientes a 100 mL, 1 L y 10 L se emplearon fundas plásticas.

Los cultivos fueron mantenidos a temperatura (20 – 22 °C) e iluminación constante, la adición de aeración se realizó a partir de volúmenes de 1 L (Fig. 25 – 27). Los cultivos de 10 L se repicaron a 100 L y finalmente a 1 T, estos últimos se realizaron en recipientes plásticos y fueron mantenidos a temperatura ambiente e iluminación natural, bajo aeración fuerte (Fig. 29 – 31). El tiempo óptimo de cada repique se estableció de acuerdo a la dinámica de crecimiento de cada una de las cepas.

3.3.4.1. Determinación de la Dinámica de Crecimiento.

Dentro del protocolo de cultivo de todo microorganismo, es necesario determinar su dinámica de crecimiento; es decir, el incremento, en este caso, de la población microalgal alcanzada a través del tiempo, para así poder conocer la duración de cada una de las fases (Fase de latencia, Fase de crecimiento exponencial, Fase estacionaria y Fase de mortandad). (Fig. 32).

Además, es importante establecer el tiempo que le toma a cada una de las cepas alcanzar la fase exponencial, ya que si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las mismas condiciones de crecimiento no se observa la fase latencia y el crecimiento exponencial continúa a la misma velocidad. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia aún cuando las células del inóculo estén vivas.

La obtención de las curvas de crecimiento de cada microalga se realizó aplicando métodos espectrofotométricos, que consistieron en medir su densidad óptica (D.O.); es decir la absorbancia (cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo), considerando que la dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la densidad del cultivo. (Esquema 10).

Como primer punto, se estableció una “curva de calibración” con cada diatomea; para ello se tomaron 10 mL de cada cepa y con ayuda de la cámara de Neubauer se determinó la concentración (cel/mL), luego se realizaron varias diluciones a fin de obtener diferentes concentraciones (100000 - 200000 - 300000 - 400000 - 500000 - 600000 - 700000 - 800000 células/mL), la concentración obtenida en cada dilución se verificó a partir de conteos con la cámara de Neubauer.

Posteriormente, en una microplaca de 96 pocillos se colocaron por triplicado 200 µL de cada dilución, se consideró como blanco el agua de mar nutrida con la que se realizó las diluciones; y a continuación se efectuó la lectura de densidad óptica en el lector de Elisa - Sunris Basic TECAN, a 450 nm.

Una vez que los valores de D.O. promedio de cada dilución se restaron del valor promedio de la D.O. de la muestra blanco; estas fueron relacionadas con sus respectivas concentraciones (células/mL) obteniéndose de esta manera la recta de

regresión lineal con su respectiva ecuación ($Y = a X \pm b$; de donde Y corresponde a la concentración células/mL y X el valor de D.O.).

A continuación, se procedió a establecer la dinámica de crecimiento de cada cepa; diariamente se midió la densidad óptica de los cultivos de 10 mL, 100 mL, 1 L, 10 L y 100 mL. Conociendo la ecuación de la recta, de cada especie, se calculó directamente la concentración de células de las muestras sustituyendo el valor de la densidad óptica en esta ecuación. La D.O. empleada correspondió al valor obtenido al restar el promedio de D.O. de cada cultivo menos la D.O. de la muestra blanco.

3.3.5. Producción de Perifiton Domesticado – Pruebas de Colonización.

La producción del perifiton domesticado se realizó a temperatura ambiente e iluminación natural, bajo aeración moderada; en recipientes plásticos de 150 L., provistos con 100 L de cultivo monoespecífico de microalgas a una concentración de 2.5×10^5 a 3.5×10^5 células/mL., con nutrientes (100 mL de las soluciones 1: nitrato - fosfato, 2: metasilicato y 3: sequestrene).

Para la colonización de los sustratos se consideró la relación de 100 cm^2 de geotextil por cada litro de cultivo monoalgal. Dentro de los 100 L de cultivo, se colocaron aproximadamente 5 pedazos de geotextil $50 \times 40 \text{ cm}$ (2000 cm^2)

previamente colonizados con bacterias 10^4 UFC/cm² (76 G correspondiente a *Bacillus sp.*) (Fig. 33 y 34), considerando la importancia que representan este tipo de microorganismos dentro de la colonización de un sustrato. (Carrias *et al.* 2002; Marxsen y Witzel, 1991).

Para determinar la abundancia general de las microalgas en los sustratos, diariamente se tomaron muestras de 1 cm² de geotextil y depositaron en tubos falcon con 10 mL de agua de mar estéril. (Esquema 11).

Con la finalidad de desprender las microalgas, cada tubo fue agitado fuertemente por varios minutos y a continuación se retiró el sustrato para resuspenderlo en 10 mL de agua de mar estéril; dicho proceso se repitió 3 a 4 veces, hasta observar que la mayor parte de las microalgas se habían desprendido del sustrato.

El volumen de cada tubo fue concentrado en un solo recipiente y una vez homogenizado se procedió a establecer el número de células/mL con ayuda de la cámara de Neubauer, a partir del dato obtenido se estimó la cantidad de microalgas presentes en el volumen total que a su vez representó el número de células presentes en la superficie de sustrato analizado (1 cm²).

3.3.5.1. Evaluación de la colonización de las fibras de geotextil por Microscopia Confocal (LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy).

La evaluación de la colonización de las fibras de geotextil se realizó aplicando la Microscopia Confocal, cuyo principio se basa en la observación de la fluorescencia emitida (luz de emisión) por diferentes elementos o moléculas cuando están excitados por una iluminación específica (luz de excitación).

La observación de las microalgas se la realizó a partir de la autofluorescencia propia de organismos autótrofos, la misma que está dada por la presencia de la clorofila; mientras que para la observación de las bacterias se empleó bromuro de etidio (fluorocromo destinado para el estudio de ácidos nucleicos, tiñe cromosomas bacterianos y a su vez el núcleo de las microalgas). (Esquema 11).

Para evaluar la colonización de los sustratos, los geotextiles fueron monitoreados diariamente; para ello se extrajeron muestras de 1 cm^2 y se depositaron en microtubos con $500 \mu\text{L}$ de agua de mar esterilizada; luego se les adicionó $2.5 \mu\text{L}$ de bromuro de etidio y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Posteriormente se realizaron montajes en placas portaobjetos y se observaron en el microscopio Confocal utilizando los láseres adecuados para la excitación del fluorocromo y para la obtención de la autofluorescencia (Tabla VII) las imágenes fueron analizadas con los objetivos 10 X y 40 X. (Fig. 35).

3.3.6. Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas en Base al Cultivo de Post-Larvas *L. vannamei*.

El principal objetivo de estas experimentaciones fue determinar los beneficios de la aplicación de geotextiles colonizados con microalgas dentro del sistema de cultivo de camarón en términos de crecimiento y supervivencia.

3.3.6.1. Diseño experimental.

El sistema experimental consistió en cinco tratamientos (se evaluó el valor nutricional de cinco cepas de microalgas) más dos controles, un control sin la adición de sustrato y otro, con sustrato colonizado con una bacteria *Bacillus sp* (76 G); cada tratamiento se realizó por triplicado en recipientes plásticos de 7 L.

En total se emplearon alrededor de 21 recipientes, provistos con 5 L de agua de mar (34 ‰), y con suministro de aire para mantener los niveles de oxígeno apropiados. (Fig. 36).

3.3.6.2. Suministro de larvas.

Se trabajó con Post-larvas (PL10), las mismas que fueron suministradas por el “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopennaeus vannamei* - Marinazul S.A.”. Las post-larvas, fueron transportadas en fundas plásticas con oxígeno dentro de cajas de cartón para evitar que sean estropeadas durante el transporte.

3.3.6.3. Aclimatación y Siembra.

La aclimatación se realizó sumergiendo las fundas en un tanque provisto de la misma agua con la que fueron llenados los recipientes para cada tratamiento. Cada media hora se ajustó la temperatura (1 °C), salinidad (5 ‰) y pH (0.2), aplicando un sistema de recirculación; se agregó agua del tanque en la funda, eliminando el exceso a partir de un sifón con malla de 300 µm para evitar succionar larvas.

Una vez que las PL10 fueron aclimatadas, se procedió a sembrar un total de 50 individuos cada recipiente (densidad de siembra 10 PL/L).

3.3.6.4. Manejo de la alimentación. (Tabla VIII).

La alimentación basada en microalgas de cada tratamiento se suministró a partir de geotextiles maduros, considerando la relación del 30 % del área de fondo; dado que el área del fondo de los recipientes plástico fue aproximadamente de 320 cm², se adicionó 100 cm² (fragmentos de 5 X 20 cm) de geotextil colonizado (Fig. 38 y 40). Además se les proporcionó alimento artificial (30 % de proteína bruta); considerando el régimen empleado en los sistemas de cultivo (25 % de la biomasa).

3.3.6.5. Registro de parámetros: Físico – Químicos

El registro de parámetros Físico – Químicos se efectuó diariamente; se tomaron lecturas de temperatura (°C), salinidad (‰), niveles de oxígeno (ppm) y pH. (Fig. 39).

3.3.6.6. Análisis de Parámetros Biológicos.

El análisis de crecimiento y supervivencia se realizó al final de la prueba (después de 10 días); el porcentaje de supervivencia se obtuvo contando las larvas vivas de cada repetición por tratamiento, este dato se dividió por el número inicial de larvas sembradas y multiplicado por 100; mientras que el crecimiento se determinó a partir del peso promedio alcanzado al final de la experimentación, a partir del método gravimétrico o PL- gramo.

Para los diferentes tratamientos realizados se aplicó la Prueba de Duncan de comparación múltiple de medias para evaluar los diferentes tratamientos a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ utilizando para esto el programa Excel 2007 y el Software estadístico para análisis de experimentos Disexp 1.20.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas

Se lograron aislar 6 cepas de diatomeas bentónicas, 5 de ellas a partir de la combinación de las técnicas de diluciones sucesivas y siembra en medio sólido y una empleando el método de captura con micropipeta y siembra en agar.

Con respecto al lugar de origen, 4 cepas se obtuvieron de piscinas de semi - intensivo (19 y 20), mientras que las dos cepas restantes se aislaron de muestras procedentes de sistemas de cultivo intensivo. (15A y 17D) (Tabla IX).

Cabe destacar que el aislamiento fue destinado a obtener cepas de diatomeas bentónicas, por lo que, se seleccionaron únicamente aquellos pocillos

(microplacas - diluciones) y aquellas colonias (siembra en agar) que presentaron este tipo de diatomeas.

Durante el proceso de aislamiento, se pudo observar una variedad de diatomeas, pero algunas de ellas al ser sembradas en medio sólido no lograron crecer o viceversa, crecían únicamente en agar pero con un ritmo de crecimiento bajo (Fig. 41). Considerando que uno de los objetivos planteados fue el de obtener cepas de diatomeas de interés con los medios comerciales existentes; ante tales circunstancias, este tipo de microalgas no fueron consideradas.

Además, las 6 cepas aisladas: Diatomea 1 (D1), Diatomea 2 (D2), Diatomea 5 (D5), Diatomea 7 (D7), Diatomea 10 (D10) y Diatomea 12 (D12), (denominadas de esta forma según el orden en que se aislaron) fueron acondicionadas satisfactoriamente en el cepario a 20 °C, 34 ‰ y bajo iluminación constante. (Tubos 10 mL y medio sólido). (Fig. 19 y 20).

4.2. Purificación de Diatomeas Bentónicas.

A través de la técnica de siembra y resiembra clonales en placas, se logró obtener cultivos monoalgales de las seis cepas de diatomeas aisladas, pero los análisis microbiológicos reflejaron que la carga bacteriana de dichas cepas se encontraba entre 10^2 a 10^4 UFC/mL, siendo la cepas D5 y D10 las que presentaron una de las mayores concentraciones (10^4 UFC/mL).

Con la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no se logró eliminar totalmente la concentración bacteriana de los cultivos sin afectar la viabilidad de los mismos. Al aplicar concentraciones de 30 ppm (1 hora) la carga bacteriana se redujo al nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) sin causar daños sobre la viabilidad de la cepa, las células algales crecieron de manera óptima al ser sembradas en agar (Guillard F/2 solidificado); por el contrario, los tratamientos con concentraciones superiores a 30 ppm no registraron crecimiento bacteriano, pero en la mayoría de los casos la viabilidad de la cepa se vio afectada. (Fig. 42 – 45).

Para la cepa D5, en el tratamiento correspondiente a 10 ppm, se observaron daños celulares mientras que la carga bacteria registró una mínima reducción (Fig. 46).

En las figuras 44 y 46 se puede observar que a concentraciones mayores se logra reducir los niveles bacterianos pero la viabilidad de la cepa D5 es afectada considerablemente.

Ante tales resultados es importante considerar las interacciones entre bacterias y microalgas; varias investigaciones han demostrado que las bacterias pueden incrementar el crecimiento microalgal mediante la producción de algunas vitaminas y factores de crecimiento; además el desarrollo de un “bloom” de diatomeas depende de la dinámica de la comunidad bacteriana y las partículas asociadas a estas (Riemann *et al.* 2000). A su vez, Riquelme y Avendaño (2006)

al evaluar la capacidad de seis bacterias sobre el crecimiento de microalgas demostraron que el uso de *Halomonas* sp mejora el crecimiento de *Navícula veneta*.

Por lo que la presencia de este tipo de bacterias estaría relacionada con la viabilidad de las cepas aisladas; por tanto, al eliminar la carga bacteriana se estaría afectando directamente la dinámica del cultivo. Razón por la cual se dio paso a mantener los niveles bacterianos bajos (10^2 UFC/mL).

4.3. Conservación de las cepas de Diatomeas Bentónicas.

Todas las cepas fueron conservadas a 4 °C en medio Guillard F/2 líquido y sólido, con un tiempo de vida óptima máximo de 2 meses; a excepción de las cepas D7 y D12 cuya viabilidad bajo estas condiciones fue de 1 mes y 3 meses respectivamente. A su vez, la cepa D5 pudo ser mantenida por un período máximo de 6 meses en placas petri en medio F/2 solidificado. (Tabla X).

A partir de las técnicas de criopreservación aplicadas, las cepas D1 y D2 lograron ser mantenidas en nitrógeno líquido de manera exitosa (- 196 °C). Al ser expuestas a condiciones de cultivo a nivel de cepario (20 °C, 34 ‰, bajo iluminación constante), presentaron una dinámica de crecimiento normal, es decir su viabilidad no se vio afectada. (Fig. 47). Por el contrario las cepas D5, D7, D10 y D12 luego de ser reactivadas (expuestas a condiciones de cultivo) no crecieron,

presentaron células deterioradas con cloroplastos deformes y generalmente con una coloración verdosa, lo que indicaba que sus condiciones morfológicas y fisiológicas habían sido severamente afectadas durante tales procesos. (Fig. 48).

Es importante considerar que los excelentes resultados obtenidos sobre la criopreservación de microalgas (Mitbavkar y Anil 2006; Redekar y Wagh 2000) están relacionados con una reducción gradual de la temperatura (desde la temperatura ambiental hasta el punto de congelamiento), ya que la tasa de enfriamiento incide en la formación y el tamaño de los cristales de hielo dentro y fuera de la célula. A partir de una congelación rápida generalmente se produce estrés físico - químico a nivel celular que conlleva al deterioro e inclusive a la muerte de las mismas (Wagner *et al.* 2005). En cambio, un congelamiento uniforme (1 a 5 °C/min) limita estos daños ya que a más de reducir este tipo de estrés permite actuar de una mejor manera al criopreservante sobre la muestra.

Sin embargo, Mitbavkar y Anil (2006) lograron criopreservar una especie de microalga aplicando congelación directa, dicha especie corresponde a *Amphora coffeaeformis*; la misma que presenta características morfológicas similares a la cepa D1 y D2. Pero, dichos autores, al aplicar este mismo proceso en *Navicula delicatula* (similar a D10) no obtuvieron resultados favorables; por tanto es importante destacar que existen especies de diatomeas que son resistentes a este tipo de proceso, permitiendo así su criopreservación óptima.

Además, es necesario establecer que no existe una metodología estandarizada de criopreservación aplicable de manera eficiente para todo tipo de microalga; para ello hay que considerar los diferentes factores que inciden en el proceso de criopreservación, tales como: estado de la cepa, la concentración celular, el tipo y la concentración del criopreservante, el tiempo de exposición del cultivo con el reactivo, el ritmo de congelamiento y finalmente el proceso de descongelamiento (Wagner *et al.* 2005). Los mismos que pueden ser diferentes para cada especie; con respecto al criopreservante, Redekar y Wagh 2000 lograron la criopreservación de *Navicula subinflata* con un mayor índice de supervivencia al emplear glicol de etileno (51 %) en vez de DMSO (44 %) y de metanol (0 %).

Mientras que Cañavate y Lubian (1994) al evaluar la efectividad del DMSO y del metanol para la criopreservación de dos tipos de *Navicula* (*N. atomus* y *N. gaditana*), determinaron que la viabilidad de ambas especies no se veía afectada cuando se empleaba el metanol (5 %) como crioprotector.

4.4. Identificación de las cepas de Diatomeas Bentónicas.

4.4.1. Taxonomía Clásica.

A partir de las observaciones de muestras vivas, con ayuda del microscopio invertido y el microscopio confocal, se determinaron características tales como:

forma general del plano valvar y pleural de cada cepa, así como también su respectivo tamaño, además el número y la forma del cloroplasto.

Con la aplicación de la técnica basada en la oxidación de la materia orgánica, se obtuvieron frústulos de cada una de las cepas, lo que permitió analizar sus principales ornamentaciones (estrías, poros o bandas) y la presencia y ubicación del rafe.

Cabe destacar, que la identificación taxonómica de los organismos se realizó hasta género ya que las características de las mismas no correspondieron al de las claves de identificación y además no fue posible corroborar, con algún especialista, la identificación hasta especie.

Se logró determinar que las cepas correspondían a los géneros Amphora (D1 y D2), Navícula (D5 y D10), Nitzschia (D7) y Amphiprora (D12) (Tabla XIII). A continuación se describe cada una de las cepas aisladas con su respectivo género, considerando las características morfológicas observadas a través de la microscopia óptica y confocal:

4.4.1.1. Diatomea 1: *Amphora sp. 1* (Fig. 49 – 51).

Células solitarias inmóviles o agrupadas. Presentan valvas con margen ventral recto y margen dorsal liso y arqueado, extremos rostrados capitados, miden de 25 a 30 μm de longitud y 5 μm de grosor. Con un cloroplasto en forma de “H”, el

rafe es filiforme y poseen de 16 a 20 estrías punteadas, ligeramente radiales en toda la valva.

4.4.1.2. Diatomea 2: *Amphora sp. 2* (Fig. 52 – 54).

Células solitarias en constante movimiento pero generalmente se presentan agrupadas. Valvas con margen ventral recto y margen dorsal liso y arqueado, extremos curvados Miden 5 µm de longitud y 2 µm de grosor. Con un cloroplasto en forma de “H”. El rafe es filiforme, margen dorsal sin áreas hialinas.

4.4.1.3. Diatomea 5: *Navícula sp. 1* (Fig. 55 – 57).

Células solitarias y móviles. Valvas elípticas con extremos redondeados, vista pleural presenta forma rectangular miden 10 a 12 µm de longitud y 4 a 5 µm de grosor. Con dos cloroplastos parietales conectados por un estrecho istmo central; posee dos gránulos esféricos ubicados una en cada polo de la mitad de la célula, con dos rafes medianos filiformes.

4.4.1.4. Diatomea 7: *Nitzschia sp* (Fig. 58 – 60).

Células solitarias en constante movimiento pero pueden presentarse formando grandes agregados. Frústulos fusiformes, miden de 60 a 70 µm de longitud y de 8

a 10 μm de grosor. Extremos prolongados, rostrados, levemente girados sobre su eje apical, parte central lanceolada. Posee dos cloroplastos en el centro.

4.4.1.5. Diatomea 10: *Navícula sp. 2* (Fig. 61 – 63).

Células solitarias y móviles, aunque pueden formar agregados. Valvas lanceoladas con ápices ampliamente sub-rostrados, vista pleural presenta forma rectangular; miden de 15 a 20 μm de longitud y 5 μm de grosor. Posee de 18 a 20 estrías radiales en toda la valva, con dos cloroplastos en posición parietal y con dos rafes medianos filiformes

4.4.1.6. Diatomea 12: *Amphiprora sp.* (Fig. 64 – 66).

Células solitarias y móviles, no forman agregados. Frústulos constrictos en el medio y torcidos en forma de ocho, con una hendidura media en ambos lados, provista de estrías transversales elípticas punteadas. Miden de 70 a 80 μm de longitud y 20 a 30 μm de grosor. Poseen dos cloroplastos, el área axial es elevada, formando una quilla en la que está incluido el rafe, el mismo que es fuertemente sigmoidea y colocado a cada lado de la valva.

4.4.2. Taxonomía Molecular

Se logró obtener productos de amplificación (400 - 450 pb) de las cepas D2, D7, D10 y D12 aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1 (Fig. 67) y tras el análisis de sus secuencias (Tabla XI) se estableció que la cepa D7 correspondía a *Nitzschia sp.* (95 %) y la cepa D10 a *Navícula veneta* (96 %); mientras que las cepas D2 y D12 no pudieron ser identificadas, el análisis de sus secuencias mostraron similitud cerca del 96 % con clones de organismos no cultivables, pero es importante destacar que dichos clones corresponden a muestras de comunidades periféricas obtenidas tras la aplicación del juego de primers universales relacionados con secuencias de plástidos. (Tabla XIII).

Posteriormente, se obtuvieron productos de amplificación (cerca de 1000 pb) de las cepas D 1 y D 5 aplicando el juego de iniciadores ITS1-DiatomF/R (Fig. 68) y a partir del análisis de sus secuencias (Tabla XII) se determinó que la cepa D 1 correspondía a *Amphora salina* (96 %) y la cepa D 5 a *Sellaphora sp* (92 %). Por el contrario, no se obtuvieron amplicones de las cepas D2 y D12 con este juego de primers y por ende no se pudo realizar su caracterización molecular. (Tabla XIII).

Como se puede observar la caracterización molecular nos permitió corroborar la identificación hecha a partir de la aplicación de la metodología clásica.

En su mayoría la identificación realizada hasta nivel de género coincidió con los resultados obtenidos durante el análisis de sus respectivas secuencias, a excepción de la cepa D 5, que fue identificada en primera lugar como *Navícula* pero molecularmente se definió como *Sellaphora*; pero las diatomeas pertenecientes al

género *Sellaphora*, durante la mayor parte del siglo XX fueron consideradas como *Navícula sensu* y fue Mann (1989) que las clasificó como un nuevo género.

Para el caso de las cepas D2 y D12 que no pudieron ser identificadas molecularmente, es necesario considerar la posibilidad que hasta la fecha aún no han sido realizados estudios relacionados con el análisis del genoma de estas diatomeas y por ende en el banco de genes no han sido almacenadas información de este tipo.

4.5. Cultivo de Microalgas.

De las seis cepas de diatomeas aisladas, la cepa correspondiente a *Sellaphora sp.*, no pudo ser cultivada, para éste tipo de microalga no se registró ningún crecimiento al ser inoculada en volúmenes mayores a los 100 mL, únicamente se observó crecimiento al ser sembrada en volúmenes de 10 mL y en medio Guillard F/2 solidificado. Por el contrario, el manejo de los cultivos iniciales (10 mL – 100 mL – 1 L), intermedios (10 L – 100 L) y masivos (1 T) de cepas *Amphora salina*, *Amphora sp.*, *Nitzschia sp.*, *Navícula veneta*, y *Amphiprora sp.*, se realizó de manera exitosa bajo las condiciones de cultivo establecidas.

A partir de la aplicación de métodos espectrofotométricos se logró establecer la ecuación de regresión lineal que relaciona la densidad óptica = x con la densidad o concentración celular = y (número de células / mL) de cada una de las cepas

cultivadas; con coeficientes de correlación cercanos a 1 ($r^2= 0.99$), y a su vez se definió emplear el filtro de 405 nm para el análisis de cuantificación en los cultivos de *Amphora salina*, *Nitzschia sp.*, *Navícula veneta*, y *Amphiprora sp.*, y el filtro de 450 nm en los cultivos de *Amphora sp.* (Tabla XIV y Gráf. 1 - 5).

Tras el establecimiento de dichas ecuaciones, se determinó la dinámica o la curva de crecimiento de cada cultivo en cada uno de los volúmenes empleados para su respectiva producción (Tabla XV – XIX). Se observó que la fase de latencia duró aproximadamente 48 horas, mientras que la fase exponencial se registró durante el tercer día de cultivo. A partir del cuarto día, los cultivos entraron a la fase estacionaria y posteriormente a la fase de mortandad (quinto día) (Gráf. 6 - 10).

Además, se observó que las mayores y menores concentraciones alcanzadas se obtuvieron en los cultivos de 1 L. y de 1 T., respectivamente; esto se debe a que para los repiques de 1 L se emplearon nutrientes grado análisis y sus condiciones de cultivo (principalmente temperatura e iluminación) son controladas, en cambio para la producción de masivos el tipo de nutrientes corresponde a grado técnico y generalmente sus condiciones de cultivo depende de las condiciones del medio ambiente.

Estudios realizados sobre cultivo de diatomeas bentónicas por Valdés *et al.* (2003), comprobaron que diversos nutrientes tienen un marcado efecto sobre la formación de clorofilas en microalgas y que deficiencias de hierro, nitrógeno y

magnesio inhiben la síntesis y acumulación de clorofila y por ende afectan el desarrollo de los cultivos. Dichos autores concluyeron que el medio Guillard F/2 constituye un medio completo e idóneo para el mantenimiento de las cepas en el laboratorio, e incluso para la producción en grandes volúmenes de dos especies de *Amphora*.

A pesar de aquello, los cultivos de 100 mL, tratados con la misma calidad de nutrientes y bajo las mismas condiciones, presentaron densidades bajas o similares a los cultivos de 1 T.; para tal caso; se debe considerar que, lo que diferencia a un cultivo de 100 mL con los de 1 L es la aeración que se aplica en estos últimos. Lo que permite deducir la importancia que representan tanto la calidad de los nutrientes y la aeración en los cultivos de microalgas de hábitos bentónicos

Curbelo *et al.* (2003) recomienda el suministro de aeración fuerte en los cultivos de diatomeas bentónicas para evitar la adhesión de dichos organismos a las paredes y al fondo del recipiente. Con la aplicación de aeración se logra distribuir las células algales en todo el cuerpo de agua, aumentando de esta manera el área de cultivo.

Por otra parte, los cultivos de *Nitzschia sp.*, alcanzaron las mayores densidades (1200000 N° células /mL), mientras que los cultivos de *Amphiprora* registraron las concentraciones celulares más bajas (400000 células /mL). Los cultivos de

Amphora marina y Amphora sp., presentaron densidades similares, cerca de las 700000 y 800000 células /mL, respectivamente.

Las mayores concentraciones celulares observadas en los cultivos de *Navícula veneta* (650000 a 700000 células /mL), resultan ser similares a los reportados por Curbelo *et al.* (2003), quienes al desarrollar el cultivo de un tipo de *Navícula* obtuvieron concentraciones de 600000 células /mL en cultivos de 500 mL, aunque en los cultivos masivos reportaron concentraciones cercanas a 900000 células /mL, pero dichos cultivos se realizaron bajo otras condiciones, se desarrollaron en tanques traslúcidos donde recibían luz natural durante el día y se les proporcionaba luz artificial por las noches. Sin embargo Silva y Riquelme (2007) alcanzaron concentraciones de 2×10^6 células / mL al séptimo día de cultivo en la producción de *Navícula*, dentro de fotobiorreactores acondicionados con cerdas plásticas como sustrato; por ende, la aplicación de un determinado sustrato para el cultivo de este tipo de diatomeas se relacionaría con los hábitos bentónicos propios de microalgas perifitónicas, el suministro de aeración fuerte para este caso limitaría el crecimiento y el desarrollo de la cepa de *Navícula*.

4.6. Perifiton Domesticado – Pruebas de Colonización Monoespecífico

A partir del desarrollo de cultivos microalgales se obtuvieron geotextiles colonizados con una determinada cepa de diatomea bentónica (colonización

monoespecífica). La colonización de los geotextiles se realizó de manera óptima bajo las condiciones de cultivo preestablecida, la temperatura osciló entre 24 a 25 °C, la iluminación fue natural y la aeración se suministró de manera moderada lo que permitió la homogenización del medio y a su vez la fijación de diatomeas a las fibras del geotextil y posteriormente el crecimiento y desarrollo de las mismas en toda el área disponible. Durante dicho proceso se observó variaciones en la coloración del geotextil, de un tono negro propio del geotextil a un tono café claro u oscuro dependiendo del grado de colonización de las microalgas. (Fig. 69 y 70).

Además, la relación empleada entre la densidad algal (3.0×10^5 células / mL) y área de sustrato a colonizar ($100 \text{ cm}^2 / \text{L}$) permitió obtener geotextiles colonizados a partir de los 3 días.

En la tabla XX, se resumen las concentraciones algales presentes en los sustratos (células / cm^2) evaluados durante 7 días de muestreo. Lo que permite deducir que las diatomeas *Amphora salina*, *Amphora sp.* y *Nitzschia sp.*, corresponden a las cepas que presentaron un ritmo de colonización mayor, las altas densidades registradas de cada una de ellas, se observaron durante el cuarto día de cultivo: 1650000, 2775000 y 2100000 células / cm^2 respectivamente (Gráf.11).

Tales valores resultan ser similares a los reportados por Robert S. *et al.* (2004), quienes a partir de un estudio de colonización de diatomeas bentónicas en ambientes lóticos empleando como sustrato placas de vidrio, registraron

concentraciones cercanas a los 1×10^6 células / cm^2 a partir de los 28 días de estudio. Es decir que el protocolo establecido para la producción de perifiton domesticado permite reducir el tiempo que tomaría para la obtención de un perifiton bajo condiciones naturales.

Por el contrario las cepas *Navícula veneta* y *Amphiprora sp* presentaron ritmos de colonización bajos, llegaron a registrar cerca de 975000 y 900000 células / cm^2 respectivamente, al sexto día de cultivo.

Además, los resultados obtenidos se evaluaron por Microscopia Confocal, a partir de la autofluorescencia de las microalgas y de la tinción realizada en las bacterias.

En las figuras 71 – 79, se puede observar la colonización de la bacteria (naranja) y de cada una de las diatomeas (verde) en las fibras del geotextil.

Se obtuvieron imágenes considerando tres campos (microalgas, bacteria y geotextil) y para su análisis se combinaron de 4 diferentes formas (a: microalgas y bacterias, b: microalgas, c: microalgas y fibras de geotextil, d) microalgas, bacterias y fibras de geotextil.

Los datos obtenidos del proceso de colonización de las tres cepas que alcanzaron las más altas densidades se corroboraron mediante las imágenes tomadas (10 X y 40 X), en ellas se observa que durante el segundo día son pocas las fibras que aun

no han sido colonizadas; pero al llegar al tercer y cuarto día, el sustrato es totalmente colonizado e inclusive se observó un mayor número de células agrupadas.

Para el caso de las cepas *Navícula veneta* y *Amphiprora sp.*, se observó varias fibras de geotextil a lo largo de todo el monitoreo, sin ser colonizadas; inclusive en los días que se registraron las mayores densidades la presencia de fibras libres de microalgas fue notable, mientras que la presencia de células agrupadas resultó ser mínima.

4.7. Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas

4.7.1. Parámetros Físico - Químicos

La tabla XXV resume los parámetros físico - químicos registrados a lo largo de toda la experimentación, dichos valores no presentaron mayores fluctuaciones entre cada uno de los tratamientos, como podemos observar la temperatura se mantuvo en los 27.2 °C, siendo levemente mayor en el Control sin sustrato y en tratamiento con *Amphora salina* (27.4 °C) y menor en los tratamientos correspondientes a *Amphiprora sp.* (27.1 °C). La salinidad no presentó mayores variaciones, por lo general osciló entre los 30 y 31 ‰, mientras que el pH se mantuvo en la mayoría de los tratamientos en 8.7, resultó ser mayor (8.82) en los tratamientos con *Navícula veneta* y menor (8.66) en los tratamientos cuya alimentación estuvo basada en el suministro de *Amphiprora sp.* De igual manera

los niveles de oxígeno se establecieron dentro de los 7 ppm en todos los tratamientos durante todo el periodo de estudio.

4.7.2. Supervivencia – Peso y Biomasa.

Los datos de supervivencia, peso y biomasa obtenidos al final de la experimentación (10 días) se ilustran en la tabla XXI.

Las supervivencias registradas en los tratamientos con adición de sustrato se ubicaron por encima del 80 % (Graf. 12). Las mayores supervivencias se observaron en los tratamientos basados en *N. veneta* y *Amphiprora sp.* (94.67 y 93.33 % respectivamente), seguido por *Amphora sp* (92.67 %) dichas supervivencias fueron significativamente superiores ($P < 0,05$) al control sin sustrato (Tabla XXII). Por el contrario los tratamientos con *Amphora salina* (89.33 %) y *Nitzschia sp.* (82.67 %) aunque registraron supervivencias mayores que el control sin sustratos (78.67 %), esta no presentó diferencias significativas con respecto a este último. (Tabla XXII).

Con respecto al crecimiento (Graf. 13), las larvas cuyos tratamientos se basaron en la adición de geotextiles colonizados con microalgas alcanzaron peso promedio superiores a los controles, dichos valores oscilaron entre 0.158 g (*Navícula veneta*), 0.152 g (*Amphiprora sp*), 0.136 g (*Amphora sp*), 0.131 g (*Amphora salina*) y 0.127 g (*Nitzschia sp.*). Pero, los pesos promedios registrados en los

tratamientos con *Navícula veneta* y *Amphiprora sp* resultaron ser significativamente superiores ($P < 0,05$) al tratamiento sin sustrato. (Tabla XXIII).

Los mayores valores de biomasa se observaron en los tratamientos con sustratos colonizados con *Navícula veneta* (7.51 g), *Amphiprora sp* (7.05 g), *Amphora sp* (6.29 g) y *Amphora salina* (5.72 g) (Graf. 14), las mismas que resultaron ser significativamente superiores ($P < 0,05$) tanto al control con geotextil colonizado con *Bacillus sp* (4.59 g) como al control sin sustrato (4.25 g). (Tabla XXIV).

Mientras que la biomasa alcanzada en el tratamiento con *Nitzschia sp.* (5.27 g); como se puede observar, resultó ser superior al tratamiento sin sustrato y al tratamiento con geotextil más bacteria, pero estadísticamente no presentó variaciones significativas ($P < 0.05$) con respecto a tales controles.

De manera general, los resultados muestran que la mayor supervivencia, peso y biomasa obtenida corresponden a los tratamiento con *Navícula veneta* y *Amphiprora sp.*, dichos tratamientos resultaron ser superiores al control en un 20 %, 40 % y 60 % en términos de supervivencia, peso y biomasa respectivamente. (Graf. 15). Aunque es muy importante considerar que los tratamientos restantes resultaron ser mejores que el control sin sustrato, lo que demuestra que la presencia de geotextiles colonizados con microalgas y bacterias (perifiton domesticado) incide positivamente tanto en la supervivencia como en el crecimiento y por ende en la biomasa.

Además, con respecto al consumo del alimento natural, las figuras 81 - 83 permiten establecer que las larvas de cada uno de los tratamientos con adición de sustrato pastorearon las microalgas fijadas en las fibras del geotextil a ritmo mucho mayor que no permitió la renovación de los mismos dentro de los 10 días de la experimentación; a excepción del tratamiento con *Nitzschia sp*, en los que se observaron una mínima presencia de microalgas (Fig 82). Por otro lado, el análisis del trato digestivo por microscopia confocal, permitió establecer que la asimilación de las microalgas por parte de las larvas fue notable; en el tracto digestivo de las larvas de cada tratamiento con adición de sustrato se observaron residuos de clorofila con respecto a los controles. Es importante mencionar que existen pocos trabajos dirigidos a evaluar los efectos que representa la introducción de diatomeas bentónicas en los sistemas de producción de camarón, entre los que destacan principalmente estudios sobre aislamiento y cultivo de este tipo de microalgas (Valdés *et al.* 2003; Curbelo *et al.* 2003; Amaguer *et al.* 2004).

La falta de información sobre estudios en donde hayan sido evaluadas microalgas bentónicas a partir de la introducción de monocultivos en los sistemas de producción de *Litopenaeus vannamei* no permite discernir los resultados obtenidos en el presente estudio. Pero si consideramos la composición microalgal del perifiton de las diferentes experimentaciones reportadas, cuyos resultados han sido beneficiosos; es común observar la presencia de diatomeas pertenecientes a los géneros *Navícula* y *Amphora*.

Estudios realizados por Khatoon *et al* (2009) mostraron que el crecimiento y la supervivencia de las larvas cuya alimentación estuvo complementada con la adición de sustratos colonizados con *Navícula*, *Amphora* y *Cymbella* fueron significativamente superiores a las larvas de los tratamientos control, en un 35 % (crecimiento) y 55 % (supervivencia). Además, trabajos realizados por Lezama *et al* (2010), destinados a evaluar la influencia del perifiton (tapetes microbianos formados por *Navícula sp.*, *Amphora sp.* y *Pleurosigma sp*) en el sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei* con dos densidades de cultivos, registraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la supervivencia con valores de 97.8 y 96.1 %, mientras que en los controles fue de 81.1 y 70.6 % para los sistemas con 60 y 120 PL/m² respectivamente.

Para el caso de la cepa *Amphiphora*, no han sido reportados estudios sobre su aplicación en el sistema de cultivo de camarón, pero han sido ampliamente evaluados en el cultivo de moluscos, con resultados favorables en términos de crecimiento.

Correa *et al.* 2009, reportó un mejor crecimiento en postlarvas de *Haliotis rufescens* (abalon rojo) cuando eran alimentadas con *Amphiprora paludosa*, registró una tasa de crecimiento diaria de $25.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$, significativamente superiores ($P < 0.05$) a los tratamientos alimentados con *Nitzschia laevis* ($13.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$) y *Navicula incerta* ($21.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$). Viana *et al.* 2007, evaluó el valor nutricional de tres diatomeas bentónicas (*Navícula*, *Amphiprora* y *Nitzschia*) en la alimentación de *Haliotis fulgens* (abalon verde) y reportó que los mejores

crecimientos se obtuvieron con *Navícula* ($46.60 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{día}$ y $0.550 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{día}$) y *Amphiprora* ($39.38 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{día}$ y $0.424 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{día}$).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se estableció un cepario de microalgas propias de las comunidades perifitónicas; conformado por seis diferentes especies de diatomeas pennadas, empleando principalmente la combinación de las técnicas de aislamiento: diluciones sucesivas y siembra en medio sólido; lo que permite deducir que tales técnicas a pesar de no ser selectivas, constituyen unas de las herramientas fundamentales para el aislamiento y la conservación de cepas de microorganismos.
- Las diatomeas aisladas se definen como cepas no axénicas, ya que no se obtuvieron cultivos libres de bacterias; pero se destacó la importancia que representa la inclusión de este tipo de microorganismo en los sistemas de producción de diatomeas bentónicas.
- Mediante la aplicación de técnicas moleculares se corroboró la información obtenida a partir de los análisis taxonómicos tradicionales de 4 cepas (*Amphora sp1*, *Navícula sp2*, *Nitzschia sp* y *Navícula sp1*), las que

fueron identificadas como: *Amphora salina* (96 %), *Navícula veneta* (96 %), *Nitzschia sp.* (95 %) y *Sellaphora sp* (92 %) respectivamente.

- Las cepas *Amphora salina*, *Amphora sp.*, *Nitzschia sp.*, *Navícula veneta* y *Amphiprora sp* fueron cultivadas exitosamente bajo las condiciones de cultivo preestablecidas; cultivos iniciales 10 mL – 100 mL - 1000 mL (20 - 22 °C, 34 ‰, bajo iluminación constante, adición de aeración a partir de volúmenes de un litro), cultivos intermedios 10 L (20 - 22 °C, 34 ‰, bajo iluminación y aeración constante) - 100 L (temperatura ambiente, 34 ‰, bajo aeración constante e iluminación natural) y masivos 1 T (temperatura ambiente, 34 ‰, bajo aeración constante e iluminación natural).
- Además, se determinó que el tiempo óptimo para realizar cada repique está dado entre el tercer y cuarto día de cultivo (fase exponencial), considerando una dilución de 1 en 10, y que la adición de aeración fuerte a partir de los cultivos de 1 L es importante para la producción de este tipo de microalgas ya que a más de homogenizar el medio, limita la fijación y por ende aumenta los niveles de producción.
- Se estableció un protocolo para la producción de perifiton domesticado, basado en la relación de 100 cm² de sustrato por cada litro de cultivo de microalgas a una concentración de 3.0 x 10⁵ células / mL. A través de dicho proceso se obtienen geotextiles colonizados con concentraciones de

1650000, 2775000 y 2100000 células / cm² para las cepas *Amphora salina*, *Amphora sp.* y *Nitzschia*, respectivamente; y de aproximadamente 900000 células / cm² para el caso de las cepas *Navícula veneta* y *Amphiprora sp.*

- Se estableció el potencial que representan las diatomeas bentónicas dentro del sistema de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Principalmente las cepas *Navícula veneta*, *Amphiprora sp.*, las mismas que permiten obtener niveles de supervivencia superiores al 90 % con pesos promedio de 0.158 g y 0.152 g, respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Es necesario establecer los parámetros de cultivo de cada uno de las cepas aisladas, principalmente temperatura, salinidad, iluminación y requerimientos de nutrientes; ya que en el presente estudio, las cepas de diatomeas fueron cultivadas bajo condiciones estándares. Dicha información permitiría aumentar los niveles de producción y a su vez influenciarían en el valor nutricional de los cultivos, varios autores mencionan que el valor nutricional de las microalgas está relacionada con las condiciones de cultivo aplicadas a los sistemas de producción. (Fábregas *et al.*, 1995).
- Realizar trabajos enfocados a evaluar la factibilidad del uso de otro tipo de sustrato, que permita el desarrollo únicamente de organismos perifitónicos; debido a que el geotextil, empleado como sustrato en el presente estudio, a más de permitir el crecimiento y el establecimiento de comunidades perifitónicas, tiende a captar una variedad de organismos fitoplanctónicos (limitaría la disponibilidad de nutrientes) e inclusive materia orgánica (detritus, heces, residuos de alimento, etc.) que produciría el aumento de compuestos nitrogenados y por ende afectaría la calidad del agua.
- Desarrollar estudios destinados a evaluar la interacción entre Bacterias – Microalgas a fin de determinar cepas bacterianas que permitan aumentar los niveles de producción de microalgas bentónicas.

- Establecer los parámetros óptimos para la criopreservación de cada una de las cepas aisladas. Evaluar principalmente: el tipo y la concentración del criopreservante, el tiempo de exposición del cultivo con el criopreservante, la concentración celular, el ritmo de congelamiento y el proceso de descongelamiento.
- Evaluar la aplicación de técnicas de cultivo masivo relacionada con la producción de microalgas bentónicas, tales como el cultivo a través de Fotobiorreactores, ya que éste tipo de técnicas permitiría aumentar los niveles de producción a partir de la reducción de tiempo y espacio.
- Evaluar el efecto de la inclusión de las microalgas aisladas en los sistemas de cultivo de otros tipos de organismos de interés acuícola; ya sea para establecer efectos beneficiosos en la supervivencia y crecimiento o para la regulación de la calidad del agua.

BIBLIOGRAFÍA

- AKIYAMA D, Dominy W. y Lawrence A. 1992. Penaeid shrimp nutrition. En: Fast, A. W., Lester, J. (Eds.) Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier. Amsterdam. pp. 535-567.
- ALMAGUER Y., Alfonso E., y Leal S. 2004. Aislamiento y Cultivo de dos Especies de Diatomeas Bentónicas. Investigaciones Marinas 25(1):57-64
Sitio web: [http://www.dict.uh.cu/Revistas/Inv_Marinas/25\(1\)pdf/2004-57.pdf](http://www.dict.uh.cu/Revistas/Inv_Marinas/25(1)pdf/2004-57.pdf).
- APROMAR. 2004. La Acuicultura en el mundo. 1: 8-9. Sitio web: www.apromar.es.
- AQUAVISIÓN. 2009. El Langostino Peruano Liderando la producción acuícola nacional. Desarrollo Acuícola. pp: 8 – 9. Sitio web: www.aquavisionperu.com.
- ARNOLD S., Sellar M., Crocos P., y Coman G. 2005. Response of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*) to intensive culture conditions in a flow through tank system with three-dimensional artificial substrate. Aquaculture 246, 231 - 238.
- AVENDAÑO R. y Riquelme C. 2006. Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. Aquacultural Engineering 36, 97–104. Sitio web: www.sciencedirect.com.
- AZIM M., Beveridge M., Van Dam A., Verdegem M., y Wahab M. 2001a. The Potential of Periphyton-based Culture of Two Indian Major Carps, Rohu *Labeo rohita* y Gonia *Labeo gonius*. Aquaculture Research, 32:209 – 216.

- AZIM M., Wahab M., Van Dam A., Beveridge M., Milstein A., y Verdegem M. 2001b. Optimization of fertilization rate for maximizing periphyton production on artificial substrates and the implications for periphyton-based aquaculture. *Aquaculture Research*. 32:749-760.
- AZIM M., Beveridge M. Van Dam A., y Verdegem M. 2005. Periphyton and Aquatic Production: an Introduction. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 1:1-7.
- AZIM M., Verdegem C., Khaton H., Wahab M., Van Dam A., y Beveridge M. 2002. A comparison of fertilization, feeding and three periphyton substrates for increasing fish production in freshwater pond aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture* 212: 227 - 243.
- AZIM M., y Asaeda T. 2005. Periphyton Structure, Diversity and Colonization. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29.
- BALLESTER E., Wasielesky Jr., Cavalli R., Santos M., y Cabreu P. 2003. Biofilm influence on survival and growth of the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in nursery system. Abstract # 484. En: *World Aquaculture 2003 Book of Abstracts*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- BESZTERI B., Ács É., Makk J., Kovács G., Márialigeti K., y Kiss K. 2001. Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pág: 1581–1586.

- BONILLA P., y Massaut L. 2002. Dinámica del plancton en estanques camaroneros. Publicaciones - CENAIM.
- BRATVOLD D., y Browdy C. (2001). Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats®) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195: 81–94.
- BROWDY C., Bratvold D., Stokes A., y McIntosh R. 2001. Perspective on the application of closed shrimp culture. In Browdy C., y Jory D. *The New Wave, Proceeding of the Special Session of Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp 20 - 34.
- BURFORD M., Sellars M., Arnold S., Keys S., Crocos P., Preston N. 2004. Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus*, in high-density rearing systems. *Aquaculture research* 35, 508 - 515.
- CAMPAÑA A., Martínez L., y Martínez M. 2004. Manejo de la Productividad Natural en el Cultivo del Camarón. Sitio web: www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vii/pdf/32LuisMartinez.pdf.
- CAÑAVATE J., y Lubian M. 1994. Tolerance of Six Marine Microalgae to the Cryoprotectants Dimethyl Sulfoxide and Methanol. *Journal of Phycology*. 30: 3559 – 565.
- CARRIAS J., Serre J., Ngando T., Amblard C. 2002. Distribution, size and bacterial colonization of pico - and nano – detrital organic particles

- (DOP) in two lakes of different trophic status. *Limnology and Oceanography* 47: 1202 – 1209.
- CHEN Y. 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263 (1-4):97-106.
- CHRISTENSEN B. 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology* 10: 181-202.
- CHRISTENSEN B., y Characklis W. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. En: Azim M., y Asaeda T. 2005. *Periphyton Structure, Diversity and Colonization. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29.
- COWLING M., Hodgkiess T., Parr A., Smith M., y Marrs S. 2000. An alternative approach to antifouling based on analogues of natural processes. *The Science of the Total Environment* 258: 129 – 137. En: AZIM M., y Asaeda T. 2005. *Periphyton Structure, Diversity and Colonization. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29.
- CÓRDOVA J., García F., y Navarrete del Toro M. 2004. Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternative method of evaluation. *Aquaculture* 233, 439 – 449
- CORREA J., Sánchez M., Viana M., y Flores N. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*. 21:387–393

- CROCOS P., Arnold S., Coman G., y Sellars M. 2003. Ultra - high - density production of juvenile *Penaeus esculentus* and *P. monodon* in a tank system using artificial substrates. Abstract # 127. In: World Aquaculture 2003 - Meeting Abstracts. World aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- CUZON G., Lawrence A., Gaxiola G., Guillaume J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vanamei* reared in pond or in tanks. *Aquaculture* 235, 513–551.
- CURBELO R., Leal S., Núñez N., Quintana P., Benguela I., Muñoz D., Almaguer Y. 2003. Cultivo de la microalga bentónica *Navicula* sp. para la alimentación de las primeras postlarvas de Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 310-319. Sitio web: <http://www.civa2003.org>.
- DAUME S., Krisinich A., Farrell S., Gervis M., 2000. Settlement and early growth of the abalone *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Shellfish Res.* 19, 506–507.
- DAY J., y Brand J. 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures, in: R.A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, Academic press, New York, pág: 165–187.
- DEMPSTER P. et al. 1993. Herbivory in the Tilapia *Oreochromis niloticus* a Comparison of Feeding Rates on Periphyton and Phytoplankton. *J. Fish Biol.* 43, 385 – 392. En: Baird D., Beveridge M., Huchette S., y Ireland M. 2000. The Impacts of Grazing by Tilapias *Oreochromis niloticus* on

- Periphyton Communities Growing on Artificial Substrate in Cages. *Aquaculture* 186:45 – 60.
- DEMPSTER, P. et al. 1995. Can Fish Survive by Filter-feeding on Microparticles?. Energy Balance in Tilapia Grazing on Algal Suspensions. *J. Fish Biol.* 47, 7–17. En: Baird D., Beveridge M., Huchette S., y Ireland M. 2000. The Impacts of Grazing by Tilapias *Oreochromis niloticus* on Periphyton Communities Growing on Artificial Substrate in Cages. *Aquaculture* 186:45 – 60.
- DOMINGOS J. 2003. Efeito do uso de diferentes quantidades de substratos artificiais na engorda do camarao marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), em um sistema de cultivo semi-intensivo. Florianópolis, Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciencias Agrarias. Curso de Pos-Graduacao em Aquicultura. Sitio web: <http://www.tede.ufsc.br/teses/PAQI0136.pdf>
- DRÁBKOVÁ M., Admiraal W., y Maršálek B. 2007. Combined Exposure to Hydrogen Peroxide and Light – Selective Effects on Cyanobacteria, Green Algae, and Diatoms. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (1), pág: 309–314
- EPP M., Ziemann D., y Schell D. 2002. Carbon and Nitrogen dynamic in a zero water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research* 33, 839 - 846.
- FAO. 2008. Fisheries Topics: Research. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Examen mundial de la pesca y la acuicultura. La

acuicultura. Producción acuícola. 1:18-19. Sitio web: <http://www.fao.org/fishery/sofia/es>.

FABREGAS J., Patiño M., Arredondo B., Tobar J., y Otero A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tolos modify production and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 287-292.

FOCKEN U., Groth A., Coloso R., y Becker K. 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture* 164,105–116. Gamboa J., Molina C., y Cahu C. 2003. “Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia.” *Aquaculture Research* 34, 1403-1412.

GAMBOA J., Molina C., y Cahu C. 2003. “Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia.” *Aquaculture Research* 34, 1403-1412.

GALLARDO W., y Buen S. 2003. Evaluation of mucus, Navicula, and mixed diatoms as larval settlement inducers for the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Aquaculture* 221, 357–364.

GOUDA R., Kenchington E., Hatcher B., y Vercaemer B. Effects of locally-isolated micro-phytoplankton diets on growth and survival of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) larvae. *Aquaculture* 259 (1-4):169-180.

GOLDMAN C. y Horne A. 1994. *Limnology*, Second ed. McGraw-Hill Book Company, USA. En: Asaeda T., y Hong Son D. 2000. *Spatial Structure*

- and Populations of a Periphyton Community: A Model and Verification. *Ecological Modelling* 133: 195–207.
- GOLDSBOROUGH L., y Robinson G. 1996. Patter in wetlands. En: Stevenson R., Bothwell M., y Lowe R. (eds) *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, New York, pp. 77-117.
- GORDON N., Neori A., Shpigel M., Lee J., y Harpaz S. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture* 252 (2-4):225-233.
- GUALTERO L. 2007. Composición y Abundancia de las Algas Bénticas de Cinco Sistemas Lóticos de Puerto Rico. Sitio web: <http://www.grad.uprm.edu/tesis/gualteroleal.pdf> –
- GUILLOU L., Chrétiennot-Dinet J., Medlin K., Claustre H., Loiseaux-de Goër S., y Vaultot D. 1999. Balimonas: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *Journal Phycology*. 35:368-381.
- GUZMAN C., Gaxiola G., Rosa C., y Torre Blanco A. 2001. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth, and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 7, 113 - 122.
- HAACK, T. y McFeters G., 1982. Microbial Dynamics of an Epilithic Mat Community in a High Alpine Stream. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 702–707.

- HOAGLAND K., Roemer S., Rosowski J. 1982. Colonization and community structure of two periphyton assemblages with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). *American Journal of Botany* 69, 188-213.
- HUNTER, B., PRUDER, G. y WYBAN, J. 1987. Biochemical composition of pond biota, shrimp ingesta, and relative growth of *Penaeus vannamei* in earthen ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 18, No. 3, 167-174.
- JACKMAN A., Kim B., y Triska F. 1992. Modeling biotic uptake by periphyton and transient hyporrheic storage of nitrate in a natural stream. *Wat. Resour. Res.* 28, 2743–2752. En: Milstein et al, 2003. The Effects of Periphyton, Fish and Fertilizer dose on Biological Processes Affecting Water Quality in Earthen Fish Ponds. *Environmental Biology of Fishes*.
- JAHN R., Zetzsche H., Reinhardt R. y Gemeinholzer B. 2007. Diatoms and DNA barcoding: A pilot study on an environmental simple. *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting*. Pág: 63 - 68.
- JEE J., Koo J., Keum Y., Kang J., Park K., y Kang J. 2007. Effects of diet and sediment type on survival, growth and moulting of juvenile tiger crab, *Orithyia sinica*. *Aquaculture Research* 38 (1):26-35.
- KESHAVANNATH P., Gangadhar B., Ramesh T., Van Rooij J., Beveridge M., Verdegem M., y Van Dam A. (2001). Use of artificial substrates to enhance production of freshwater herbivorous fish in pond culture. *Aquaculture* 213: 207- 218.
- KEYS S. 2003. Aspect of the biology and ecology of the brown tiger prawn, *Penaeus esculentus*, relevant to aquaculture. *Aquaculture* 217, 325 - 334.

- KHANT S., Furtada J., y Lim R. 1987. Periphyton on artificial and natural substrate in a tropical river. *Archiv für Hydrobiologie* 28:473-484. En: AZIM M., y Asaeda T. 2005. Periphyton Structure, Diversity and Colonization. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29.
- KHATOON H., Yusoff F., Banerjee S., Shariff M., Mohamed S., 2007. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture*. Sitio web: www.sciencedirect.com
- KHATOON H., Banerjee S., Yusoff F., y Shariff M. 2008. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquaculture Nutrition* In Press.
- KHOI C., Guong V., y Merckx R. 2006. Growth of the diatom *Chaetoceros calcitrans* in sediment extracts from *Artemia franciscana* ponds at different concentrations of nitrogen and phosphorus. *Aquaculture* 259 (1-4):354-364.
- KING R., Flick G., Pierson M., Smith S., Boardman G., y Coale C. 2004. Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 13, 125–133.
- KLINKHARDT M. 2007. The blue revolution – feed alternatives for aquaculture. En FAO. Global Trade Conference on Aquaculture, 29–31 May 2007, Qingdao, China, editado por R. Arthur y J. Nierentz. *Actas de la pesca de la FAO N.º 9*. Roma.

- KLUMPP D. y Polunin N. 1989. Partitioning among grazers of food resources within damselfish territories on a coral reef. En: Azim M., Berevidge M., Van Dam A. y Verdegem M. 2005. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. Periphyton and Aquatic Production: an Introduction. 1:2-3.
- KUHN D., Boardman G. y Flick G. 2008. Integrando efluentes acuícolas con el cultivo de camarones como una mejora a la sustentabilidad. Aquacultural. Engineering Society. 11: 2-4.
- KUHN D., Boardman G., Craig S., Flick G., Mclean E. 2009. Use of Microbial Flocs Generated from Tilapia Effluent as a Nutritional Supplement for Shrimp *Litopenaeus vannamei* in Recirculating Aquaculture Systems. Alternativas. Panorama Acuícola Megazine. pág (32-36).
- KUMLU M., y Eroldogan T. 2000. Effects of Temperature and Substrate on Growth and Survival of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae) Postlarvae. Turkish Journal Zoology 24, 337 - 341.
- KUMLU M., Eroldogan O., y Saglamtimur B. 2001. The effects of salinity and added substrates on growth and survival of *Metapenaeus monoceros* (Decapoda: Penaeidae) post-larvae. Aquaculture 196, 177-188.
- LAMBERTI G. 1996. The role of periphyton in benthic food webs. En: Gualtero L. 2007. Composición y Abundancia de las Algas Bénticas de Cinco Sistemas Lóticos de Puerto Rico. Sitio web: <http://www.grad.uprm.edu/tesis/gualteroleal.pdf> –
- LANE Ch. y Taffs K. 2003. A Comparison of Diatom Community Structure on Natural and Artificial Substrata. Hydrobiologia 493:65-79.

- LEBEAU T., y Robert J. 2002. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:624–632
- LEMOS D., García F., Hernández P., y Navarrete del Toro A. (2002). Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content in larval and postlarval White shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture* 214, 363-381.
- LEZAMA C., Paniagua J., Zamora J. 2010. Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 129-142.
- LIBORIUSSEN, L. 2003. Production, regulation and ecophysiology of periphyton in shallow freshwater lakes. Tesis PhD. National Environmental Research Institute Ministry of the Environment. University of Aarhus, Denmark.
- LOEB S., Reuter J. y Goldman C. 1983. Litoral zone production of oligotrophic lakes – the contributions of phytoplankton and periphyton. En: AZIM M., Beveridge M. Van Dam A., y Verdegem M. 2005. Periphyton and Aquatic Production: an Introduction. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 1:1-2.
- MANN D (1989). The diatom genus *Sellaphora*: separation from *Navicula*. *Br. Phycol. J.* 24, 1-20. p. 2

- MARTÍNEZ-CÓRDOVA L., y Enríquez-Ocaña F. (2007). Study of the benthic fauna in a discharge lagoon of a shrimp farm with special emphasis on polychaeta. *J. Biol. Sci.* 7, 12–17
- MARTÍNEZ E., y Southgate P. 2007. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture* 263 (1-4):220-226.
- MARXSEN J., y Witzel K. 1991. Significance of extracellular enzymes for organic matter degradation and nutrient regeneration in small stream. En: AZIM M., y Asaeda T. 2005. Periphyton Structure, Diversity and Colonization. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29
- McCORMICK P., O'Dell M., Shuford R., Backus J., y Kennedy W. 2001. Periphyton responses to experimental phosphorus enrichment in a subtropical wetland. *Aquatic Botany*. 71: 119 – 139.
- MERIDIAN Applied Technology Systems. Sitio web: <http://famac.www7.50megs.com/mercados/mercadosBI77.html>
- MILSTEIN A., Azim M., Wahab M. y Verdegem M. 2003. The effects of periphyton, fish and fertilizer dose on biological processes affecting water quality in earthen fish ponds. *Environmental Biology of Fishes* 68, 247-260.
- MILSTEIN A. et al. 2006. Pruebas en Sistemas Acuícolas Basados en Perifiton en la Primera Granja de Tilapia con Certificado Orgánico. *Panorama Acuicola Magazine*. 11(6): pág (45 – 47). Sitio web: <http://www.panoramaacuicola.com/ediciones/pam-11-6/45-47.pdf>.

- MITBAVKAR S., y Anil C. 2006. Cell damage and recovery in cryopreserved microphytobenthic diatoms. *Cryobiology*. 53: pág: 143–147
- MONTGOMERY A., Matsuda E., Ootoshi C., y Moss. S. 2003. Effects of artificial substrate and water source on growth of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2):210-213.
- MORALES V. 1990. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Cartilla Pradepesca. pp 1.
- MOREIRA J. 1988. Productividad primaria do periphyton em viveiros destinados a piscicultura. Dissertação do Mestrado. Univ. Federal de Bahía, Bahía, Brasil. 250p. En: Montoya Y. y Ramírez J. 2007. Variación estructural de la comunidad perifítica colonizadora de sustratos artificiales en la zona de ritral del río Medellín, Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 55: 585-593.
- MOSS K., y Moss S. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35 (4), 536 - 542.
- OSHURKOV V. 1992. Succession and Climax in Some Fouling Communities. *Biofouling* 6:1-12. En: Guevara G., Reinoso G., y Villa F. 2006. Comunidad de invertebrados del perifiton del río Combeima (Tolima, Colombia). *Revista Tumbaga*, 1, 43-54. Sitio web: http://utolima.ut.edu.co/Tumbaga/REVISTA_TUMBAGA/PDFS/TUMBAGA_GIOVANNY_GUEVARA.pdf.

- OTOSHI C., Montgomery A., Matsuda E., y Moss S. 2006. Effects of artificial substrate and water source on grow of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 37(2):210-213.
- PARKER P., Anderson R., y Lawrence A. 1989. A $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system.
- PETERSON C. 1996. Response of benthic algal communities to natural physical disturbance. En: Stevenson R., Bothwell M., Lowe R., editors. Algal ecology: freshwater benthic ecosystems. San Diego: Academic Press; 1996. p. 375-403
- PINA P., Nieves M., Ramos L., Chavira C., y Voltolina D. 2005. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture 249 (1-4):431-437
- PISSETTI L. 2004. Efeitos da densidade de estocagem e do substrato artificial no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) em cercados. M.Sc. Thesis. Federal University of Rio Grande. Brazil. 48 pp.
- PUELLO - CRUZ A., Sangha R., Jones D., y LeVay L. 2002. Trysin activity during larval development of *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed on live feeds. Aquaculture research 33, 333 - 338.
- QUISPE M., y Berger C. 2006. Peru and Ecuador: Improve Shrimp Farming. Perspectivas. Panorama Acuicola Megazine. pág (54-61).

- RACH J., Gaikowski P., Ramsay T., 2000. Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacterial gill disease infections on hatchery-reared salmonids. *J. Aquat. Anim. Health* 12, pág: 119–127.
- REDEKAR P., y Wagh A. 2000. Cryopreservation studies on the marine diatom *Navicula subinflata* Grun. *Seaweed Res. Utiln.*, 22: 183 - 187.
- RIEMANN L, Steward G. y Azam F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 578-587.
- ROBERT S., SABATER S., y BEARDALL J. 2004. Benthic Microalgal Colonization in Streams of Differing Riparian Cover and Light Availability. *Journal of Phycology*. 40, 1004–1012
- ROBERTS R., 2001. A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis spp.*). *J. Shellfish Res.* 20, 571–586.
- ROLDÁN G. 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, pág 529. En: Arcos M., Ávila S., Estupiñán S., y Gómez A. 2005. Indicadores Microbiológicos de Contaminación de las Fuentes de Agua. NOVA. Publicación científica issn: 1794-2470 vol.3:1-116. Sitio web: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf.
- ROMANI, A. y Sabater S., 1999. Effect of Primary Producers on the Heterotrophic Metabolism of a Stream Biofilm. *Freshwater Biology* 41: 729–736.

- ROSENBERRY R. 2003. Word Shrimp Farming 2003. Aquaculture Digest, San Diego, California.
- ROTHLISBERG P. 1998. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture* 164: 49 - 65.
- SABBATINI M., Sala S., y Vouilloud A. 2005. Diatomeas perifíticas de la cuenca del Río Sauce Grande (Buenos Aires, Argentina). 60 (1): pág: 77-89. Sitio web: www.fzb.rs.gov.br/publicacoes/iheringia-botanica/lh60p77-89.pdf.
- SAIKIA S., y Das D. 2009. Potentiality of Periphyton-based Aquaculture Technology in Rice-fish Environment. *Journal of Scientific Research*. 1 (3), 624-634.
- SALDARRIAGA D. y Alvarado A. (2008). Efecto del perifiton adherido a substratos artificiales sobre el cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei*. Universidad Nacional de Tumbes. Facultad de Ingeniería Pesquera. Departamento Académico de Ingeniería Pesquera.
- SANDIFER P., Hopkins J., y Stokes A. 1987. Intensive culture potential of *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 18: 94-100
- SCHRYVERA P., Craba R., Defoirdta T., Boona N., y Verstraete W. 2008. Líneas básicas de la tecnología de bio-flocs: un valor agregado para la acuicultura. Investigación y desarrollo. *Panorama Acuicola Magazine*. pp. 10-20.
- SHAMSUDIN L., y Sleigh M. 1995. Seasonal changes in composition and biomass of epiphytic algae on the macrophyte *Ranunculus penicillatus* in a chalk stream, with estimates of production, and observations on the epiphytes of *Cladophora glomerata*. *Hydrobiologia* 306:85-95.

- SIEHOFF S., Hammers-Wirtz M., Strauss T., y Toni H. 2009. Periphyton as alternative food source for the filter-feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshwater Biology* 54, 15–23.
- SILVA F., y Riquelme C. 2007. Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquacultural Engineering* 38: 26–35
- SIQUEIROS et al. 2004 Catálogo Iconográfico de Diatomeas de Hábitats Rocosos y su Incidencia en la Dieta de Abulones (*Haliotis* sp.) Jóvenes de Baja California Sur, México. *Oceánides*, 19(2): pág: 29-103.
- STELZER S., y Lamberti G. 2001. Effect of N:P ration and total nutrient concentration on stream periphyton community structure, biomass, and elemental composition. *Limnology and Oceanography* 46: 356-367.
- STEVENSON R. et al. 1996. Role in Nutrient Cycling in Streams. *Algal ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, 609 - 633 pp.
- STEVENSON R. 1996. The stimulation and drag of current. En: Gualtero L. 2007. Composición y Abundancia de las Algas Bénticas de Cinco Sistemas Lóticos de Puerto Rico. Sitio web: <http://www.grad.uprm.edu/tesis/gualteroleal.pdf> –
- SOARES R., Peixoto S., Wasielesky Jr. 2005. Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 322, 167–176.

- TAW N. Hendri F., Tarigan N., Sidabutar K. 2008. Cosecha parcial y Sistema Biofloc son promisorios para el Camarón Blanco del Pacífico. *Global Aquaculture Advocate*. pp 27-28
- THOMPSON F., Abreu P., y Wasielesky W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203, 263–278.
- TIDWELL J., y Bratvold D. 2005. Utility of Added Substrates in Shrimp Culture. Pages 247–268 En: Azim M., Beveridge M., Van Dam A., y Verdegem M., editors. *Periphyton - ecology, exploitation and management*.
- VALDÉS Y., Alfonso E., Leal S. (2003). Aislamiento y cultivo de diatomeas bentónicas con vistas a ser usadas en maricultivo. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 66-76. Sitio web: <http://www.civa2003.org>.
- VALENZUELA M., Suárez J., Sánchez A., y Rosas C. 2002. Cultivo de camarón blanco del Golfo de México (*Litopenaeus setiferus*) en estanques de manto freático. II Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Limnología. Ciudad de México 23-25 octubre de 2002.
- VAN DAM A, et al. 2002. The Potential of Fish Production Based on Periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 1–31.
- VAN DIJK G., 1993. Dynamic and attenuation characteristics of periphyton upon artificial substratum under various light conditions and some additional observations on periphyton upon *Potamogeton pectinatus*. En: Azim M.,

- y Asaeda T. 2005. Periphyton Structure, Diversity and Colonization. *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. 2:15-29.
- VIANA M., Correa G., Lazo J., y Frías R. Durazo E., Vasquez C. 2007. Digestive physiology and metabolism of green abalone *Haliotis fulgens* from postlarvae to juvenile, fed three different diatoms. *Aquaculture* 271: 449–460.
- VINATEA L. 2006. Microbiología aplicada al cultivo de langostinos. Conferencia de Nicovita - Alicorp. Tumbes, Perú: Alicorp.
- WAGNER S., Hoffer S., y Holt Z. 2005. Comparative Analysis of Two Cryopreservatives on Two Marine Plankton Species: *Isochrysis* and *Pseudo-nitzschia*. University of Washington – Tacoma. Sitio web: http://courses.washington.edu/uwtjoe/2007_01_01.pdf
- ZMORA O., y Shpigel M. 2006. Intensive mass production of Artemia in a recirculated system. *Aquaculture* 255: 488 – 494
- XENOPOULOS M., y Bird D. 1997. Effect of Acute Exposure to Hydrogen Peroxide on the Production of Phytoplankton and Bacterioplankton in a Mesohumic Lake.

ANEXOS

TABLAS

Tabla I. Taxonomía Molecular: Principales Características de los Iniciadores.

Nombre	Secuencia	Descripción	Producto
p23SrV-f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	23SrDNAplastid	400 - 450 pb
p23SrV-r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG		
ITS1-DiatomF	GGAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	28SrDNA	1021-1084 pb
ITS1-DiatomR	CTNGTTAGTTTCTTTTCCTCCG		

Tabla II. Condiciones de Amplificación empleadas para cada juego de Primers.

	p23SrV-f1 / p23SrV-r1	ITS1-DiatomF / ITS1-DiatomR
Desnaturalización	94°C - 4 min	94°C - 4 min
Número de ciclos	35	35
Desnaturalización	94°C - 45 s	94°C - 45 s
Hibridación	55°C - 1 min	58°C - 1 min
Polimerización	72°C - 1 min	72°C - 2 min
Polimerización Final	72°C - 10 min	72°C - 10 min
Conservación	04°C - indefinido	04°C - indefinido

Tabla III. Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos de 10 mL – 1000 mL.

MEDIO GUILLARD F/2 10 mL a 1000 mL			
Solución 1		Solución 3	
NaNO ₃	75 g	FeCl ₃ .6H ₂ O	3.2 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 g	Na ₂ EDTA	4.4 g
Volumen: 1000 mL		Sol. Metales traza	1 mL
Solución 2		Volumen: 1000 mL	
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30 g	Sol. Metales traza	
Volumen: 1000 mL		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.49 g
Solución 4		ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.1 g
Solución Primaria		ZnCl	0.53 g
Tiamina B1	2 g	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.5 g
Cyanocobalamina	0.01 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	9.0 g
Biotina	0.01 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.32 g
Volumen: 100 mL		Volumen: 50 mL	
Solución stock : 5 mL de solución primaria en 1000 mL		Solución metales traza. Preparar individualmente.	
Soluciones 1 - 2 y 3: Disolver en agua destilada y esterilizar en autoclave Solución 4: Disolver en agua destilada estéril. No esterilizar en autoclave			
Nutrientes grado análisis		Dosificación: 1 mL por litro	

Tabla IV. Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos de 10 L – 100 L

MEDIO GUILLARD F/2			
10 L - 100 L			
Solución 1		Solución 3	
NaNO ₃	150 g	Secuestrene	5 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	10 g		
Volumen: 1000 mL		Sol. Metales traza	1 mL
Solución 2		Volumen: 1000 mL	
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	40 g	Sol. Metales traza	
Volumen: 1000 mL		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.49 g
Solución 4		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.1 g
Solución Primaria		ZnCl	0.53 g
Tiamina B1	2 g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 g
Cyanocobalamina	0.01 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.0 g
Biotina	0.01 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.32 g
Volumen: 100 mL		Volumen: 50 mL	
Solución stock : 5 mL de solución primaria en 1000 mL		Solución metales traza. Preparar individualmente.	
Soluciones 1 - 2 y 3: Disolver en agua destilada caliente y esterilizar en autoclave			
Solución 4: Disolver en agua destilada estéril. No esterilizar en autoclave			
Nutrientes grado técnico		Dosificación: Sol 1 - 2 y 3: 1 mL por litro Sol 4: 0.5 mL por litro	

Tabla V. Composición del Medio Guillard F/2 empleado para la Producción de Cultivos Masivos - 1 Tonelada.

MEDIO GUILLARD F/2			
1 Tonelada			
Solución 1		Solución 3	
NaNO ₃	300 g	Secuestrene	5 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	20 g	Volumen: 1000 mL	
Volumen: 1000 mL		Disolver en agua destilada estéril.	
Solución 2			
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	90 g		
Volumen: 1000 mL			
Nutrientes grado técnico		Dosificación: 50 mL por tonelada	

Tabla VI. Volúmenes Utilizados en el Aumento Progresivo de los Cultivos.

Volumen del Inóculo	Volumen del Medio de Cultivo	Volumen Total
1 mL	9 mL	10 mL
10 mL	90 mL	100 mL
100 mL	900 mL	1 Litro
1 Litro	9 Litros	10 Litros
10 Litros	90 Litros	100 Litros
100 Litros	900 Litros	1 Tonelada

Tabla VII. Parámetros considerados para la Evaluación de la Colonización de las Fibras de Geotextil por Microscopia Confocal (LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy).

Microorganismo	Fluorocromo	Longitud de onda (nm)	
		Excitación	Emisión
Bacterias	Bromuro de Etidio	545	605
Microalgas	-----	633	670 - 680

Tabla VIII. Evaluación del Valor Nutricional de las Cepas de Microalgas: Manejo de la Alimentación.

TRATAMIENTOS	ALIMENTACIÓN	
	Alimento Balanceado	Microalgas Sustrato - Concentración
Control sin sustrato	25 % Biomasa	---
Control: <i>Bacillus sp</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 1.0 x 10 ⁴ ufc / cm ²
<i>Amphora salina</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 1.6 x 10 ⁶ células / cm ²
<i>Amphora sp</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 2.5 x 10 ⁶ células / cm ²
<i>Nitzschia sp.</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 2.1 x 10 ⁶ células / cm ²
<i>Navícula veneta</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 9.5 x 10 ⁵ células / cm ²
<i>Amphiprora sp</i>	25 % Biomasa	100 cm ² : 9.0 x 10 ⁵ células / cm ²

Tabla IX. Cepas Aisladas: Origen. Condiciones Iniciales (T °C – ‰) y Método de Aislamiento

CEPA	Origen	Temperatura °C	Salinidad ‰	Método de aislamiento
D 1	Semiintensivo 19	25	30	Diluciones / S. agar
D 2	Intensivo 15 A	32	32	Diluciones / S. agar
D 5	Semiintensivo 19	27	30	Diluciones / S. agar
D 7	Semiintensivo 20	25	25	Micropipeta / S. agar
D 10	Intensivo 17 D	31	30	Diluciones / S. agar
D 12	Semiintensivo 19	25	30	Diluciones / S. agar

Tabla X. Conservación de Cepas Aisladas: Conservación a 4 °C y Criopreservación o Criopreservación a -196 °C

CEPA	Conservación 4 °C	Tiempo óptimo	Criopreservación - 196 °C
Diatomea 1	Medio Líquido	2 meses	√
	Agar	2 meses	
Diatomea 2	Medio Líquido	2 meses	√
	Agar	2 meses	
Diatomea 5	Medio Líquido	2 meses	x
	Agar	6 meses	
Diatomea 7	Medio Líquido	1 mes	x
	Agar	1 mes	
Diatomea 10	Medio Líquido	2 meses	x
	Agar	2 meses	
Diatomea 12	Medio Líquido	2 meses	x
	Agar	3 meses	

Tabla XI. Taxonomía Molecular: Secuencias obtenidas de los productos amplificados (amplicones) con el juego de primers p23SrV-f1/r1 de las cepas D2. D7. D10. D12. Zona sombreada corresponde a la región analizada en el banco de genes.

CEPA	p23SrV-f1	p23SrV-r1
Diatomea 2	NNNCCACGTATGAATGATTGGACTTTCTTGCGC ANATAGGTGGGAGGTGTTGAAAATATCTTGC GGGAATATCGGAGCCATCAGTGAGATACCACT CCTGTAATGTTAGATTTCTAACTTTGTATCATT TCTGGTCAAAGAACAGTTTCAGGCGGGCAGTT GACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAATGGTAACGG AGGCGCACAAAGGTTTCTCTGAACGGGTAGA AATCGTATCTAGAGTGTAAGGCATAAGGAAG CTTGACTGTGAGACTTACAAGTCGAGCAGGGA CGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTGCTGA GTGGAAGGCCGCTCACTCAACGGATAAAAAGTT ACTTAGGAAAACAGGCTGAAAANNNNNNNN NA	NNNGGCTATTTGGGAGGCCTTCACTCGCACC GTCAGATCACTAAGACCGACTTCGTCCCTGCT CGACTTGAAGTCTCACAGTCAAGCTTCCTTAT GCCTTACACTCTAGATACGATTCTACCCGTT CAGAGGAAACCTTTGTGCGCTCCGTTACCATT TGGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCCGC CTGAAACTGTCTTTGACCAGATAATGATACAA AGTTAGAAATCTAACATTACAGGAGTGGTATCT CACTGATGGCTCCGATATCCCGCAAGAATATT TTCAACACCTCCCACCTATACTGCGCAAGTAAA GTCCAATTTCAATCTCAAGTTACAGTAAAGCTT CATAGGCTNNTTCTGTCCANANNNNNNNNN NN
Diatomea 7	NNNNTTTCGTATGATGAATGGACTTATTGCGC ANATAGGTGGGAGGCGTTGAGTTAATCTTGC GGAATTTAGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCT GGTAATGTTAGATTTCTAACTTTGTATCATAAT CTGGTCAAGGAACAGTTTCAGGCGGGCAGTT GACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAACGGTAACGG AGGCGTACAAGGTTTCTCTGAACGTGTAGA AATCGTATCTAGAGTATAAGGCATAAGGAAG CTTGACTGTGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGA CGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTACTGA GTGGAAGGCCGCTCACTCAACGGATAAAAAGTT ACTTAGGAAAAAGGCTTGAACNNNNNNNN NNNNNN	NNNGGCTATGTAGAGGCTTCTCANACCGT CAGATCACTAAGACCGACTTCGTCCCTGCTCG ACTTGTAGGTCTCACAGTCAAGCTTCCTTATCG CTTTATACTCTAGATACGATTCTACACGTTCA GAGGAAACCTTTGTACGCTCCGTTACCGTTTG GGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCCGCT GAAACTGTTCTTGACCAGATTATGATACAAAG TTAGAAATCTAACATTACCAGAGTGGTATCTCA CTGATGGCTCTAAATTCGCGCAAGAATTAAC CAACGCTCCCACCTATACTGCGCAAAATAAGT CCAATTTCAATTTCAAGTTACAGTAAAGCTTCA TAGGGTCTTCTGTCCAAANNNNNNNNNNN
Diatomea 10	NNNCCTCCGTATGATGAA TGGACTTACTTGCGC ANATAGGTGGGAGGCGTTGAGTTAATCTTGC GGAATTTAGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCT GGTAATGTTAGATTTCTAACTTTGAATCATAAT CTGGTCAAAGAACAGTTTCAGGCGGGCAGTT GACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAAGGTAACGG AGGCGTACAAGGTTTCTCTGAACGTGTAGA AATCGTATCTAGAGTGTAAGGCATAAGGAAG CTTGACTGTGAGACTTACAAGTCGAGCAGGGA CGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTGCTGA GTGGAAGGCCGCTCACTCAACGGATAAAAAGTT ACTTAGGGTAACAAGGCTGAAAANNNNNNN A	NNNCCGCTATTTGAGAGGCCTTCACTCGCAGC TCAGATCACTAAGACCGACTTCGTCCCTGCTC GACTTGTAGTCTCACAGTCAAGCTTCCTTATG CCTTACACTCTAGATACGATTCTACACGTTT AGAGGAAACCTTTGTACGCTCCGTTACCTTT GGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCCGC TGAAACTGTTCTTGACCAGATTATGATTCAA GTTAGAAATCTAACATTACCAGAGTGGTATCTC ACTGATGGCTCTAAATTCGCGCAAGAATAAAC TCAACGCTCCCACCTATACTGCGCAAGTAAAG TCCAATTTCAATTTCAAGTTACAGTAAAGCTTC ATAGGGCTTTTCTGTCCANANNNNNNNNN
Diatomea 12	NNNNTTCCGTATGATGAA TGGACTTTTTGCGC GCATAGGTGGGAGGCAATTGAAGATATCTTGC GGGAAAATTGGAGCCATCAGTGAGATACCACT CTTGAATGTTAGATTTCTAACTTTGTATCATT TCTGGTCAAAGGACAGTTTCAGGCGGGCAGTT GACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAACGGTAACGG AGGCGCACAAAGGTTTCTCTGAACGGGTAGA AATCGTATCTAGAGTGTAAGGCATAAGGAAG CTTGACTGTGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGA CGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTGCTGA GTGGAAGGCCGCTCACTCAACGGATAAAAAGTT ACTTAGGTAACNAAAGCCTGAAAAANNNNN NNNN	NNNAACCTTCTGAGAGGCCTTCACTCGCACC GTCAGATCACTAAGACCGACTTCGTCCCTGCT CGACTTGTAGGTCTCACAGTCAAGCTTCCTTAT GCCTTACACTCTAGATACGATTCTACCCGTT CAGAGGAAACCTTTGTGCGCTCCGTTACCATT TGGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCCGC CTGAAACTGTCTTTGACCAGATAATGATACAA AGTTAGAAATCTAACATTACAAGTGGTATCT CACTGATGGCTCCAATTTCCCGCAAGAATATC TTCAATGCCTCCCACCTATGCTGCGCAAAATA GTCCAATTTCAATTTCAAGTTACAGTAAAGCTT CATAGGCTTTTCTGTCCAAAAANNNNT

Tabla XII. Taxonomía Molecular: Secuencias obtenidas de los productos amplificados (amplicones) con el juego de primer ITS1-DiatomF/R de las cepas D1 y D5 (D2 y D12 no se obtuvieron amplicones). Zona sombreada corresponde a la región analizada en el banco de genes.

CEPA	ITS1-DiatomF	ITS1-DiatomR
Diatomea 1	<p>NNNNNCCTAGGACTGCGGAGATCATACCCACC AGATCCAAGATCTGTTTTTACACGTTGAACCCGG GAAGTGTAGGTGGCCTTGTGAAGCCACTGAGG ACAGCAAAGGGAGAGACTTTTGTGTTTCAA TGGGGTTGCTGGCTAGACTCCCCAACCCCTC TTTTTACACCATCACTCGATTGACGGTGCCTTC TCTTGAAGGTTGCCCGTGAACGAAACCAAG CTTTGCCCTGCACTGCCGAAGGCCTGTAGAG CAAGGTGCTACTCCATAAAAGGATGTATCAA CAACTCCAGCAATGGATGTCTAGGTTCCCA ACGATGAAAAACGCACCGAAATCGGATACGTA ATGGGAATTGCAAGATCTCGTGAATCACTAAA ATTTGAACGCACATTGCGCTCCCTGGATCTTT CCAGGGAGCATGCTTGTCTGAGAGTACAGAA TCTCACTCGGGGCTTGTACTTGGGTAACACCAAG TGTGGCAGACGGAATCTGTGCCTGGGAGGTTT TTGGCTCCCTTGAACAAAATCAAGTCAGCAA ACCTGTGCTGCTTGGCAGCTTGTCAAGTTTT TCTTCTCCCTTGGGAACAAGAGGATGGACT GTGTATGCCGTGGGATGTTGTCTCTCGCT GAAAAGCCCTCGTCTTTGCAAATGGTGAAGC CAGGACAAAACTGGGGTGGCGTGGAGATAAT CCCTTGTAGGTGCGATGCAACTGTCCCTGTTT TCACGAGATTGTAAGAACCAAGCCTGCTGAA GGTCTGTTGGATGGTGAATTAATCTCCATCCT CCGAACACACTTCTGATATCAGTCAAGCAA GGAGACCCGCTGAATTAAGCATATAATTAAGC GGAGAAAGAACTCTCCCGGAAAAAAAAGGA ANNNNA</p>	<p>NNGGCCAAAANNNNAGCTGTTATTGCGGGTC TCTTGCTGAGCTGAGATCAGGAAGGGTGGTTCCG GAGGATGGAGATAAATGCACCATCCAAACGAC GCTTCAGCAGGCTTGGTTCTTCCAATCTCGTG AAAACAGGGGACAGTTGCATCGCACCTACAAG GGATTATCTCCACGCCACCCAGTCTTGTCTCC GGCTTGACCAATTTGCAAAAGCAGGGGCTTTT CAGCGGAGGACACAACTCCACGGCATGAC ACAGTCCATCCTCTTGTCCAGAGGGAGAGAA GAAAACTGACAAGCTCCGACAGCCAGCAGCAG GGTTTGTGACTTGTGTTTCAAGGGGAGGC CAAAAACCAACCCAGGAACAGATTCCGGCTGC CACACTTGGTGTACCAAGTCAAGCACCGAGT GAGATCACTGACACTCAGACAAGCATGCTCC TGGAAAGATCCAGGGAGCGCAATGTGCGTTCA AAATTTAATGATTCACGAGATCTTGCAATTCG CATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCG TTGTGGAAACCTAGACATCCATTGCTGAAGGTT GTTTGATACATCCTTTATGGAGTAGCACCTTG CTCTACAGGCCCTCCGCGCATGCAAGGCAAGA GCTTGGTTTCAGTTACACAGGCACTTCCAAAG AGAAGGCACCGTCAATCGAGTGATGGTGTAAA AAAGAGGAGGTTGGGGAGTCTAGCCAAGCAAC ACCATCTGAAAACAACAAAAGTCTCTCCCTGTG CTGTCTCAGTGGCTTACAAGGACACCTACAC TCCTCGGTTACGTTGAAAAGACAGATCTCGGA TCTGGTGTGGTAATGATCCTTCCGACGTTTAC CTACGGAAACATGTACCATTNCCCTTCTCCA ACCANNNNNNT</p>
Diatomea 2	No se obtuvo amplificación	No se obtuvo amplificación
Diatomea 5	<p>NNNGCTAGGACTGCGGAGATCATACACACC AGATCCAAGATCTGTTTACACGTTGAACCCGGG GAGTGTAGGTGGCCTTGTGAAGCCACTGAGGA CAGCAGAGGGAGAGACCTTTGTGTTTTCAGTT GGTGTGCTTGGCTAGACTCCCCAACCCCTC TTTTTACACCATCACTCAATTGACGGTGCCTTCT CATGAAAGGTAGCCGTGTAACATAAAACCAAG TTCTTGCCTGAACGCCGAAAGGCCTGTGAAG CAAGGTGCTACTCCATAAAAGGATGTATCAAA CAACTTCAGCAATGAATGTCTAGGTTCCCA ACAATAAAAAACGCACCAAAATGCAATACGTA ATGCAAAATGCAAAATCTCGGAATCATTA ATTTAAACGCACATTGCGCTCCCTGAATCTTT CCAGGAAGCATGCTTGTCTAAGTGTCAATTAAT CTCGCTCGGGCTAAACTTGGGAACACCAAG TGTGGAACCCGAAATCTGTTTTGGGTTGGTAT TTGGCTCCCTTAAACCAAAATCAAGTCAGCAA ACGCTGTGGCTGCTTGAAGCTTGTCAAGTTTT TTCTTCTCCCTTTGGAAACAAAAGAAATGAAC TGCGTCATGCCGGGAATGTTGTCTCCTCCCG TGAAAAGCCCTTCTTTTGAATAATGGTGAAG CCAGGACAAAACTGGGGTGGCGTGAATAATA TCCCTTGTAGGTGAATGCAACTGTCCCTGTT TTCATGAGATTGAAAAGATCAAGCCTGCTGA AGCGTCTTTGGATGGTGAATTAATCCCATCC TCCGAACCCCTTCTGATCTCAGTCAAGCA AGGAACCCGCTGAATTAACCATATAATTA GCGGAGGAAAAAACTAACCAAGANT</p>	<p>NNNNAACATGCTAATTGCGGGTCCCTTGTGTA CTGAGATCAGGAAGGGTGGTTCCGAGGATGGG AATAATGACCATCCAAACGACGTTTACAGCA GGCTTGGATCTTCCAATCTCATGAAAACAGGG GACAGTTGCATCGCACCTACCAGGGATTAATCTC CAGCCACCCAGTCTTCTGCTGGCTTGCAC ATTTGCAAAAGACGAGGGCTTCCAGCGGAG GACACAACATCCCACGGCATGACGCAATCCAT CCTCTTGTCCCAAAGGGAGAGAAGAAAAAAC TGACAAGCTCGCAAGCAGCCAGCAACGTTTGC TGACTTGATTTGGTTCAAGGGGAGGCCAAATAC CAACCCAAAAACAGATTCCGGCTGCCACACT GGTGTCCCAAAGTCTAGCACCGAGCGAGATT ACTGACACTCAGACAAGCATGCTCCCTGGAAA GATCCAGGGAGCGCAATGTGCGTTCAAAATTTT AATGATTCACGAGATCTTGAATTCGCAATTACG TATCGCATTTGCTGCGTTCTTATCGGTGTGG GAACCTAAACATCCATTGCTGAAGGGTGTTGA TACCTCTTTATGGAATAACACCTTGTCTCCAC AGGCCTCCGGGCGTGCAGGGCAAGAACTGG TTTCAGTTACACAGGCTACCTTCCATGAAAAGG CACCTCAATCGAGTATGGTGTAAAAAAGAG GGGGTTGGGGAGTCTAGCCAAGCAACACCAA CTGAAAACAACAAAGGTTCTCTCCCTGCTGTC CTCAGTGGCTTACAAGGCACTACACTCCCC GGTTACGTTGTAAGAACAGATCTTGGATCTGGT GTGGTAATGATCCTCCGACGGTTACCTACGG AAACCTGTACGACTTCCCTTCCACCCCN NNNNN</p>
Diatomea 12	No se obtuvo amplificación	No se obtuvo amplificación

Tabla XIII. Identificación de las cepas: Taxonomía Clásica y Taxonomía Molecular.

Cepa	Taxonomía Clásica	Taxonomía Molecular	
		p23SrV-f1/ r1	ITS1-DiatomF/R
D 1	<i>Amphora sp. 1</i>	---	<i>Amphora salina</i> 96 %
D 2	<i>Amphora sp. 2</i>	Uncultured organism clone 96 % Reportado en : Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community	---
D 5	<i>Navícula sp. 1</i>	---	<i>Sellaphora sp</i> 92 %
D 7	<i>Nitzschia sp. 1</i>	<i>Nitzschia sp</i> 95 %	---
D 10	<i>Navícula sp. 2</i>	<i>Navicula veneta</i> 96%	---
D 12	<i>Amphiprora sp.</i>	Uncultured organism clone 97 % Reportado en : Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community	---

Tabla XIV. Ecuaciones de regresión lineal: x = densidad óptica. y = Densidad o concentración celular (número de células / mL).

CEPA	FILTRO (nm)	Ecuación de Regresión Lineal	Coefficiente de Correlación r ²
<i>Amphora salina</i>	405	$y = 6000000x + 38302$	0.99
<i>Amphora sp.</i>	450	$y = 9000000x - 1893.6$	0.98
<i>Sellaphora sp</i>	---	---	---
<i>Nitzschia sp.</i>	405	$y = 20000000x - 24574$	0.99
<i>Navícula veneta</i>	405	$y = 3000000x - 20682$	0.99
<i>Amphiprora sp</i>	405	$y = 996658x + 3365.5$	0.99

Tabla XV. Dinámica de Crecimiento de *Amphora salina* en diferentes volúmenes

Dinámica de Crecimiento <i>Amphora salina</i> células/mL					
Días	100 mL	1 L	10 L	100 L	1 T
1	100000	100000	100000	100000	100000
2	152302	260302	248302	242302	212302
3	350302	518302	476302	398302	452302
4	650302	974302	722302	686302	650302
5	602302	902302	614302	602302	524302
6	452302	764302	344302	410302	410302
7	308302	422302	212302	320302	308302
8	248302	314302	128302	200302	152302

Tabla XVI. Dinámica de Crecimiento de *Amphora sp* en diferentes volúmenes.

Dinámica de Crecimiento <i>Amphora sp</i> células/mL					
Días	100 mL	1 L	10 L	100 L	1 T
1	100000	100000	100000	100000	100000
2	187106	232106	196106	196106	151106
3	376106	583106	448106	403106	349106
4	655106	1150106	853106	754106	701106
5	583106	952106	484106	556106	403106
6	502106	628106	322106	421106	349106
7	322106	412106	178106	250106	250106
8	304106	268106	124106	151106	196106

Tabla XVII. Dinámica de Crecimiento de *Nitzschia sp* en diferentes volúmenes.

Dinámica de Crecimiento <i>Nitzschia sp</i> células/mL					
Días	100 mL	1 L	10 L	100 L	1 T
1	100000	100000	100000	100000	100000
2	255426	275426	355426	295426	255426
3	455426	475426	715426	655426	615426
4	755426	975426	1055426	935426	895426
5	755426	1235426	955426	815426	755426
6	655426	1015426	715426	655426	515426
7	535426	855426	535426	415426	375426
8	415426	655426	355426	295426	315426

Tabla XVIII. Dinámica de Crecimiento de *Navícula veneta* en diferentes volúmenes.

Dinámica de Crecimiento <i>Navícula veneta</i> células/mL					
Días	100 mL	1 L	10 L	100 L	1 T
1	100000	100000	100000	100000	100000
2	180318	219318	285318	255318	216318
3	255318	315318	375318	351318	345318
4	549318	681318	519318	501318	525318
5	624318	720318	699318	696318	654318
6	513318	537318	564318	456318	426318
7	351318	411318	354318	324318	315318
8	276318	315318	186318	210318	201318

Tabla XIX. Dinámica de Crecimiento de *Amphiprora sp.* en diferentes volúmenes.

Dinámica de Crecimiento <i>Amphiprora sp.</i> células/mL					
Días	100 mL	1 L	10 L	100 L	1 T
1	100000	100000	100000	100000	100000
2	149874	179774	120971	114991	124958
3	224624	234590	179774	194724	174791
4	375119	454852	244557	234590	234590
5	350202	400035	194724	219640	194724
6	295386	312329	122964	149874	165821
7	255520	275453	110008	124958	115988
8	214657	199707	90075	85091	90075

Tabla XX. Dinámica de Colonización de cada una de las Cepas de Microalgas en las Fibras de Geotextil durante 8 días.

Colonización del Geotextil células/cm ²					
Días	<i>A. salina</i>	<i>Amphora sp.</i>	<i>Nitzschia sp.</i>	<i>N. veneta</i>	<i>Amphiprora sp.</i>
1	750000	1200000	1125000	225000	150000
2	1125000	1800000	1875000	375000	262500
3	1575000	2625000	2250000	450000	375000
4	1650000	2775000	2100000	675000	525000
5	1612500	2550000	1950000	900000	825000
6	1500000	2325000	1800000	975000	900000
7	1425000	2250000	1725000	937500	750000

Tabla XXI. Porcentaje de Supervivencia, Peso Promedio y Biomasa obtenida al final de la experimentación.

TRATAMIENTOS	Población Cosechada	Supervivencia %	Peso Promedio g	Biomasa g
Control sin sustrato	38	76	0.112	4.256
	38	76	0.125	4.750
	42	84	0.089	3.738
Control: <i>Bacillus sp</i>	42	84	0.109	4.578
	38	76	0.134	5.092
	45	90	0.091	4.095
<i>Amphora salina</i>	45	90	0.140	6.300
	48	96	0.121	5.808
	41	82	0.123	5.043
<i>Amphora sp</i>	46	92	0.153	7.038
	49	98	0.125	6.125
	44	88	0.130	5.720
<i>Nitzschia sp.</i>	41	82	0.138	5.658
	38	76	0.120	4.560
	45	90	0.124	5.580
<i>Navícula veneta</i>	49	98	0.160	7.840
	45	90	0.145	6.525
	48	96	0.170	8.160
<i>Amphiprora sp</i>	49	98	0.135	6.615
	43	86	0.166	7.138
	48	96	0.154	7.392

Tabla XXII. Supervivencia: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.

SUPERVIVENCIA ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRUEBA DUNCAN			
ORDEN	TRATAMIENTOS	PROMEDIO (%)	RESULTADOS
VII	<i>Navícula veneta</i>	94.67	a
VI	<i>Amphiprora sp</i>	93.33	ab
V	<i>Amphora sp</i>	92.67	abc
IV	<i>Amphora salina</i>	89.33	abcd
III	Control: <i>Bacillus sp</i>	83.33	abcde
II	<i>Nitzschia sp.</i>	82.67	bcdef
I	Control: Sin sustrato	78.67	def

Tabla XXIII. Peso Promedio: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.

PESO ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRUEBA DUNCAN			
ORDEN	TRATAMIENTOS	PROMEDIO (g)	RESULTADOS
VII	<i>Navícula veneta</i>	0.16	a
VI	<i>Amphiprora sp</i>	0.15	ab
V	<i>Amphora sp</i>	0.14	abc
IV	<i>Amphora salina</i>	0.13	bcd
III	<i>Nitzschia sp.</i>	0.13	bcde
II	Control: <i>Bacillus sp</i>	0.11	cdef
I	Control: Sin sustrato	0.11	cdef

Tabla XXIV. Biomasa: Análisis Estadístico – Prueba Duncan.

BIOMASA ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRUEBA DUNCAN			
ORDEN	TRATAMIENTOS	PROMEDIO (g)	RESULTADOS
VII	<i>Navícula veneta</i>	7.51	a
VI	<i>Amphiprora sp</i>	7.05	ab
V	<i>Amphora sp</i>	6.29	bc
IV	<i>Amphora salina</i>	5.72	cd
III	<i>Nitzschia sp.</i>	5.27	cde
II	Control: <i>Bacillus sp</i>	4.59	ef
I	Control: Sin sustrato	4.25	ef

Tabla XXV. Registro de Parámetros Físico – Químicos (Temperatura. Salinidad. pH y Oxígeno Disuelto).

TRATAMIENTOS	T °C		S ‰		pH		O ₂ ppm	
Control sin sustrato	27.8	27.4	30.0	30.3	8.68	8.71	7.26	7.24
	27.4		30.0		8.74		7.30	
	27.0		31.0		8.70		7.16	
Control: <i>Bacillus sp</i>	27.1	27.2	32.0	30.7	8.50	8.66	7.43	7.17
	27.2		30.0		8.74		7.10	
	27.3		30.0		8.73		6.98	
<i>Amphora salina</i>	27.5	27.4	31.0	30.3	8.75	8.75	6.60	7.05
	27.3		30.0		8.79		7.25	
	27.3		30.0		8.71		7.29	
<i>Amphora sp</i>	27.0	27.2	30.0	30.7	8.73	8.76	7.36	7.15
	26.9		32.0		8.74		7.00	
	27.6		30.0		8.81		7.09	
<i>Nitzschia sp.</i>	27.8	27.2	31.0	31.0	8.75	8.79	7.11	7.11
	27.1		30.0		8.82		7.23	
	26.8		32.0		8.80		6.99	
<i>Navícula veneta</i>	27.2	27.2	30.0	30.3	8.80	8.82	7.14	7.24
	27.0		30.0		8.86		7.35	
	27.5		31.0		8.81		7.23	
<i>Amphiprora sp</i>	26.7	27.1	30.0	30.7	8.73	8.73	6.89	7.15
	27.1		31.0		8.77		7.34	
	27.4		31.0		8.70		7.22	

ANEXOS
GRÁFICOS

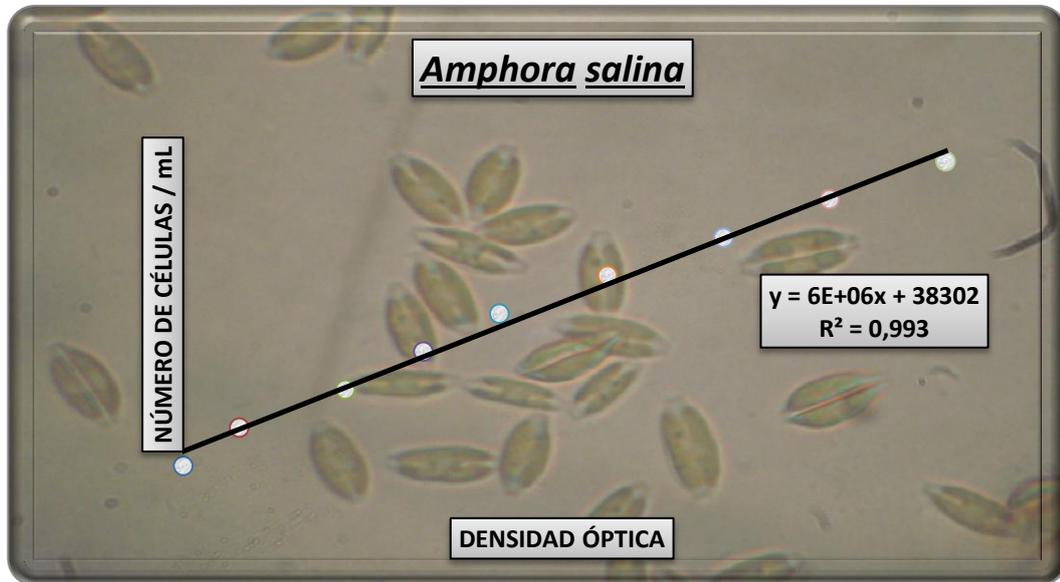


Gráfico 1. Curva de Regresión Lineal - *Amphora salina*

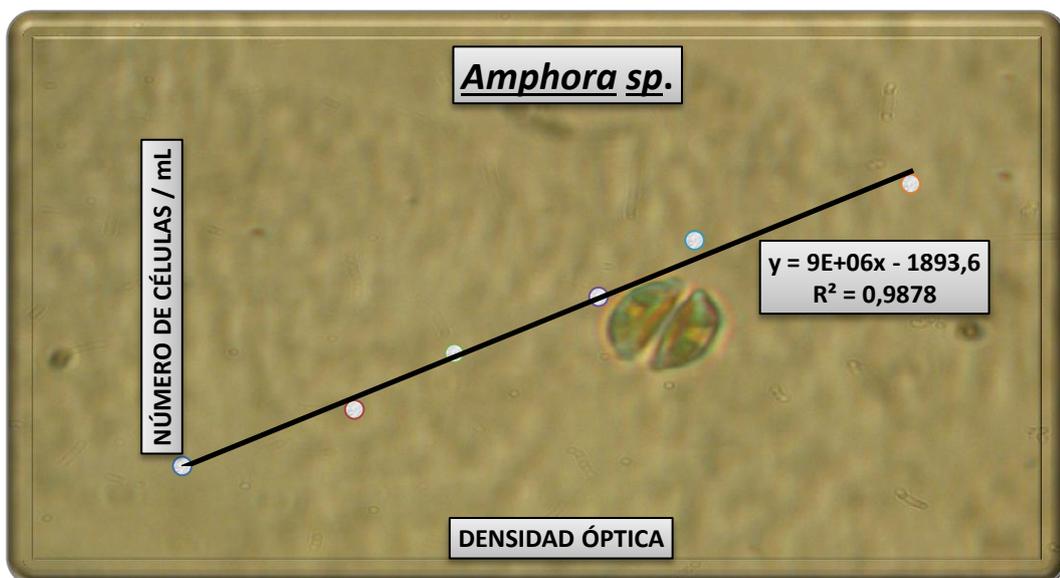


Gráfico 2. Curva de Regresión Lineal - *Amphora sp*

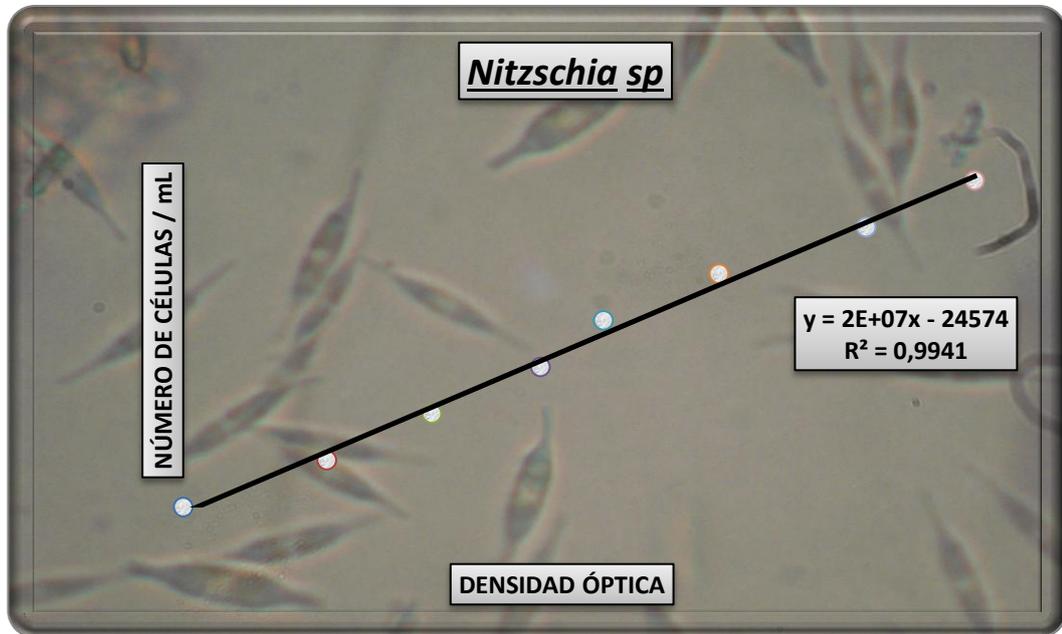


Gráfico 3. Curva de Regresión Lineal - *Nitzschia sp*

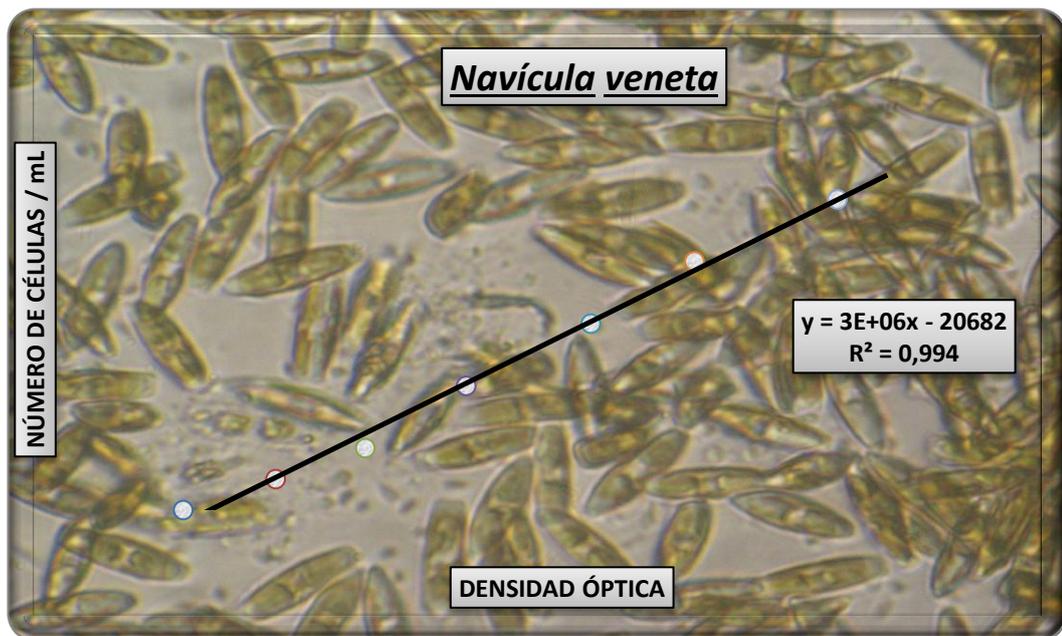


Gráfico 4. Curva de Regresión Lineal – *Navícula veneta*.

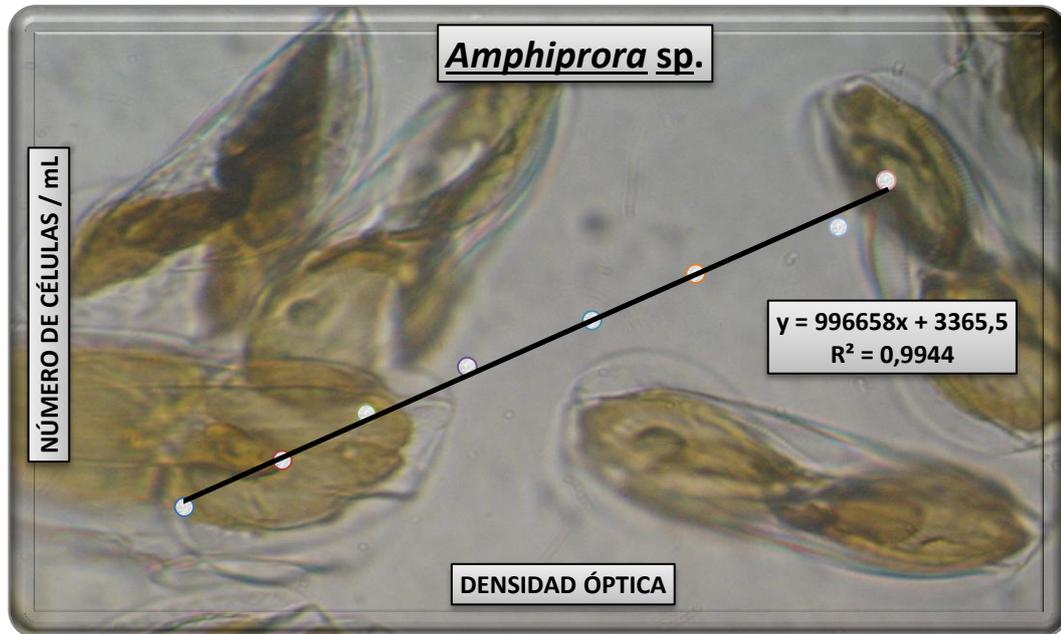


Gráfico 5. Curva de Regresión Lineal – *Amphiprora sp.*

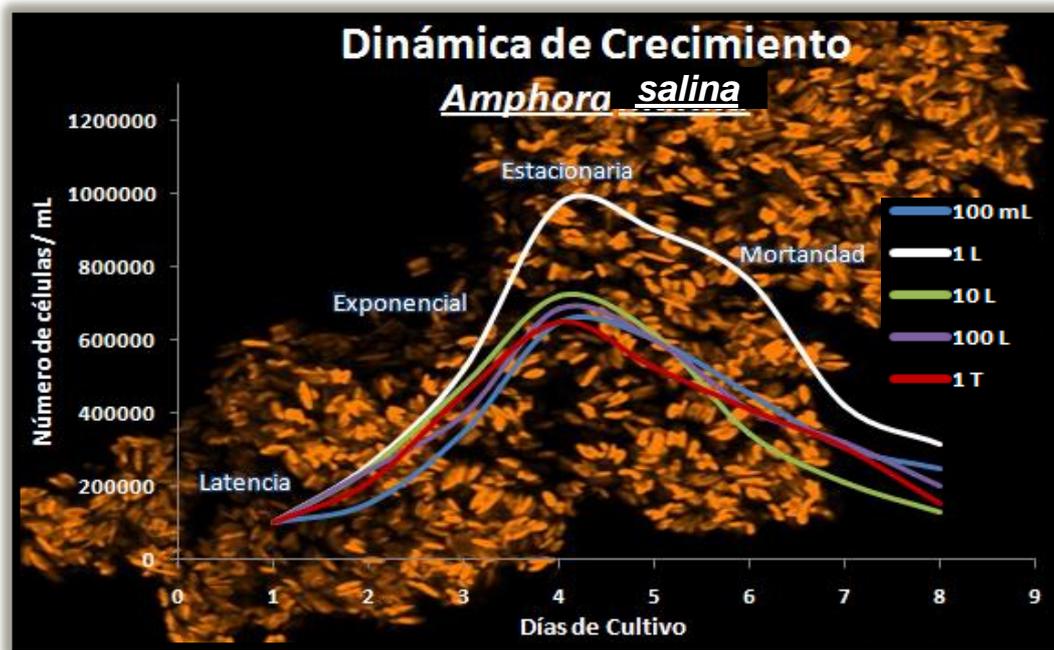


Gráfico 6. Dinámica de Crecimiento de *Amphora salina* durante 8 días de cultivo.

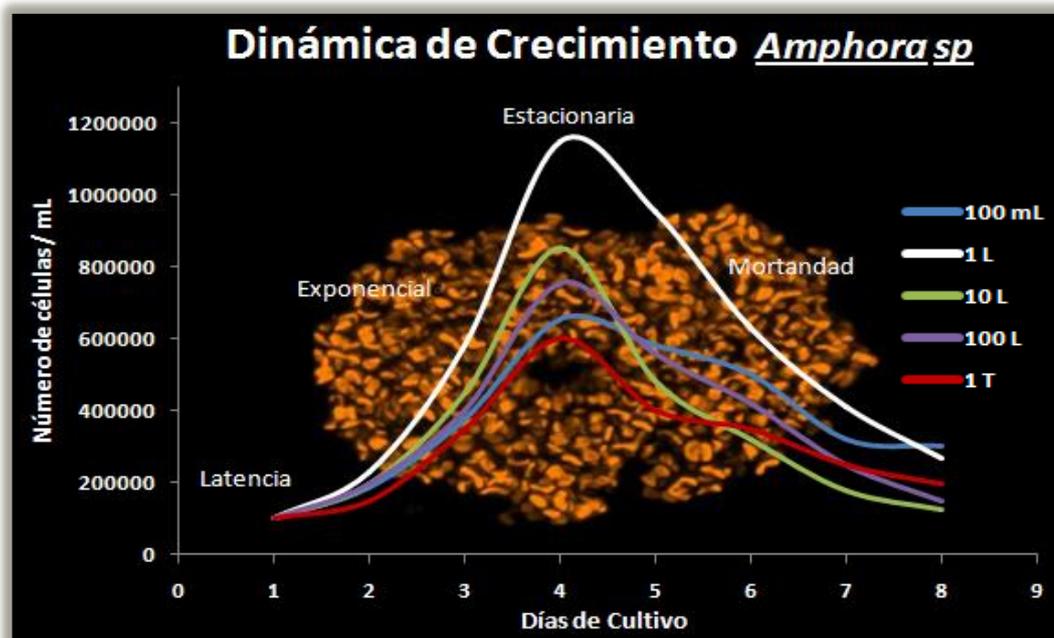


Gráfico 7. Dinámica de Crecimiento de *Amphora sp* durante 8 días de cultivo.

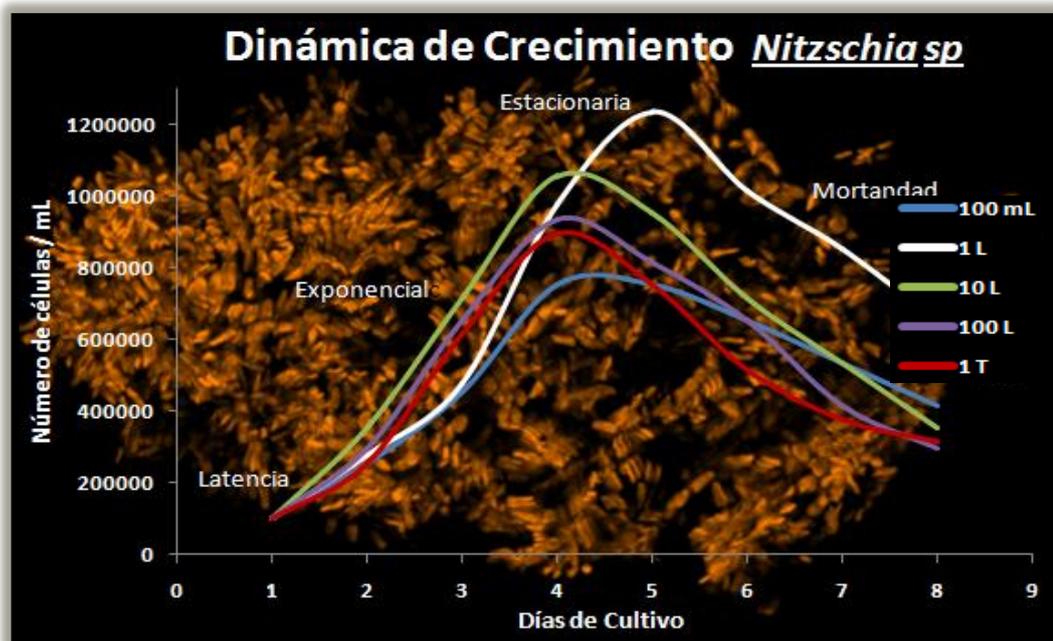


Gráfico 8. Dinámica de Crecimiento de *Nitzschia sp* durante 8 días de cultivo.

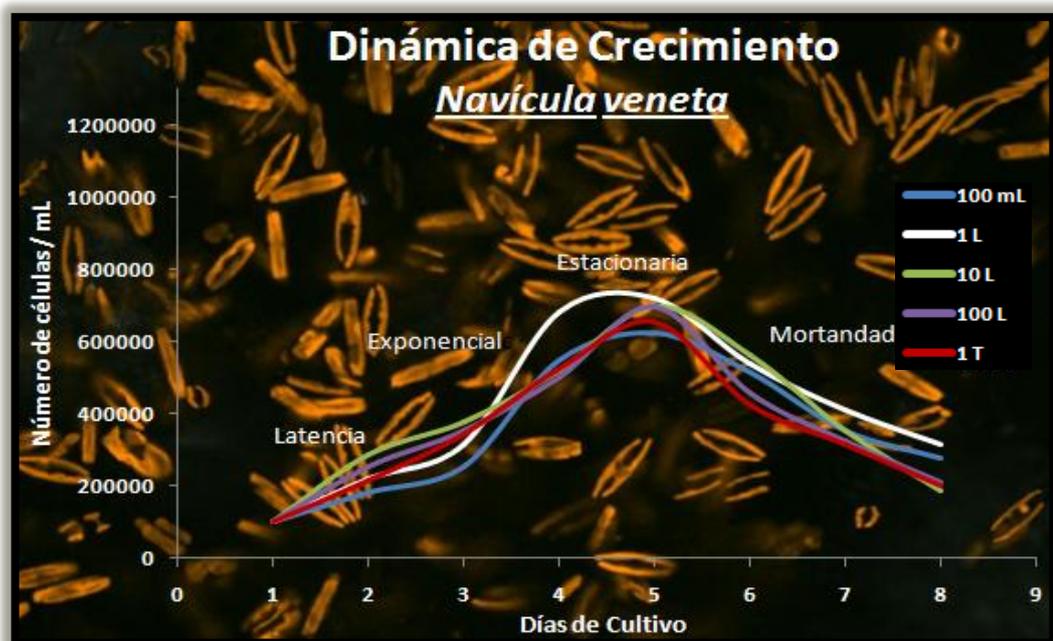


Gráfico 9. Dinámica de Crecimiento de *Navícula veneta* durante 8 días de cultivo.

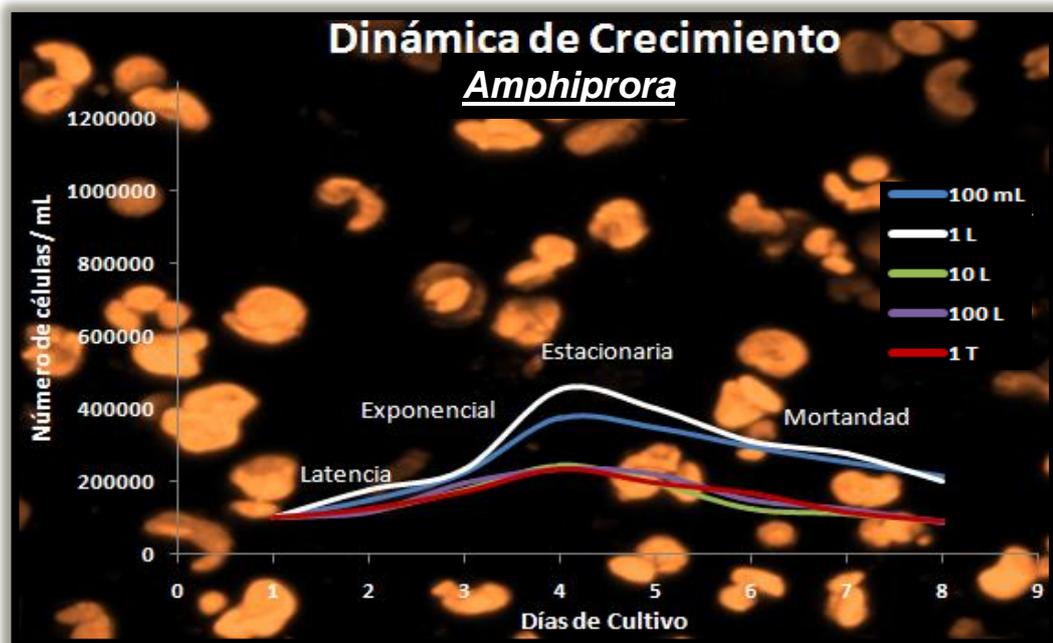


Gráfico 10. Dinámica de Crecimiento de *Amphiprora sp* durante 8 días de cultivo.

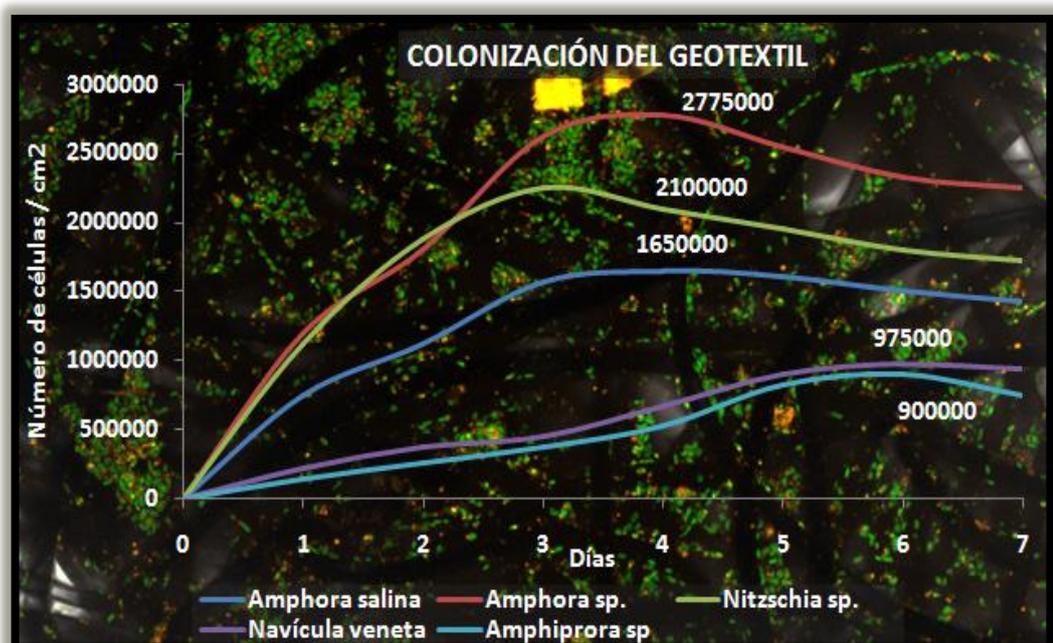


Gráfico 11. Dinámica de Colonización del Geotextil de las Cepas de Diatomeas.

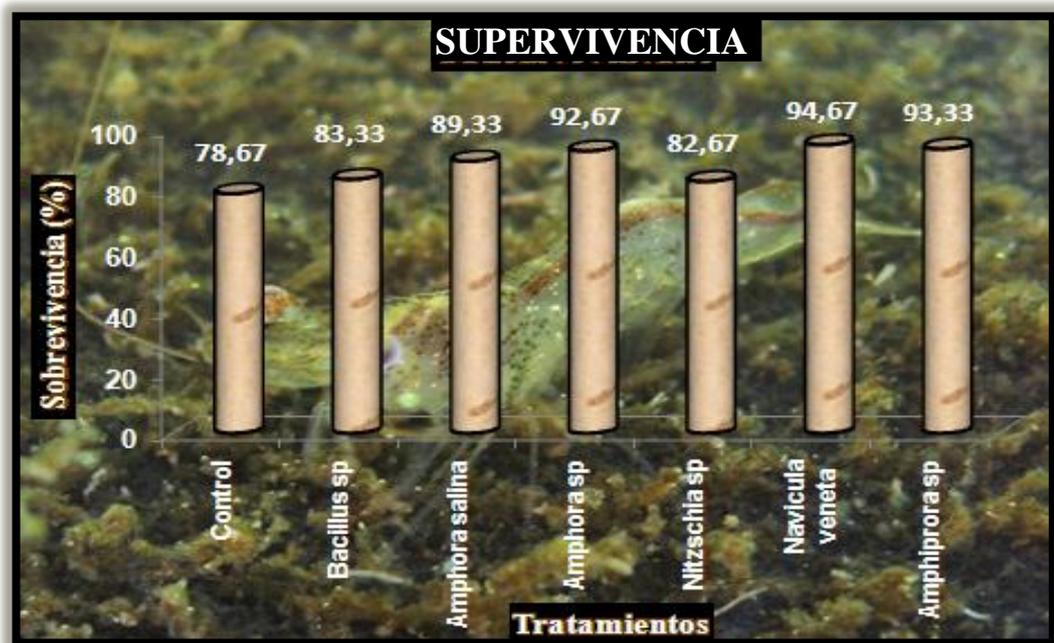


Gráfico 12. Supervivencia obtenida en cada tratamiento.



Gráfico 13. Peso promedio obtenido en cada tratamiento

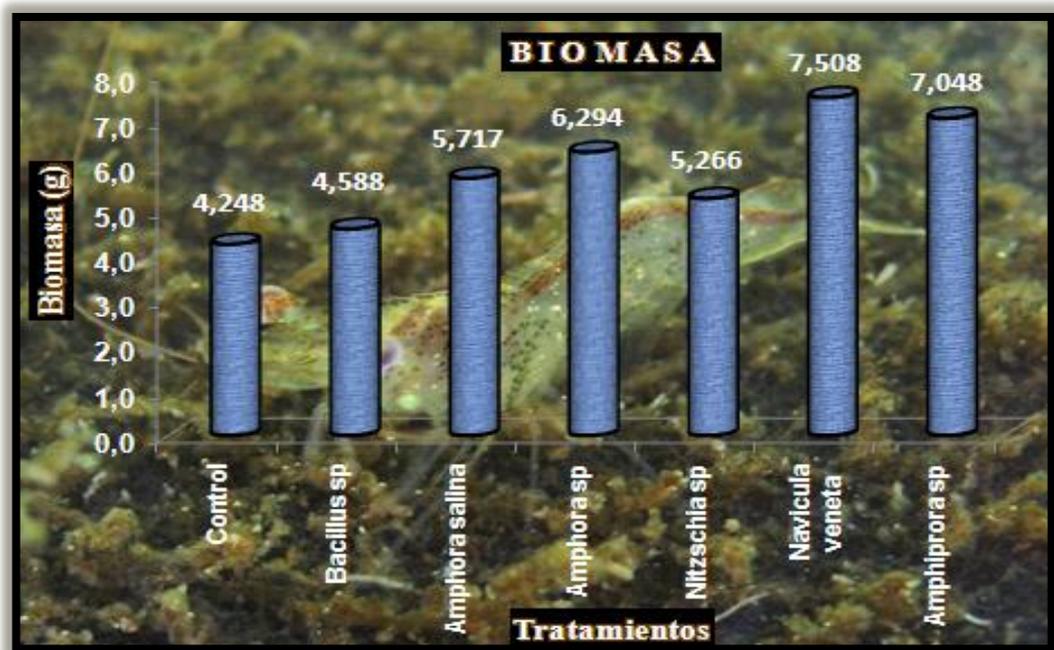


Gráfico 14. Biomasa obtenida en cada tratamiento.



Gráfico 15. Índice de Supervivencia, Peso y Biomasa obtenidos en cada tratamiento.

ANEXOS
FIGURAS

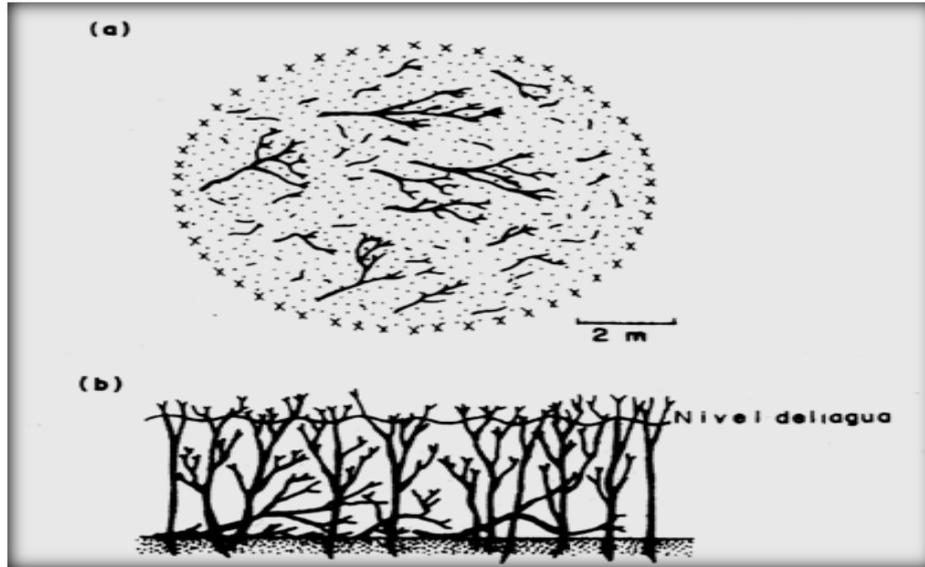


Fig. 1. Diagrama de una Pesquería de Parques de Ramas de Tipo Acadjas – Kathas – Samaraha: a) Vista superior b) Vista transversal.

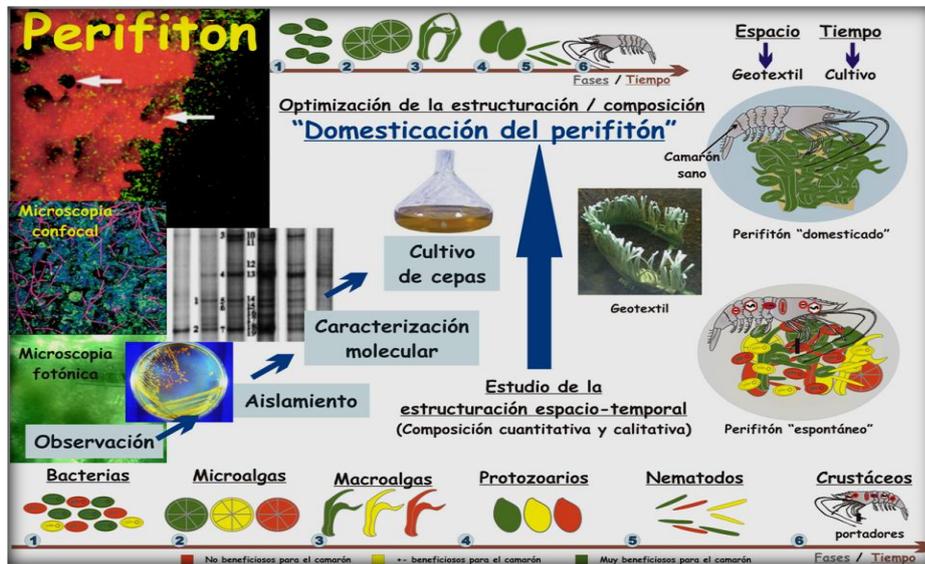


Fig. 2. Esquema del proceso de Domesticación del Perifiton.

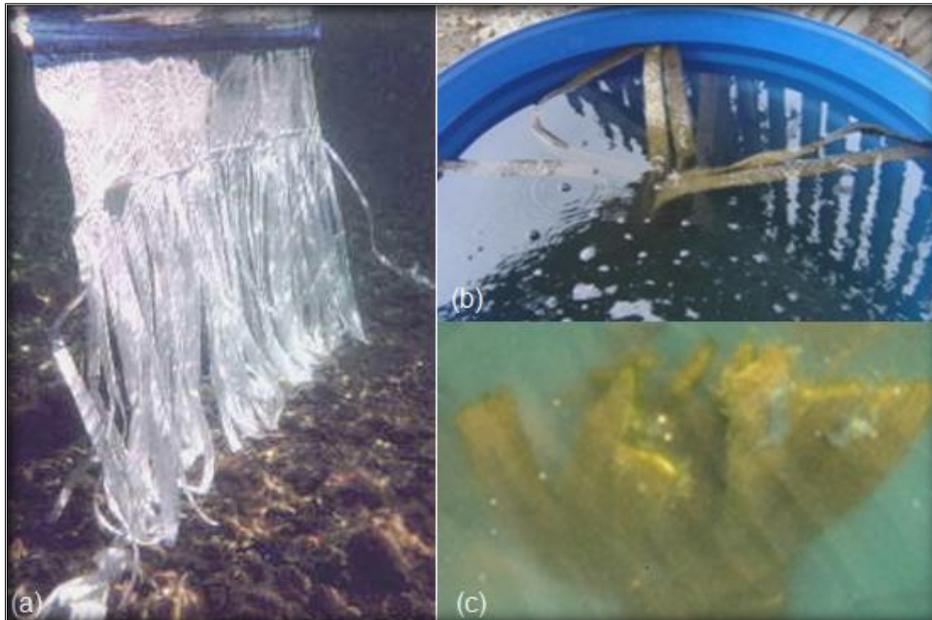


Fig. 3. Sustrato AquaMats®. a) Sustratos sin colonizar. b) y c) Sustratos colonizados

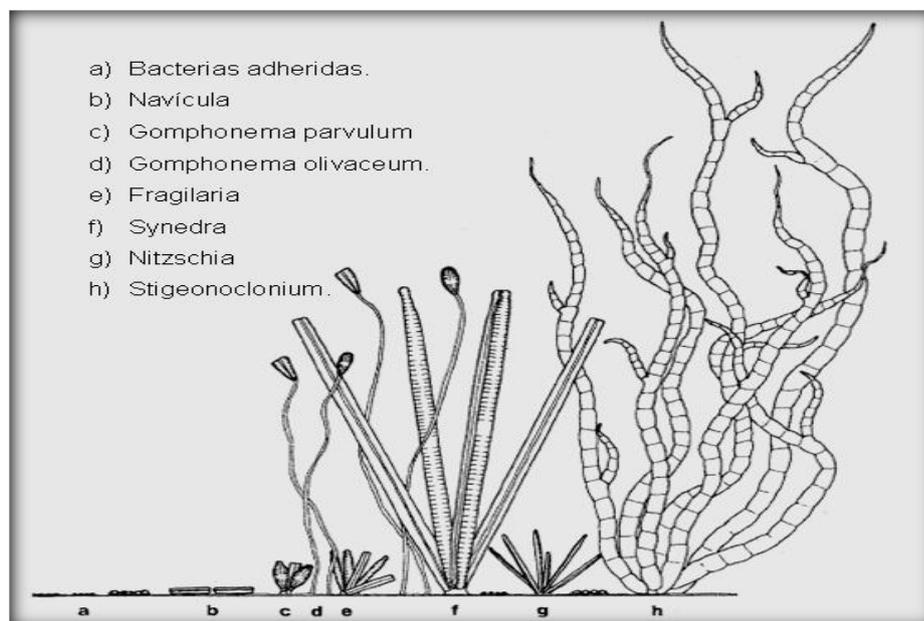


Fig. 4. Estructura vertical de la Comunidad Perifítica.

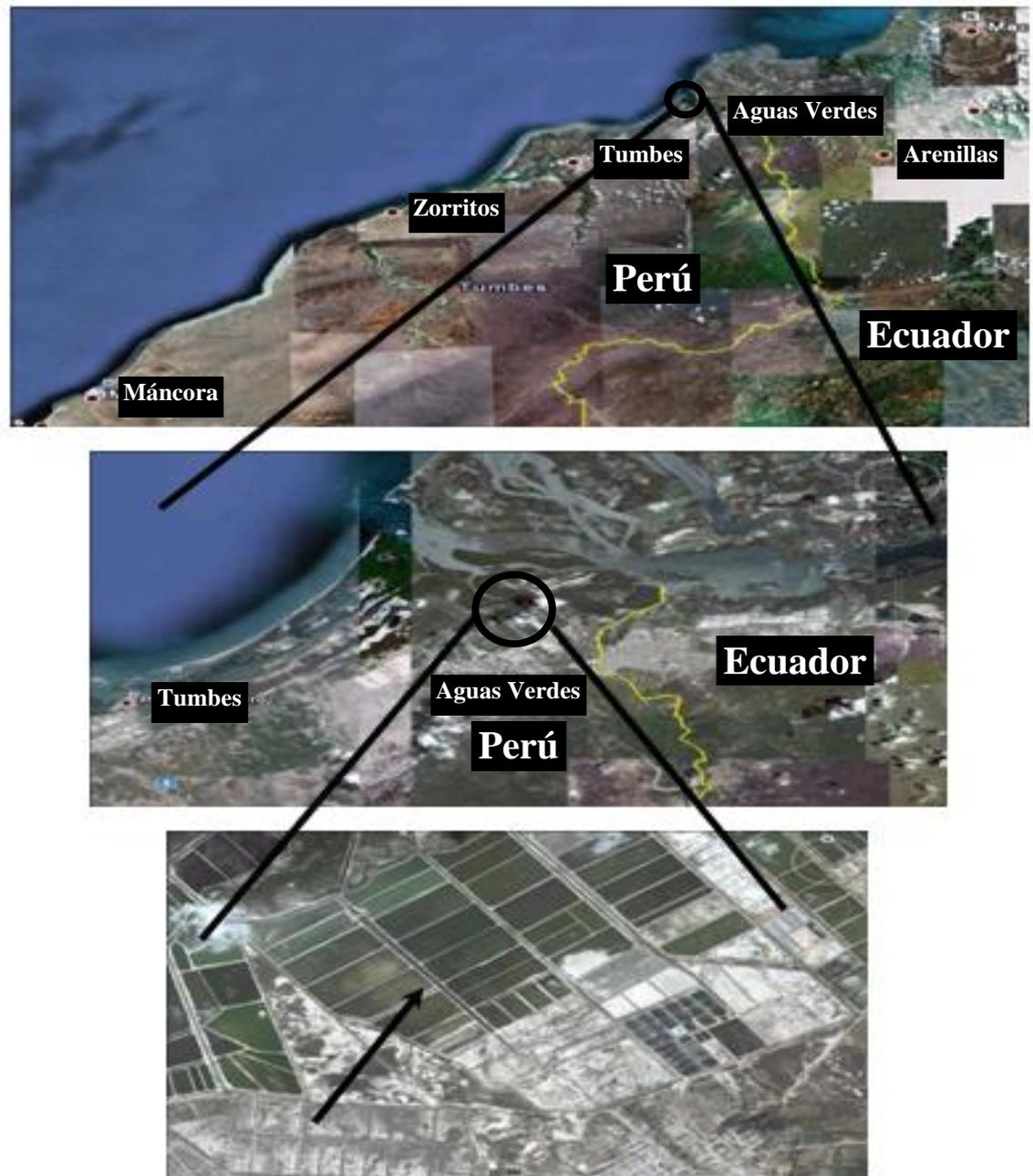


Fig. 5. Ubicación Geográfica de la Camaronera Marinazul S.A. campo Paracas. Distrito de Aguas Verdes de la provincia de Zarumilla del departamento Tumbes – Perú.

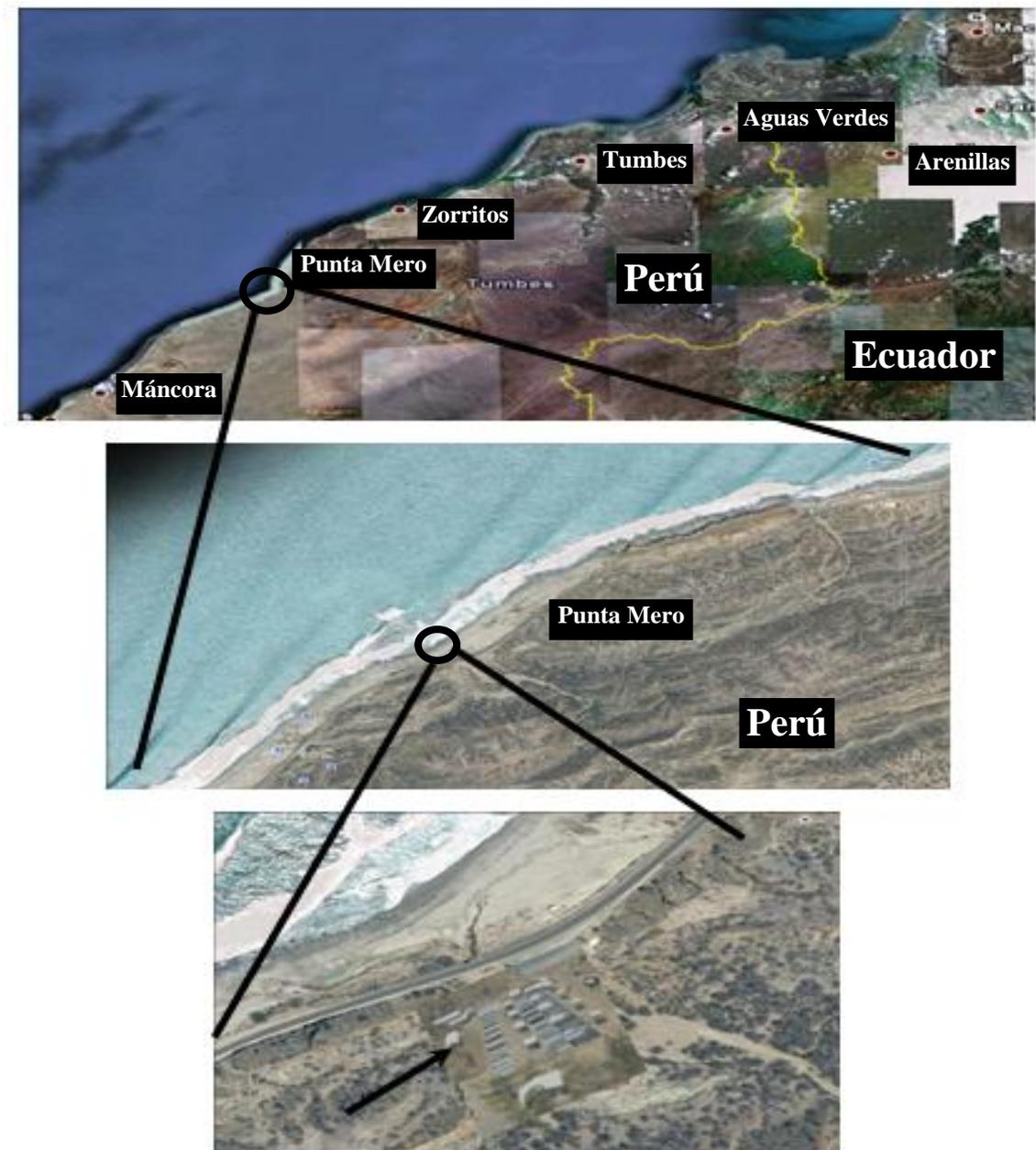


Fig. 6. Ubicación Geográfica del “Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas de Langostino *Litopenaeus vannamei*- Marinazul S.A.” ubicada en la caleta de Punta Mero, distrito de Canoas de Punta Sal del departamento de Tumbes – Perú.



Fig. 7. Sustrato empleado: Geotextil - fibras de polipropileno



Fig. 8. Acondicionamiento del Sustrato: Colocación de pesos y flotadores.



Fig. 9. Ubicación de sustratos en estanques de cultivo Semi-intensivo.



Fig. 10. Ubicación de sustratos en estanques de cultivo Intensivo.



Fig. 11. Recolección de muestras a partir de cortes de un área de 25 cm²



Fig. 12. Aislamiento de Microalgas: Diluciones Sucesivas en Microplacas



Fig. 13. Aislamiento de Microalgas: Captura con Micropipeta

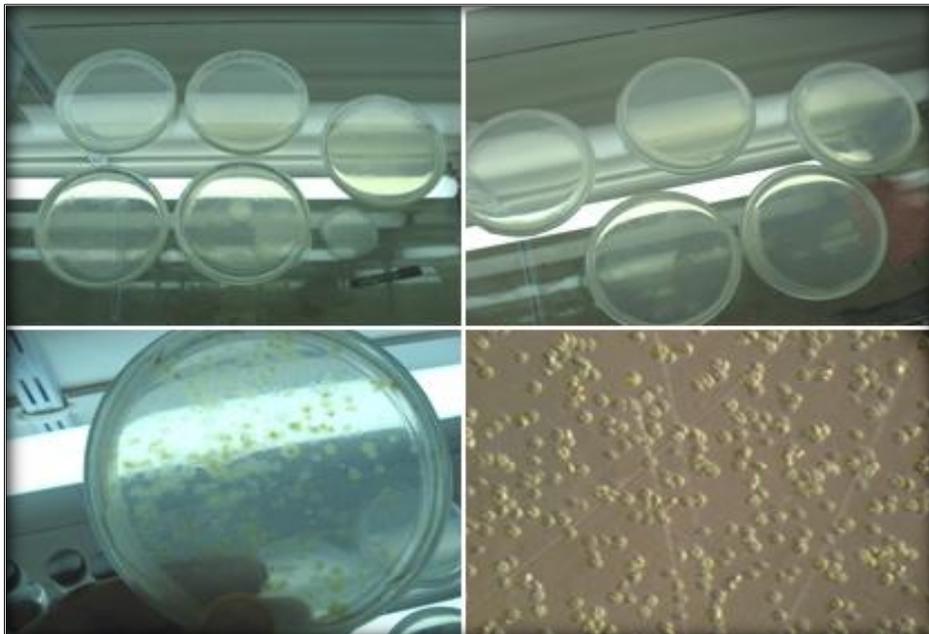


Fig. 14. Aislamiento de Microalgas: Siembra en Medio Sólido.

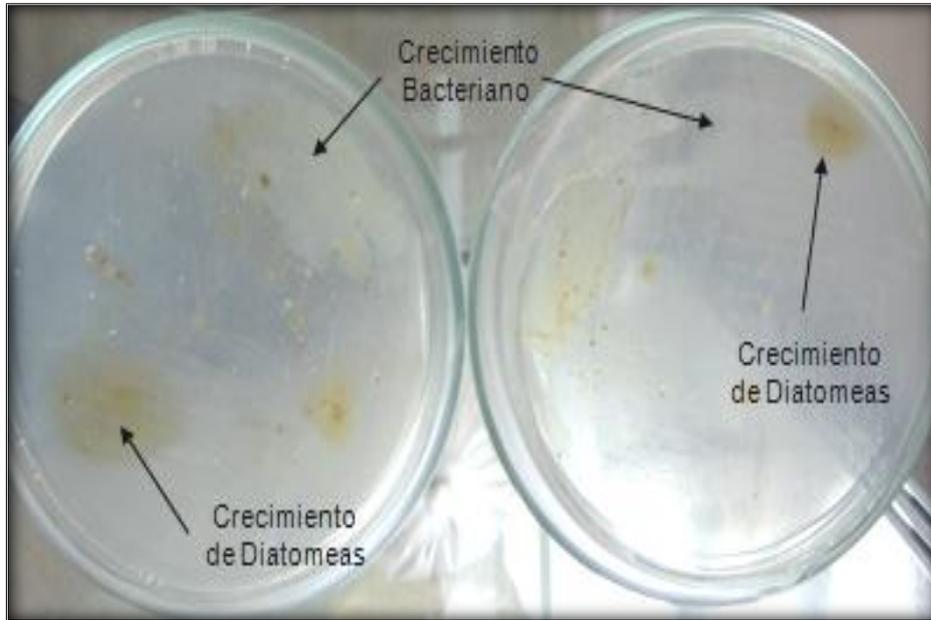


Fig. 15. Medio Guillard F/2 solidificado: Crecimiento de Diatomeas y Bacterias.

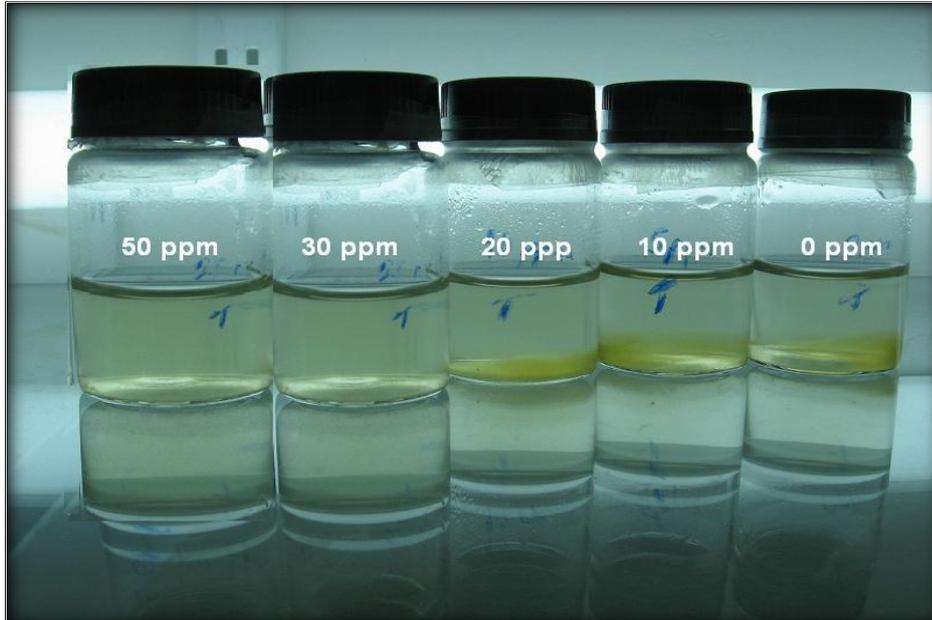


Fig. 16. Purificación con Peróxido de Hidrógeno - Tratamientos empleados.

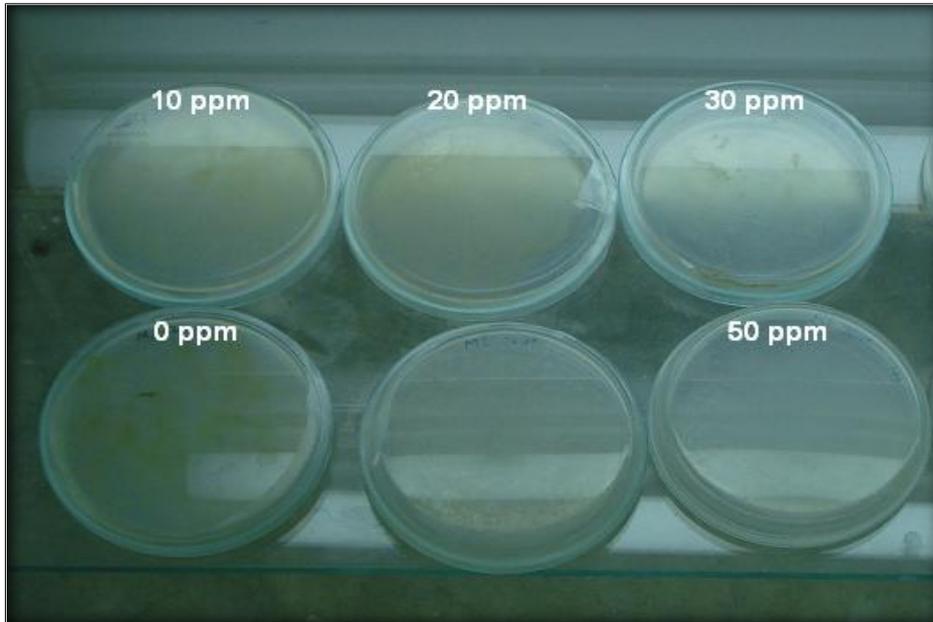


Fig. 17. Purificación con Peróxido de Hidrógeno – Siembra en Medio F/2 solidificado.

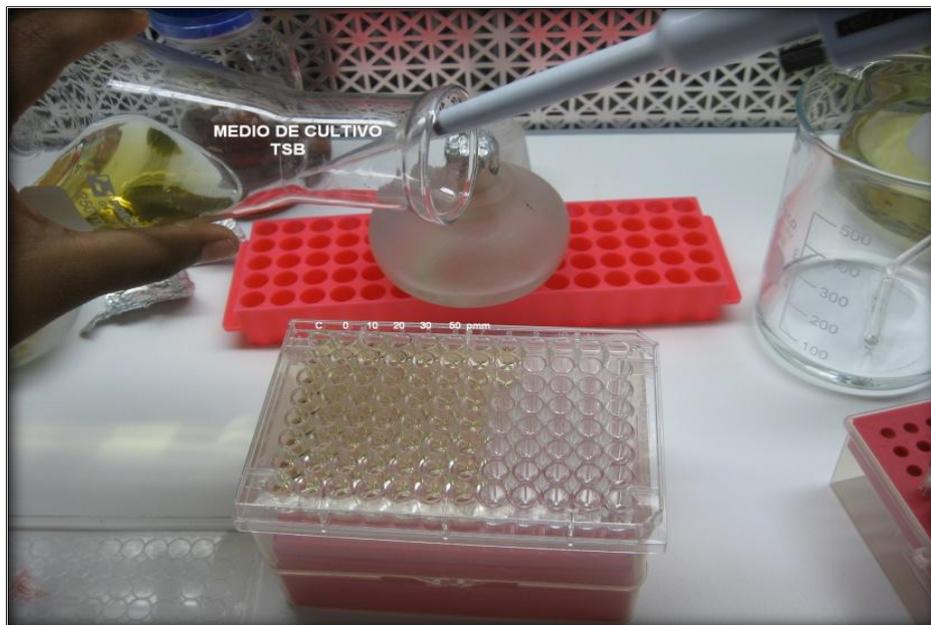


Fig. 18. Purificación con Peróxido de Hidrógeno – Determinación de la Carga Bacteriana.



Fig. 19. Conservación de Cepas de Diatomeas: Medio Líquido – 10 mL.

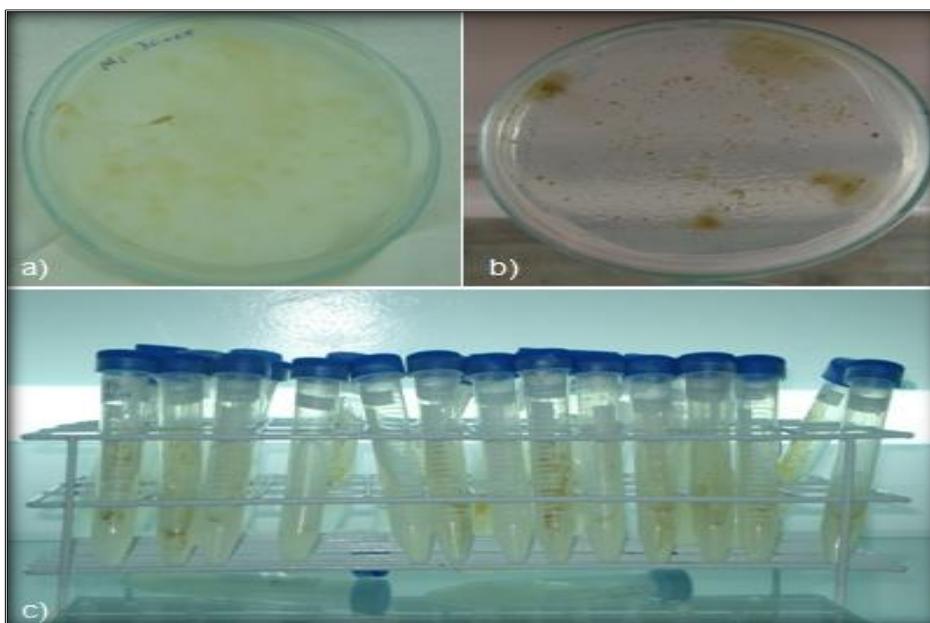


Fig. 20. Conservación de Cepas de Diatomeas: Medio Solidificado a) y b) Placas Petri c) Agar Inclinado.



Fig. 21. Criopreservación de Cepas de Diatomeas: Nitrógeno líquido - 196 °C



Fig. 22. Identificación de Cepas de Diatomeas: Microscopio invertido Olympus IX-FLA.



Fig. 23. Identificación de Cepas de Diatomeas:
Microscopio Confocal Olympus FLUOVIEW 1000

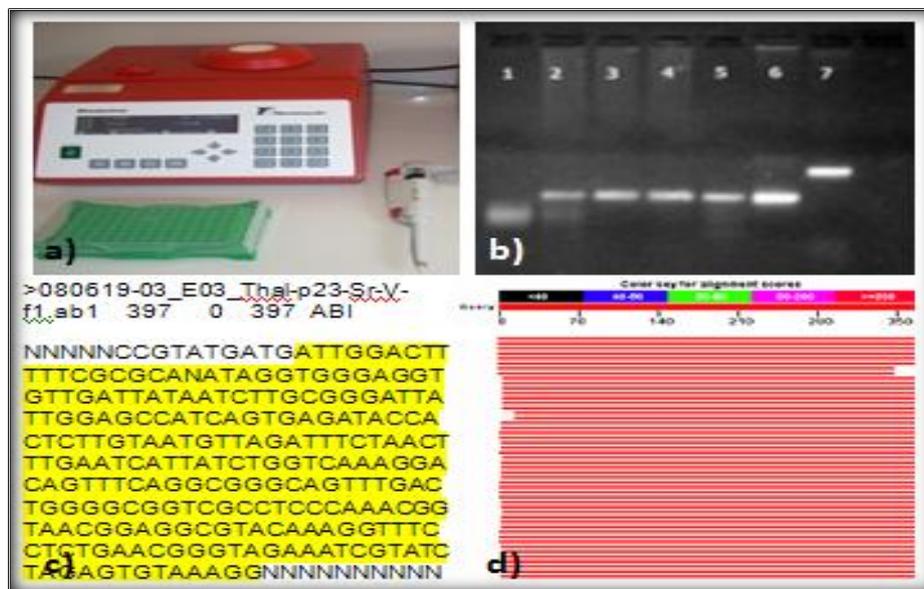


Fig. 24. Taxonomía Molecular: a) PCR – b) Obtención del amplicon
c) Secuenciación – d) Análisis en el Programa Blast.ncbi

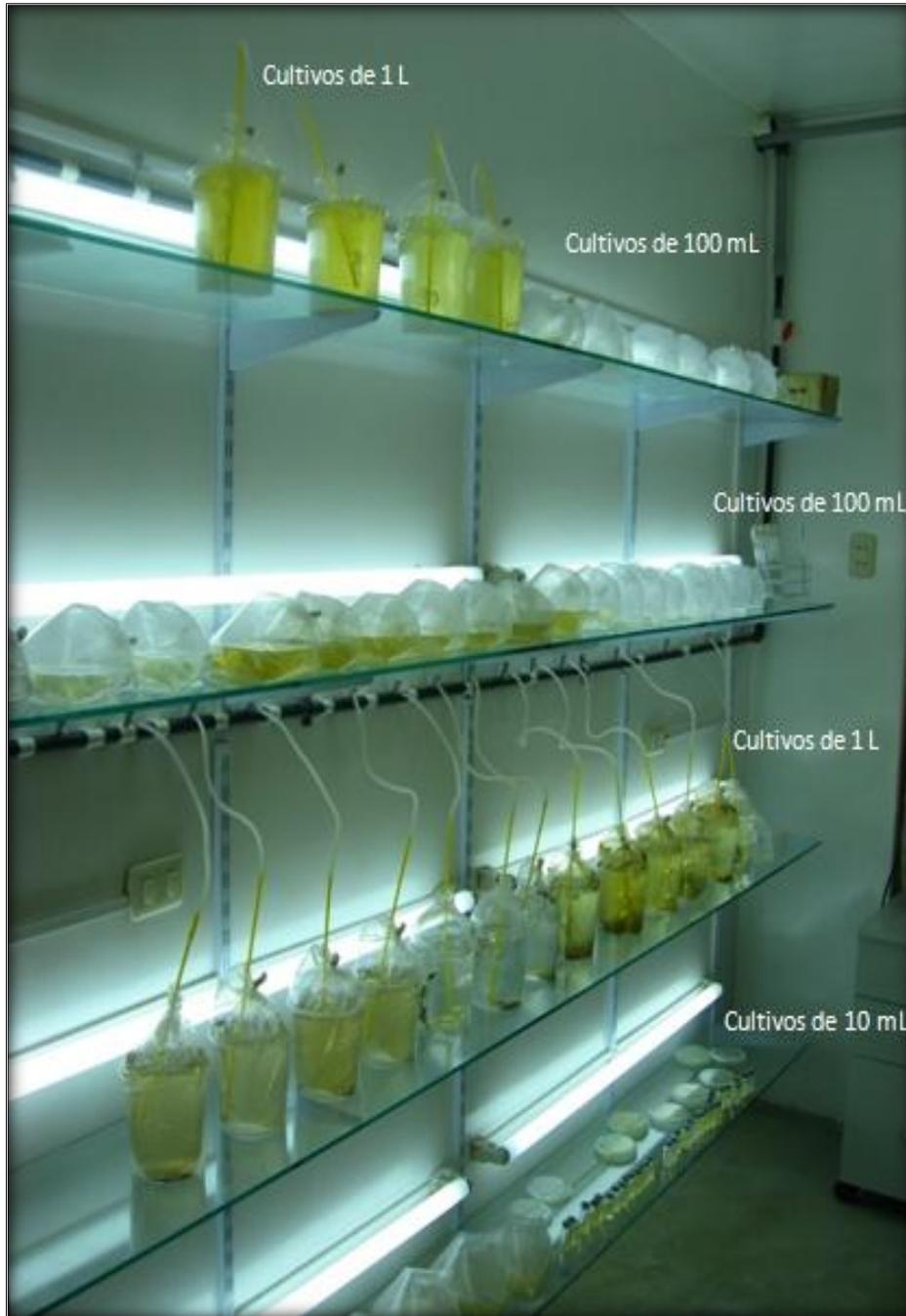


Fig. 25. Cepario de Microalgas: Cultivos de 10 mL – 100 mL – 1 L.



Fig. 26. Cultivos Iniciales – Cultivos de 10 mL.



Fig. 27. Cultivos Iniciales – Cultivos de 100 mL



Fig. 28. Cultivos Iniciales – Cultivos de 1 Litro.



Fig. 29. Cultivos Intermedios – Cultivos de 10 Litros.



Fig. 30. Cultivos Intermedios – Cultivos de 100 Litros.



Fig. 31. Cultivos Masivos – Cultivos de 1 Tonelada.



Fig. 32. Dinámica de Crecimiento: Crecimiento Poblacional a través del Tiempo.

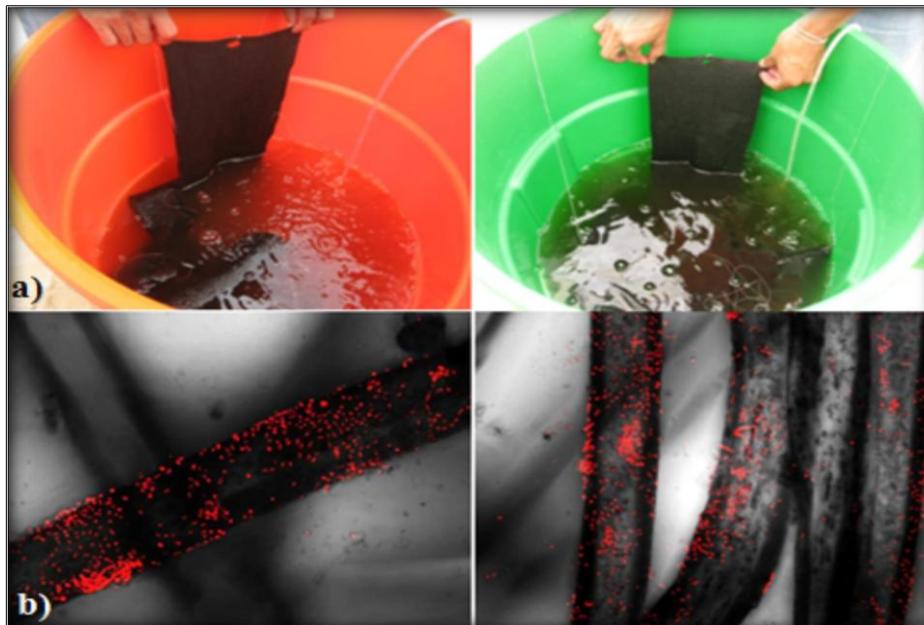


Fig. 33. Colonización de Geotextiles con Bacterias (*Bacillus* sp):
a) Acondicionamiento de Sustratos, b) Fibras de Geotextil colonizadas por Bacterias (10^4 UFC / cm^2).



Fig. 34. Producción de Perifiton Domesticado: 5 pedazos de geotextil 50 x 40 cm (2000 cm²) en 100 L de cultivo monoalgal.

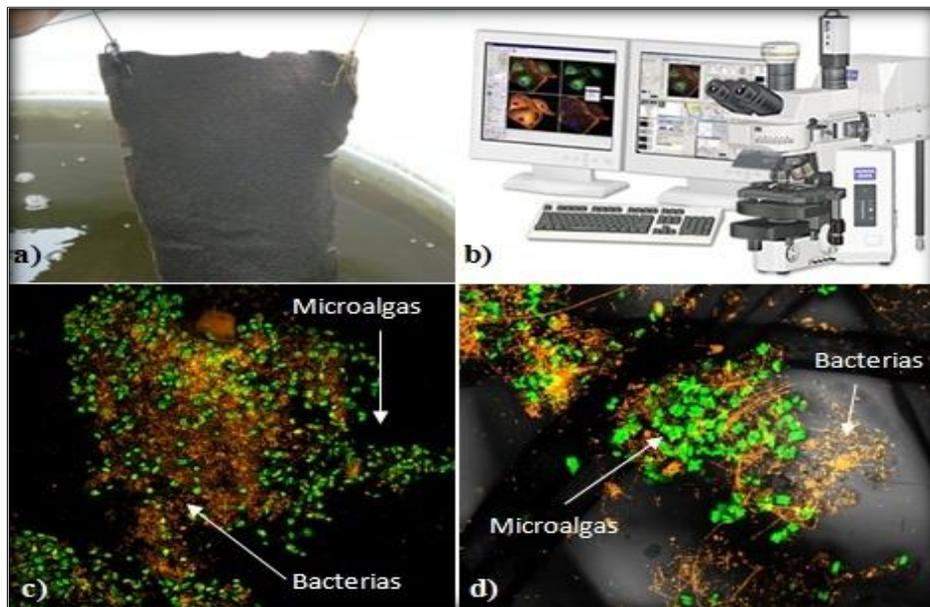


Fig. 35. Evaluación de la Colonización de las Fibras de Geotextil: a) Extracción de muestras, b) Análisis por LSCM, c) y d) Observación de Microalgas y Bacterias.



Fig. 36. Diseño Experimental: Recipientes Plásticos de 7 L provistos con 5 L de agua de mar (34 %) con suministro de aire.



Fig. 37. Aclimatación y Siembra de Post – Larvas *Litopenaeus vannamei* (PL10).

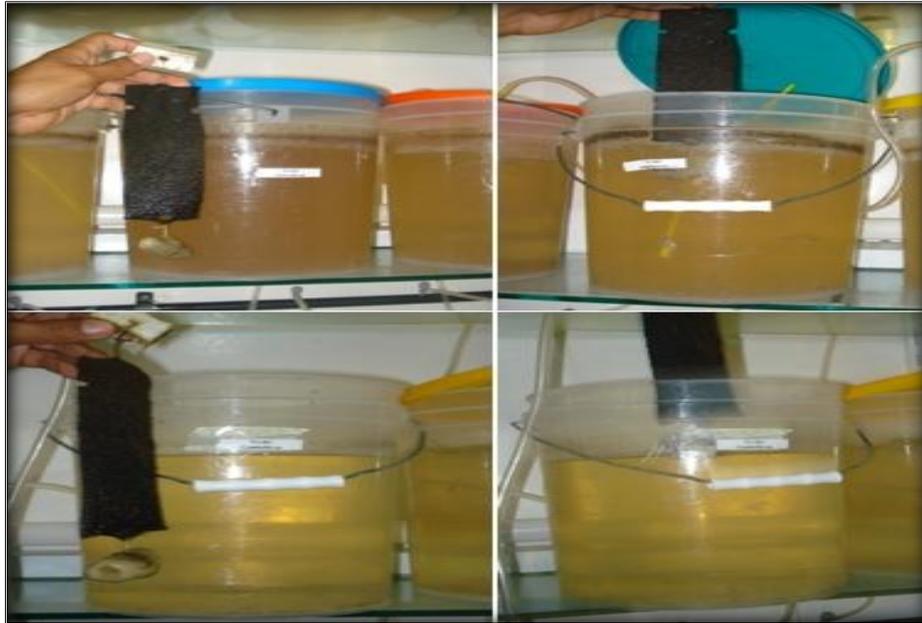


Fig. 38. Ubicación de Geotextiles Maduros (Colonizados) - Fragmentos de 5 X 20 cm considerando la relación del 30 % del área de fondo.



Fig. 39. Registro de Parámetros Físicos - Químicos: Temperatura y pH.



Fig. 40. Evaluación del Valor Nutricional de las cepas de Microalgas en base al Cultivo de Post-Larvas *Litopenaeus vannamei*.

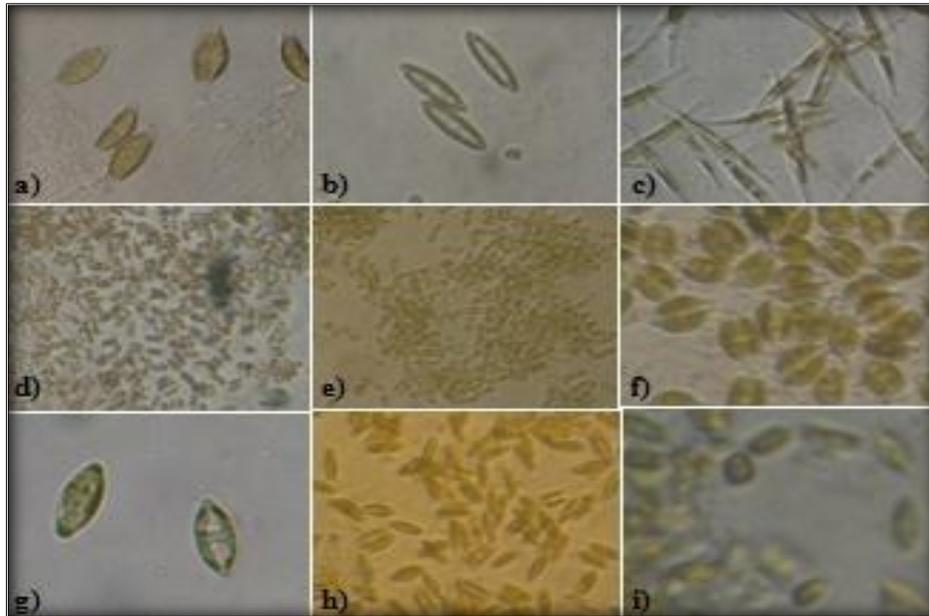


Fig. 41. Aislamiento de Microalgas: Diatomeas con un ritmo de crecimiento bajo.
 a) *Cymbella* – b) d) e) g) h) i) *Navícula* – c) *Nitzschia* – f) *Amphora*.

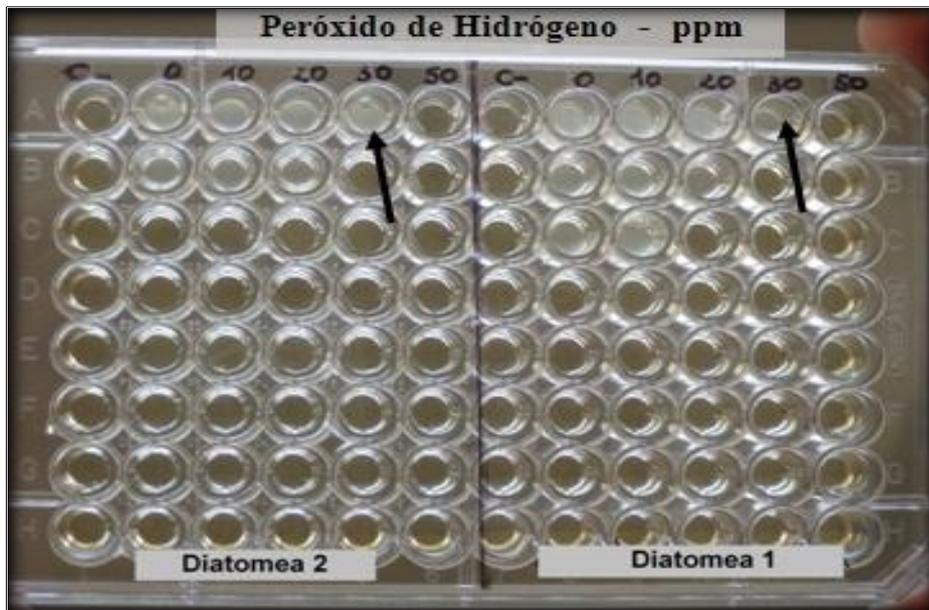


Fig. 42. Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 1 y Diatomea 2:
 Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con 30 ppm de H_2O_2 .



Fig. 43. Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 7 y Diatomea 12: Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con 30 ppm de H_2O_2 .

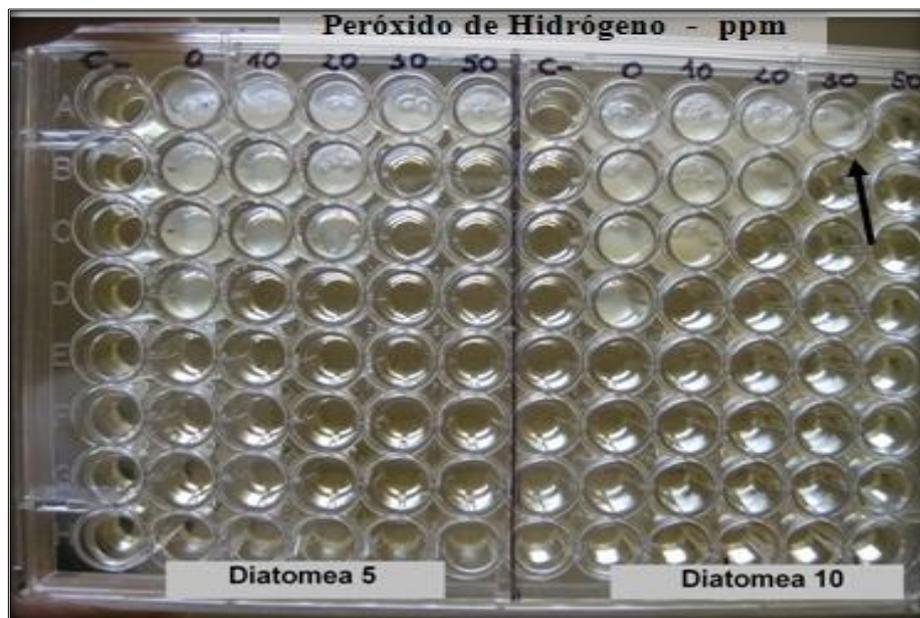


Fig. 44. Purificación de Diatomeas Bentónicas - Diatomea 10: Reducción de la Carga Bacteriana a nivel 1 (10 - 100 UFC/mL) con 30 ppm de H_2O_2 .

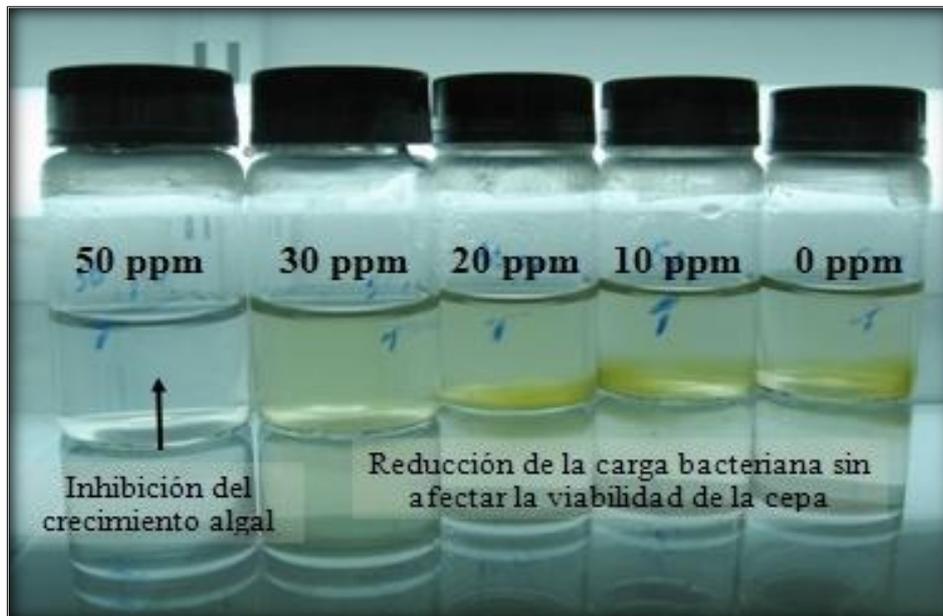


Fig. 45. Purificación de Diatomeas Bentónicas: Inhibición del Crecimiento Algal a partir de Concentraciones Superiores a 30 ppm de H_2O_2 (D1 - D2 - D7 - D10 - D12).



Fig. 46. Purificación de Diatomeas Bentónicas: Inhibición del Crecimiento Algal a partir de Concentraciones de 10 ppm de H_2O_2 (D5).

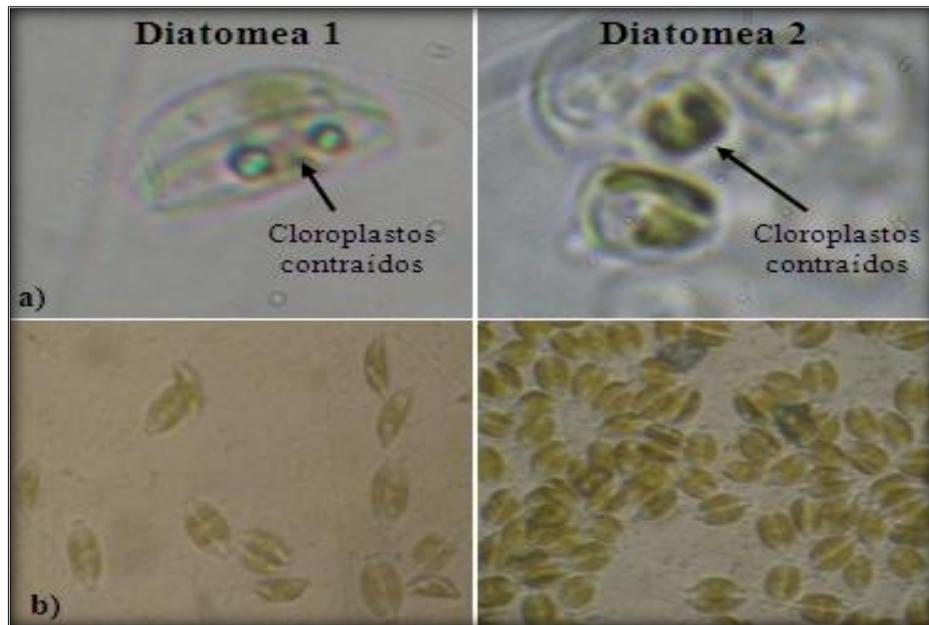


Fig. 47. Criopreservación: a) Muestras criopreservadas. b) Muestras reactivadas.

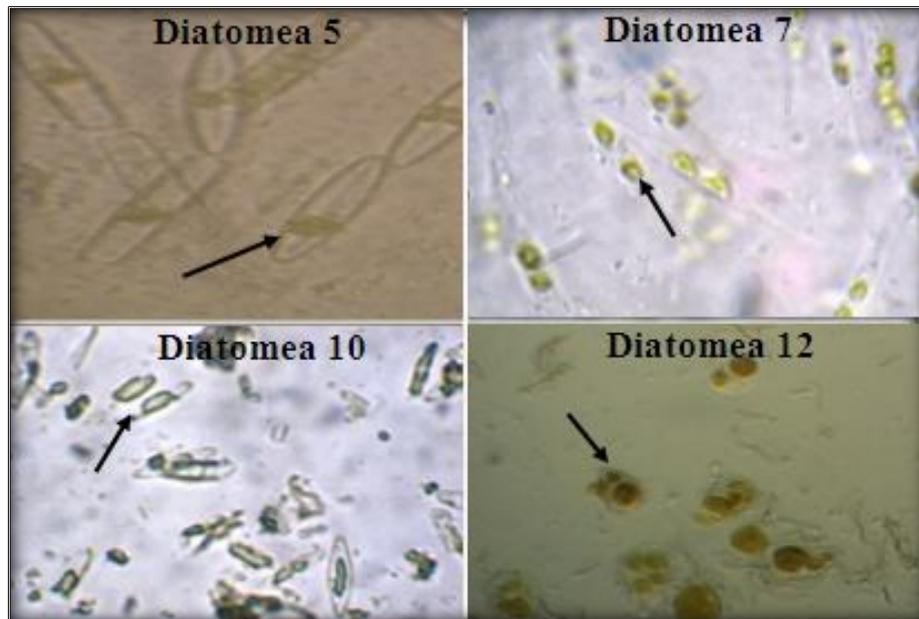


Fig. 48. Criopreservación: Muestras criopreservadas, presencia de cloroplastos contraídos (Viabilidad de la cepa afectada).

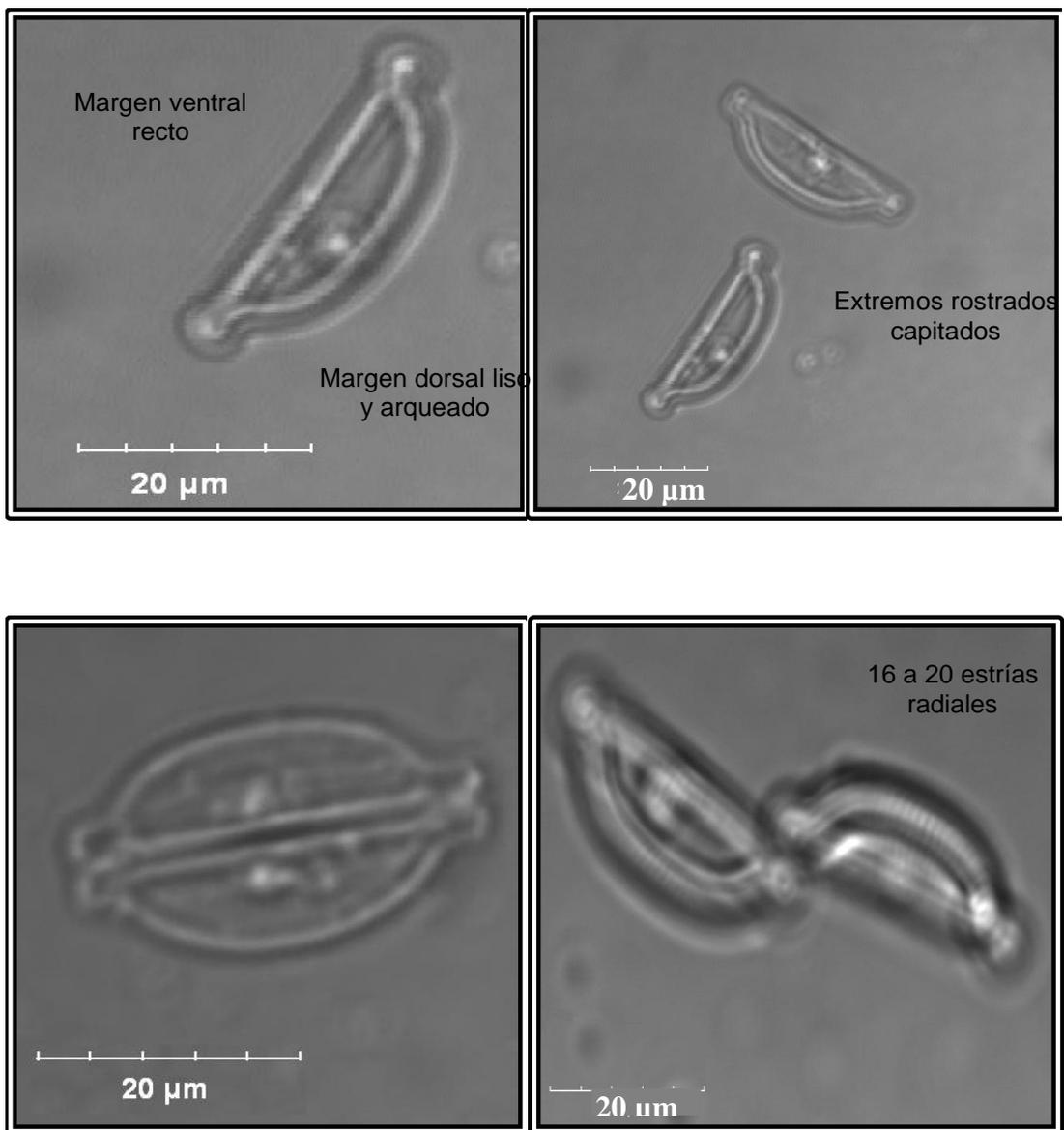


Fig. 49 Frústulos de Diatomea 1: *Amphora salina*

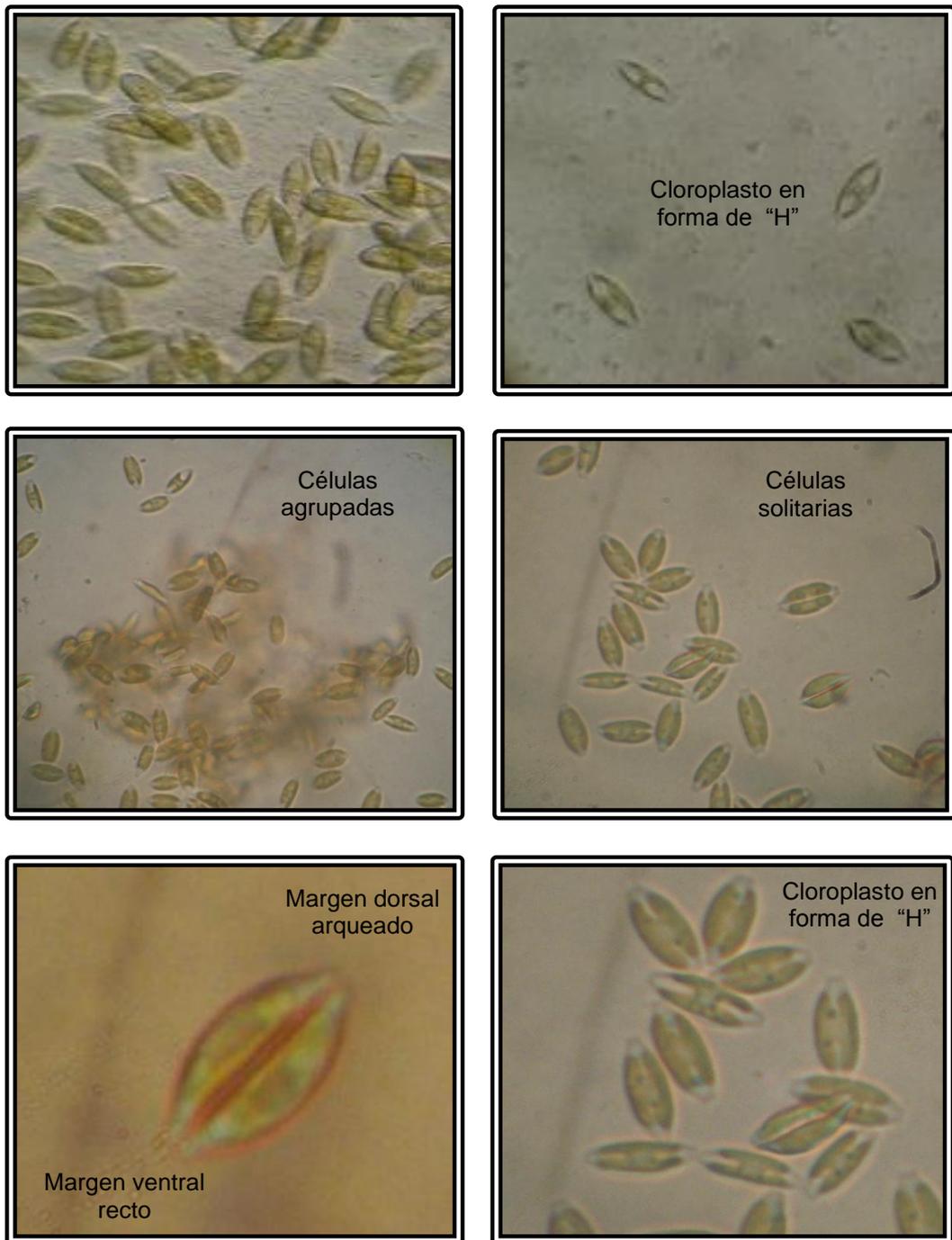


Fig. 50. Morfología de Diatomea 1: *Amphora salina* (Microscopio Invertido)

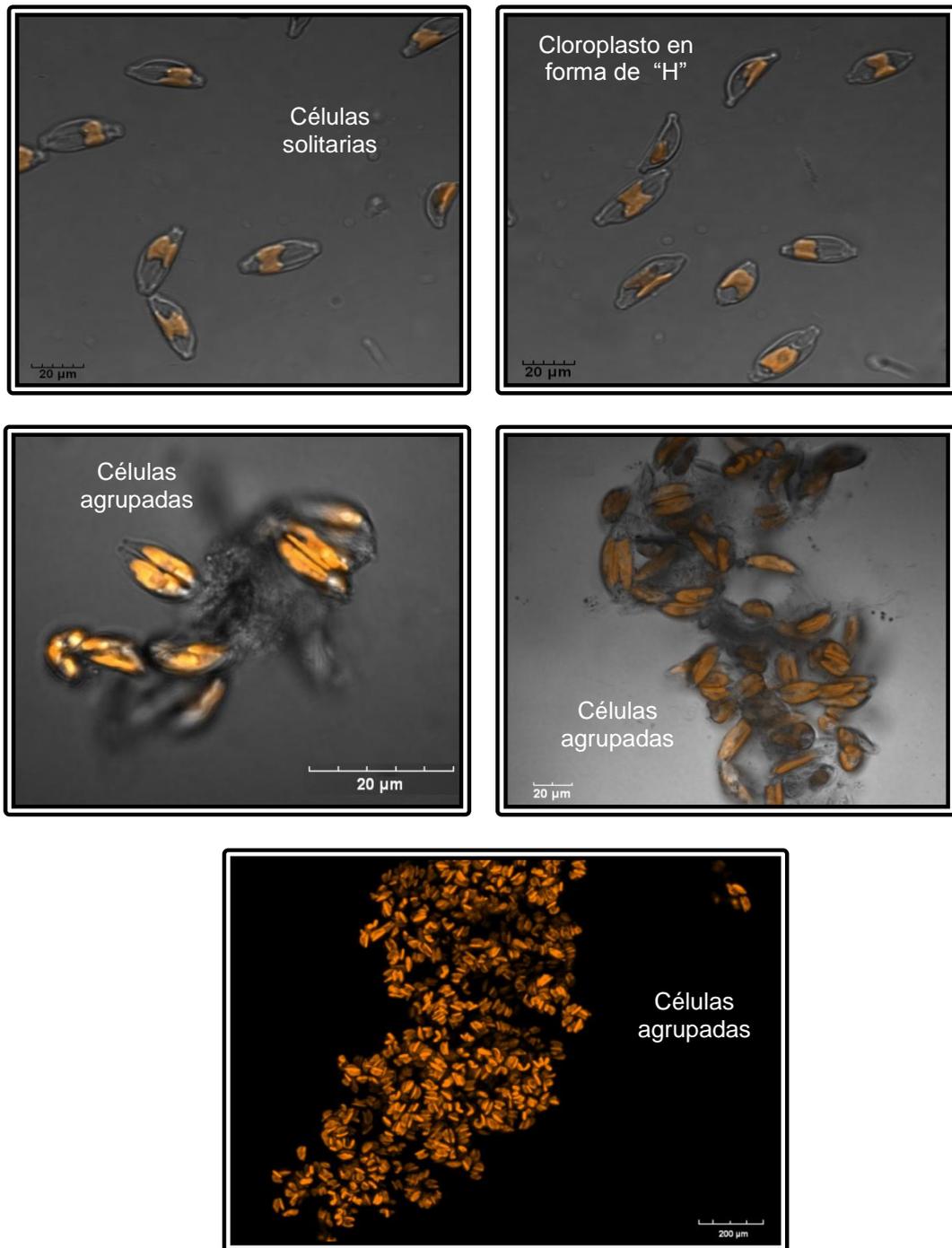


Fig. 51. Morfología de Diatomea 1: *Amphora salina* (Microscopia Confocal).

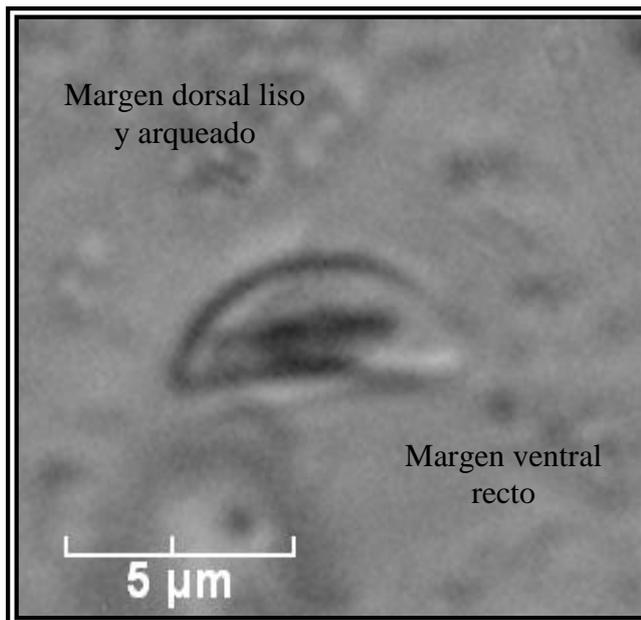
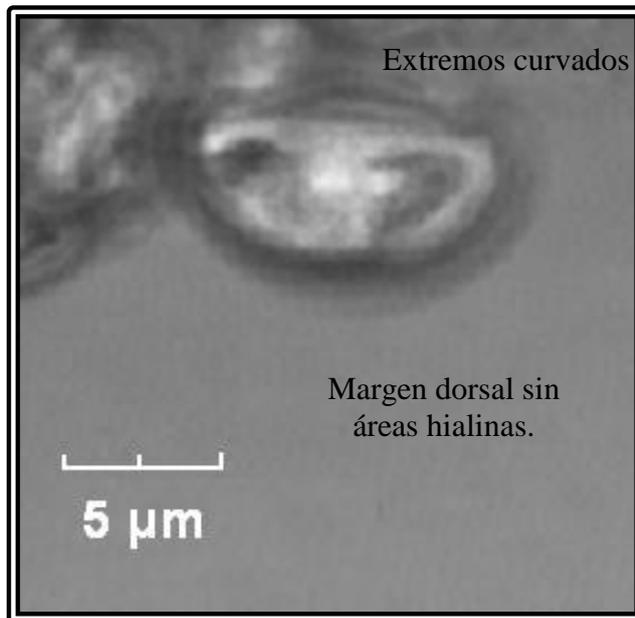


Fig.52. Frústulos de Diatomea 2: *Amphora* sp.

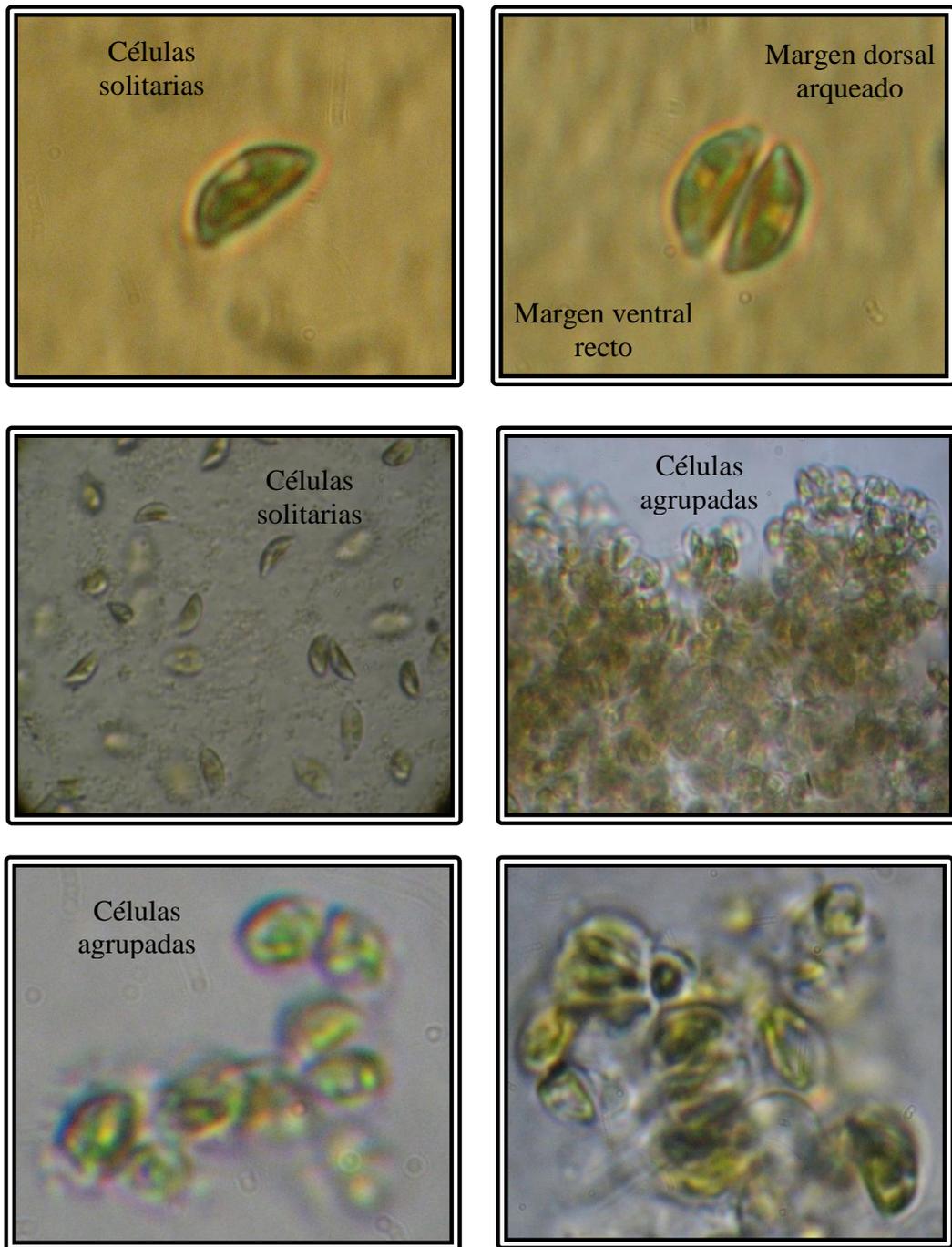


Fig.53. Morfología de Diatomea 2: *Amphora* sp (Microscopio Invertido)

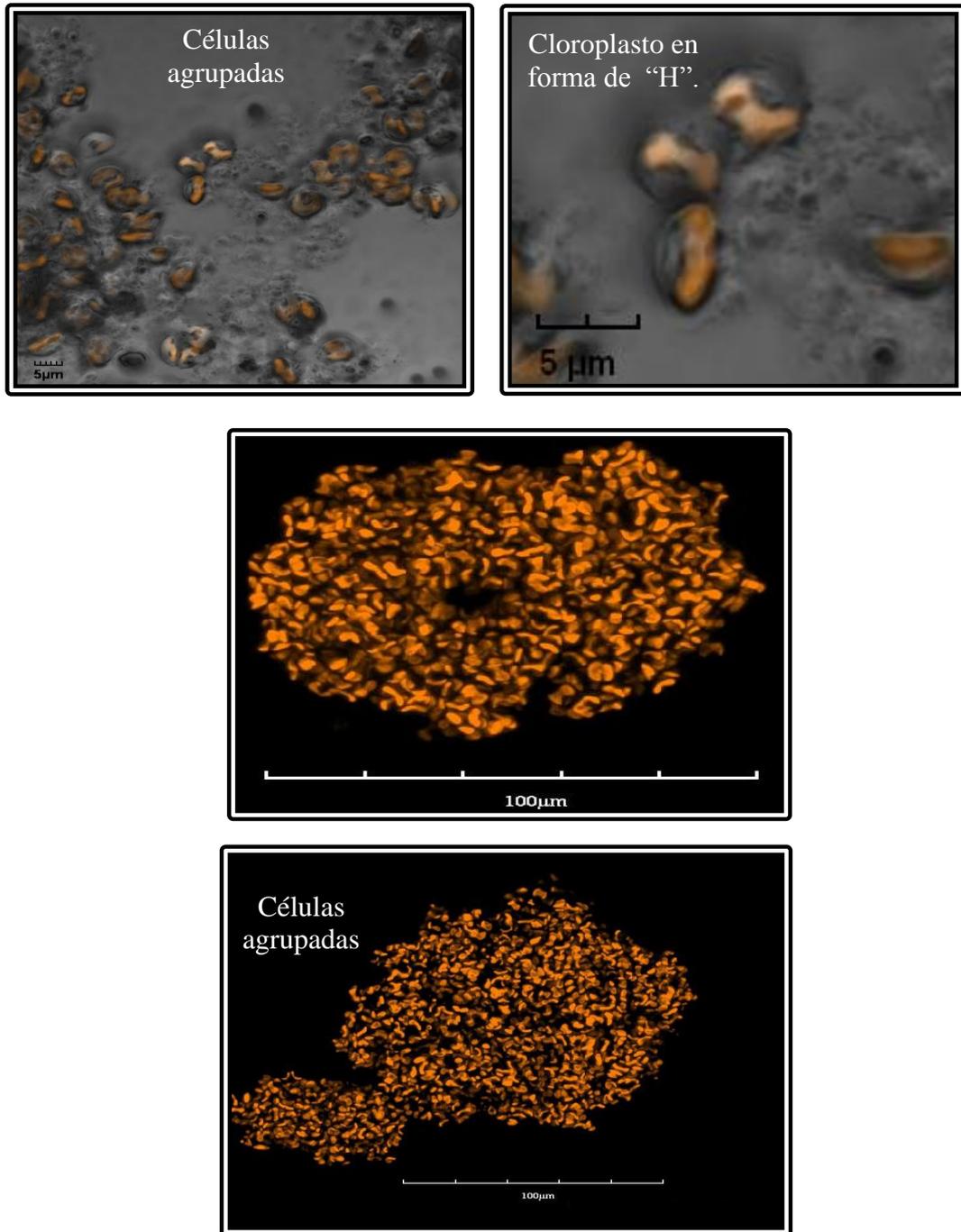


Fig. 54. Morfología de Diatomea 2: *Amphora sp.* (Microscopia Confocal).

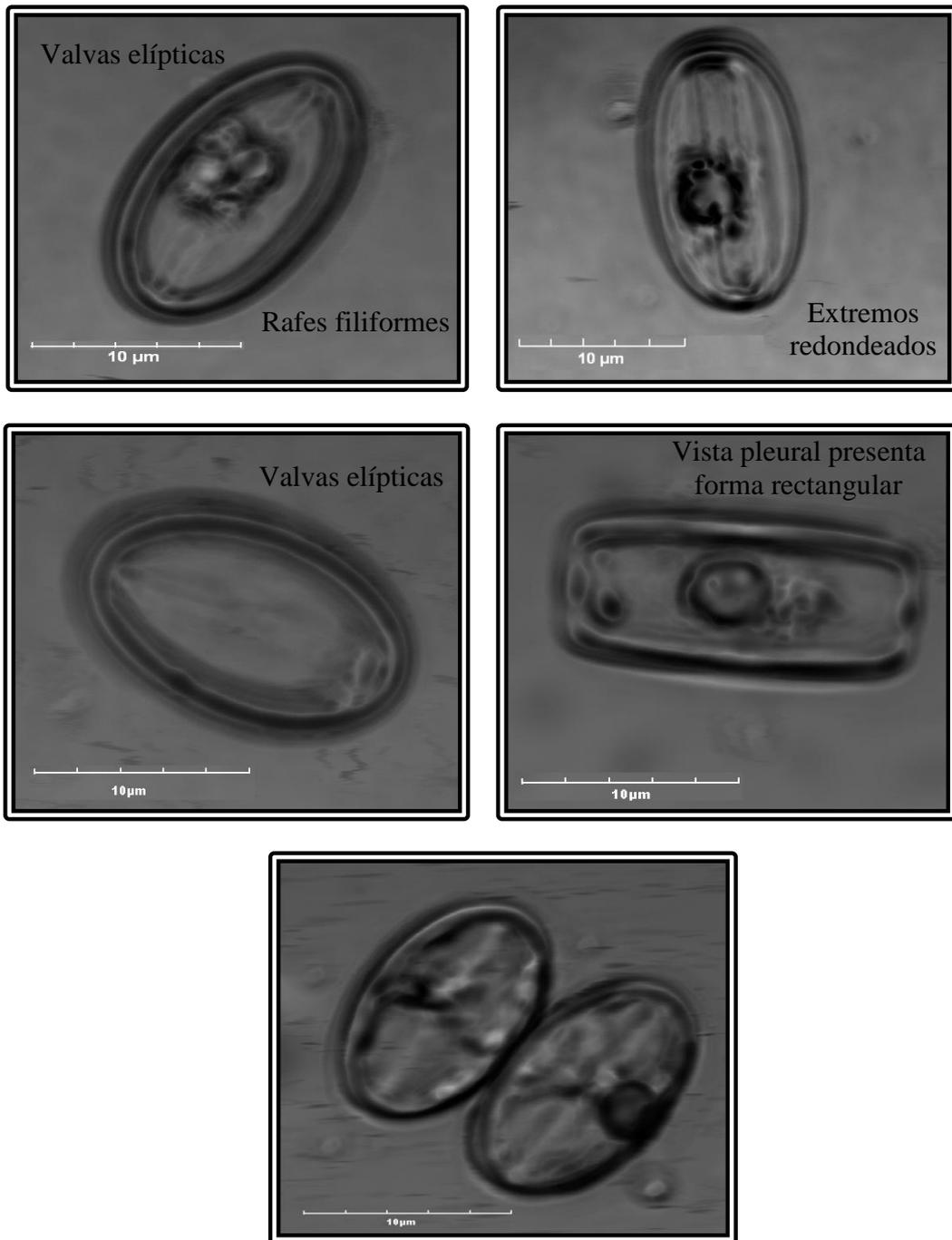


Fig. 55. Frústulos de Diatomea 5: *Sellaphora* sp

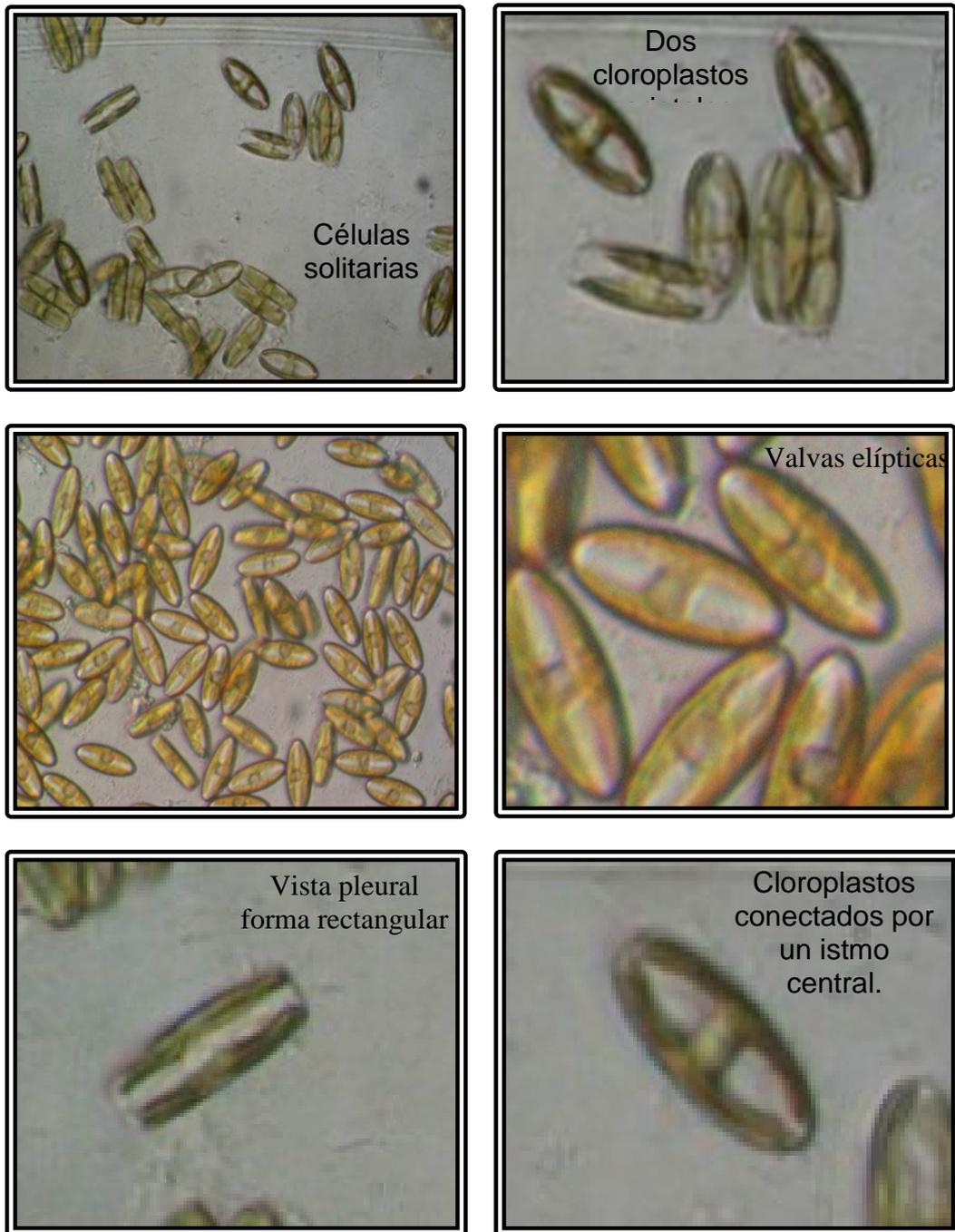


Fig. 56. Morfología de de Diatomea 5: *Sellaphora sp* (Microscopio Invertido)

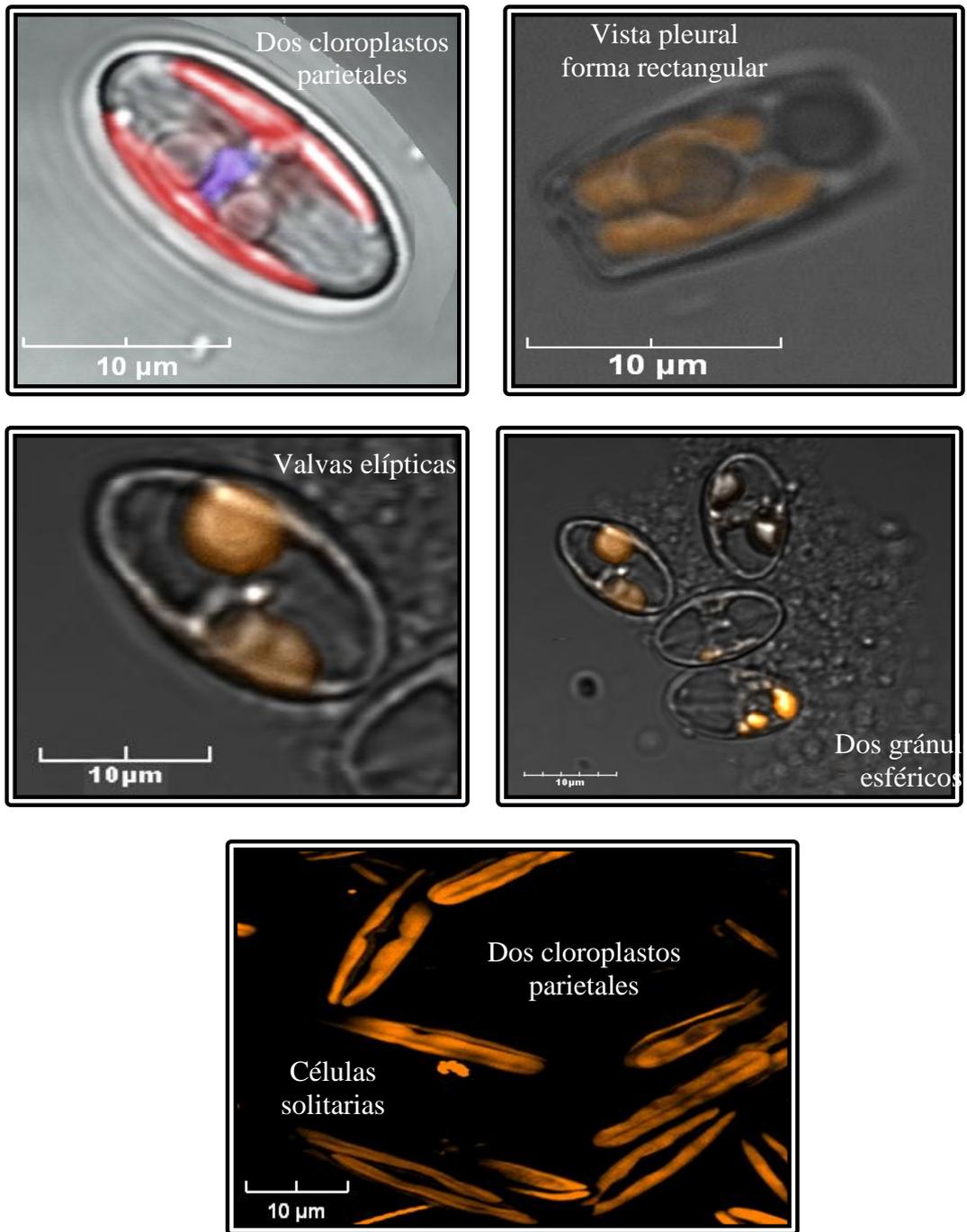


Fig. 57. Morfología de de Diatomea 5: *Sellaphora sp* (Microscopia Confocal).

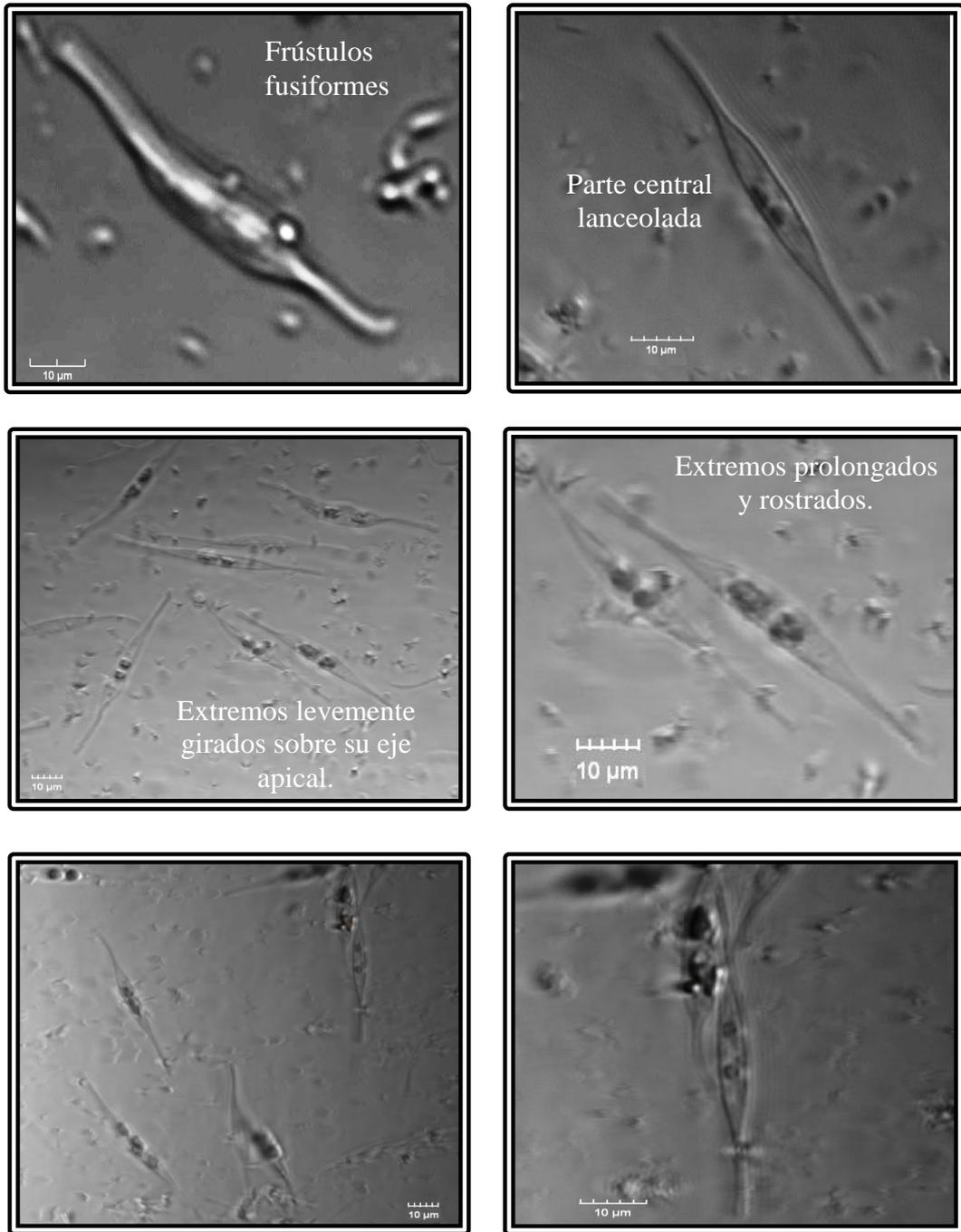


Fig. 58. Frústulos de Diatomea 7: *Nitzschia* sp.

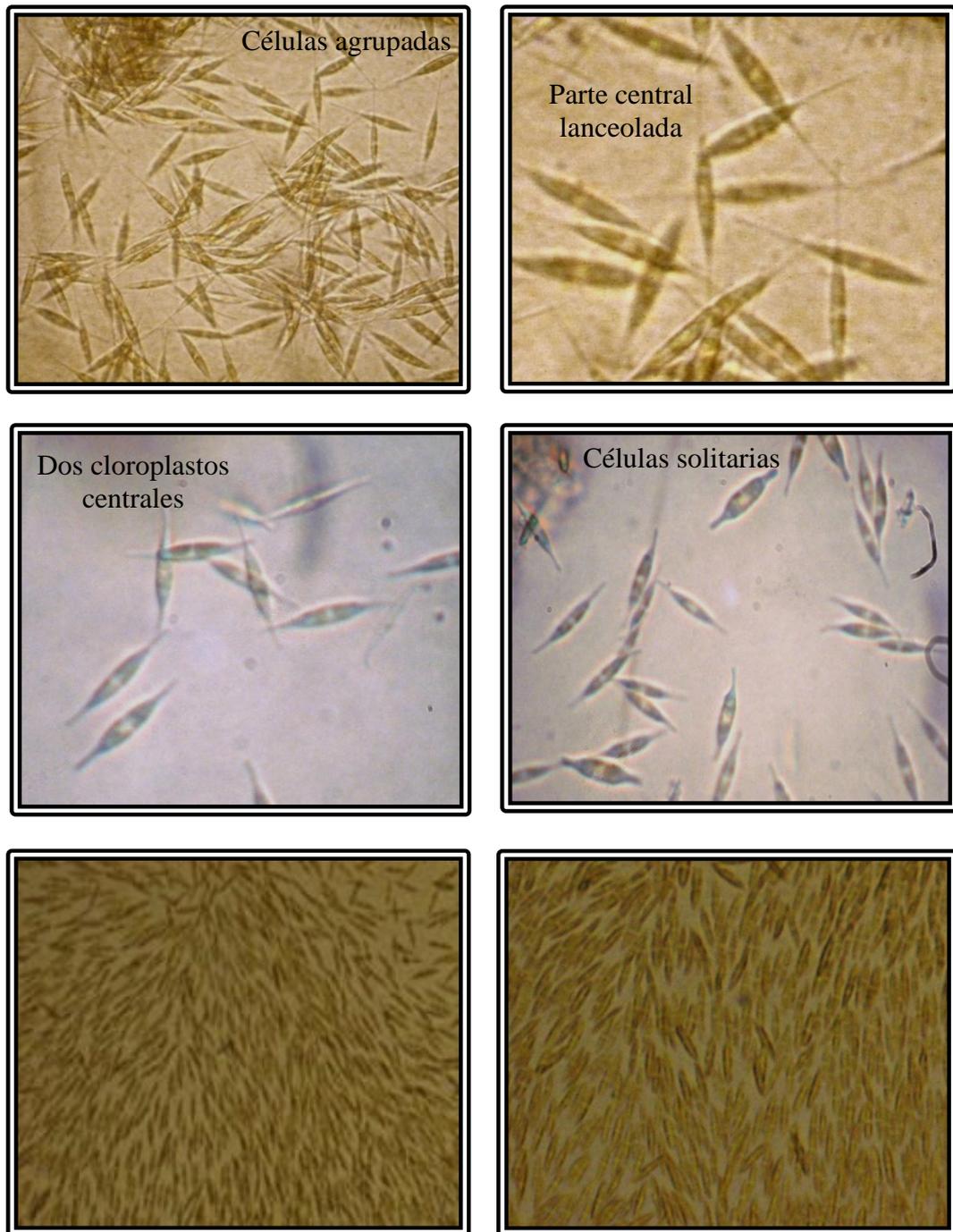


Fig. 59. Morfología de Diatomea 7: *Nitzschia* sp. (Microscopio Invertido)

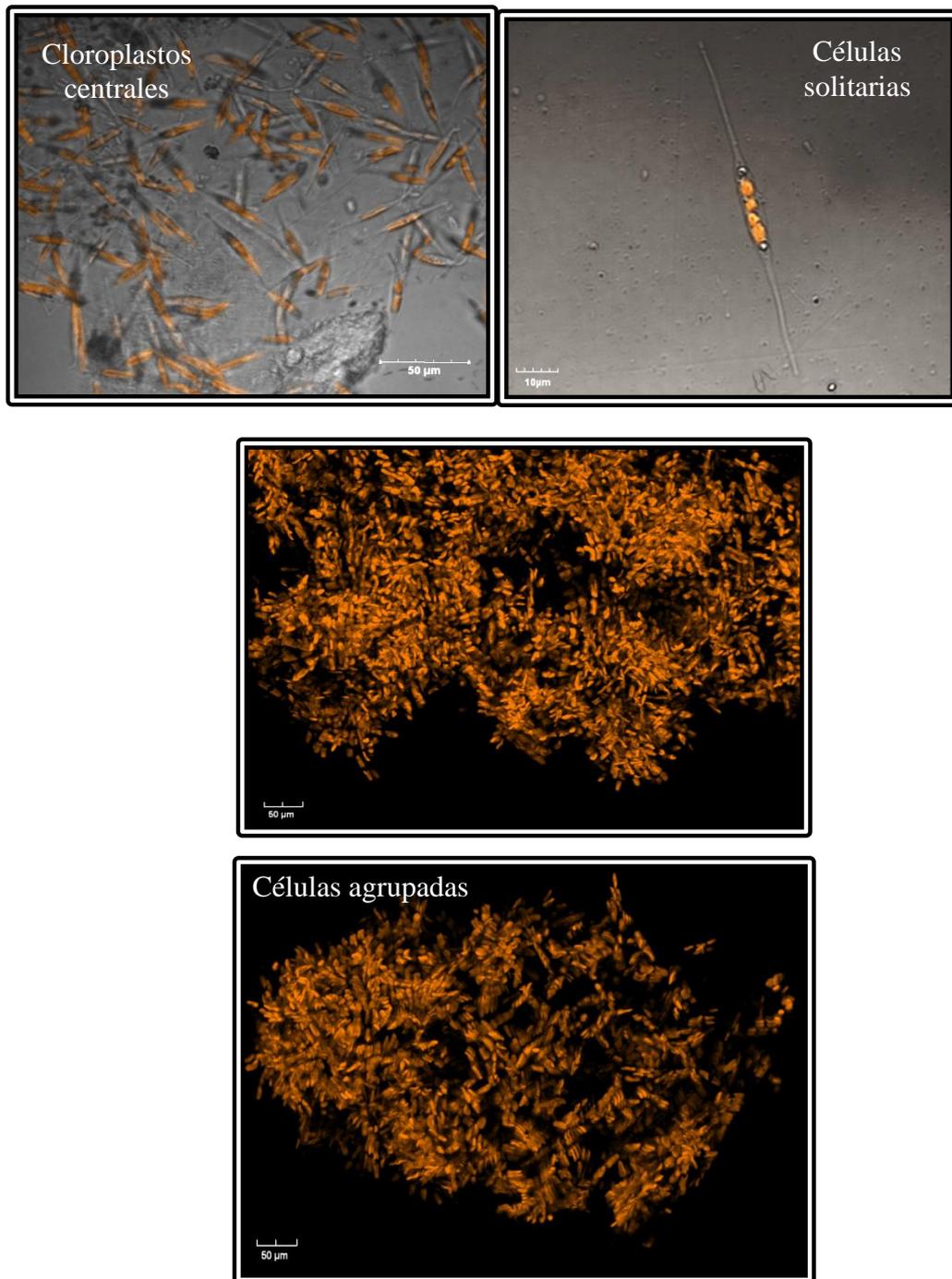


Fig. 60. Morfología de Diatomea 7: *Nitzschia sp.* (Microscopio Confocal).

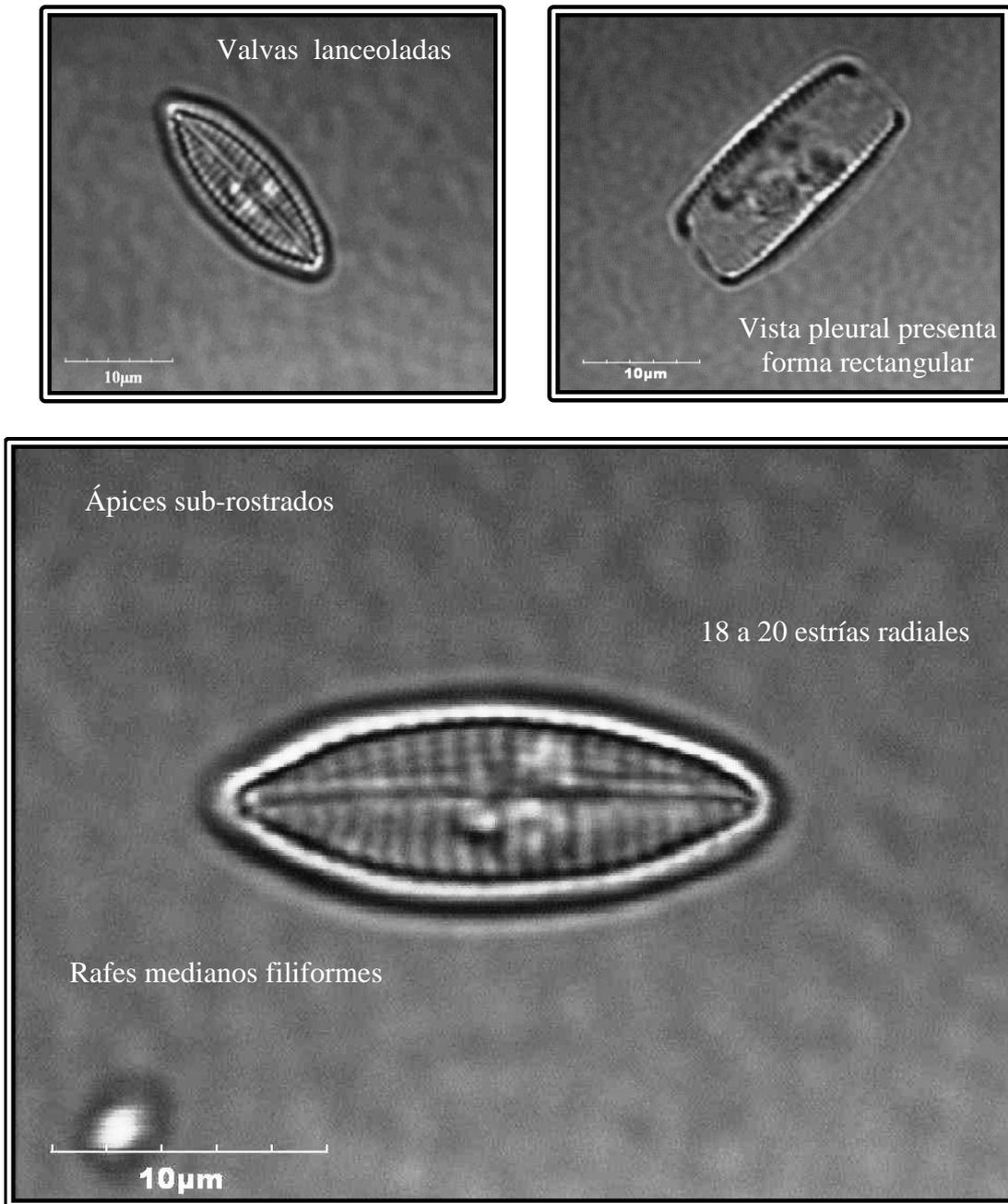


Fig. 61. Frústulos de Diatomea 10: *Navicula veneta*

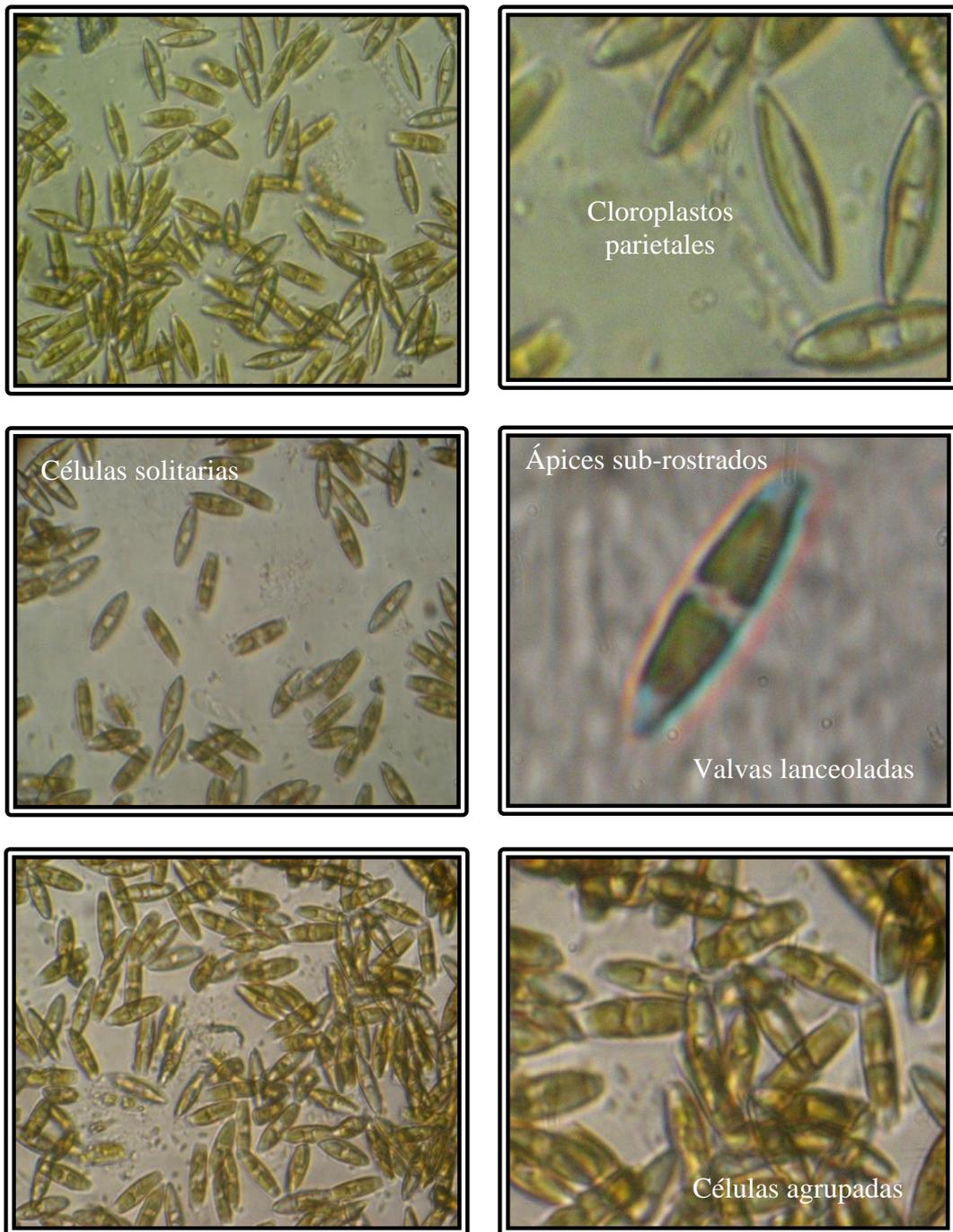


Fig. 62. Morfología de Diatomea 10: *Navicula veneta* (Microscopio Invertido)

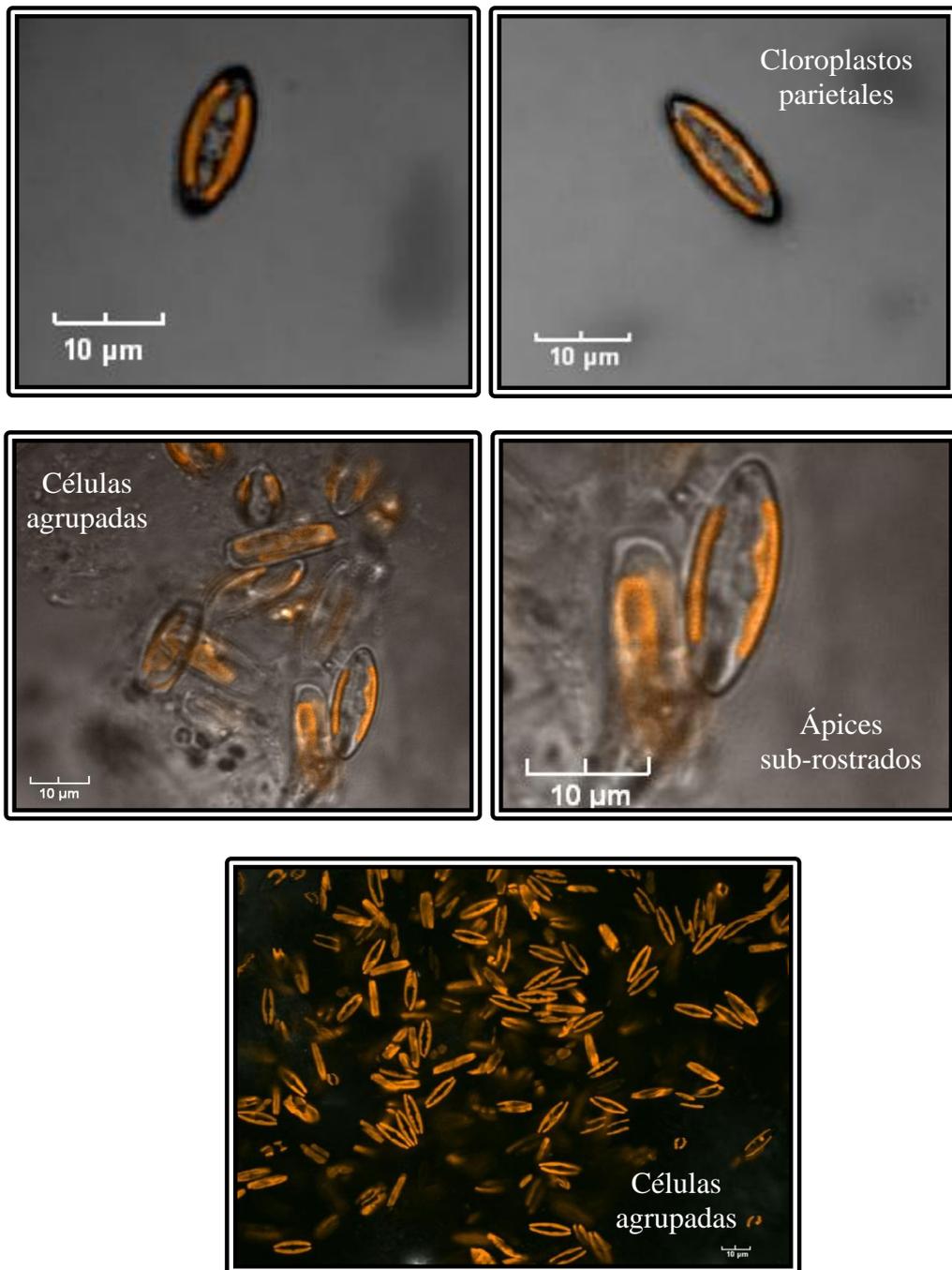


Fig. 63. Morfología de Diatomea 10: *Navicula veneta* (Microscopio Confocal).

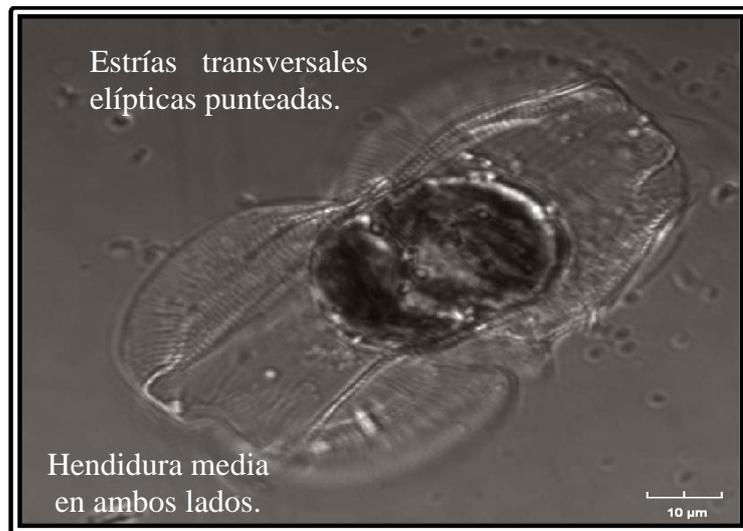


Fig. 64. Frústulos de Diatomea 12: *Amphiprora* sp.

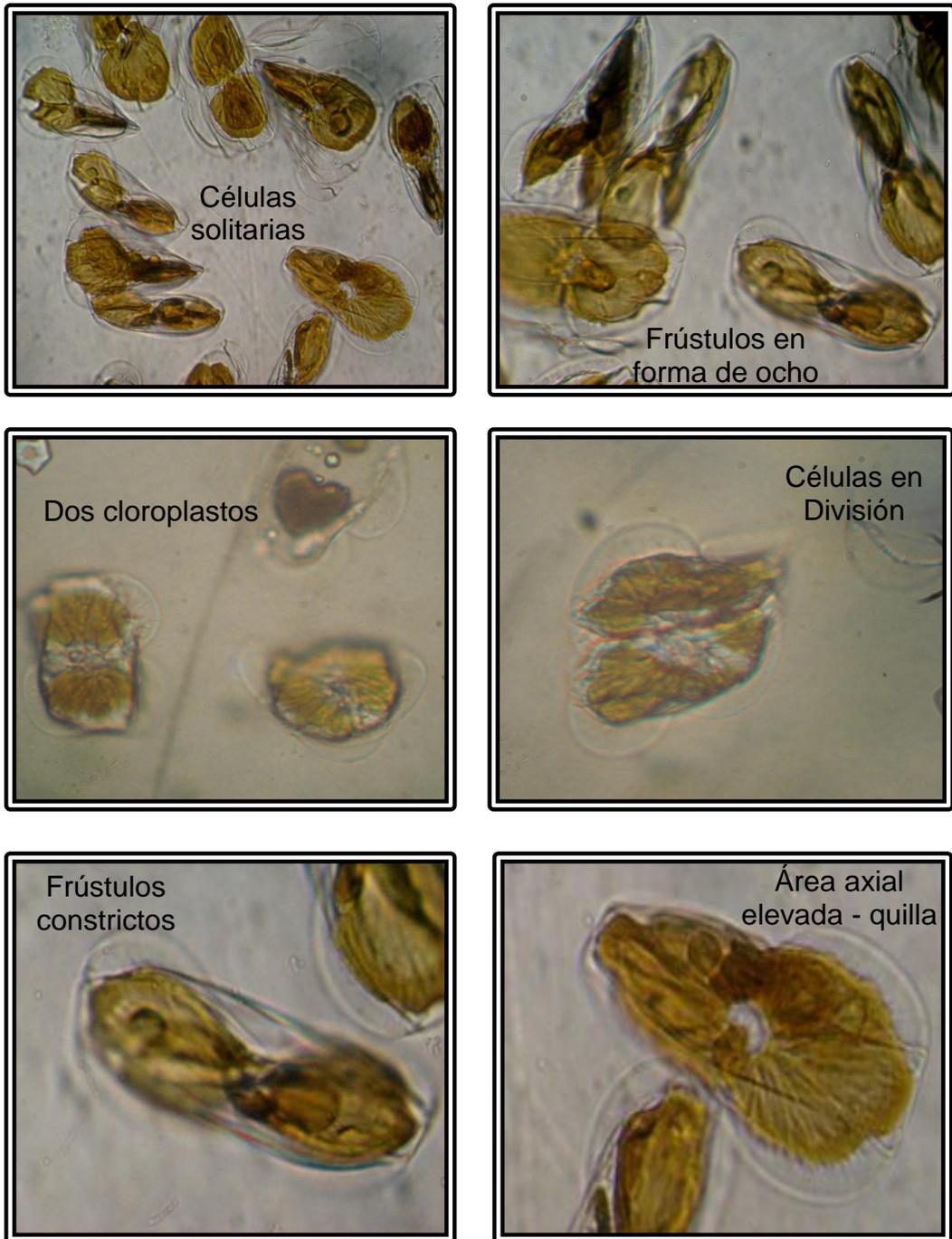


Fig. 65. Morfología de Diatomea 12: *Amphiprora sp.* (Microscopio Invertido)

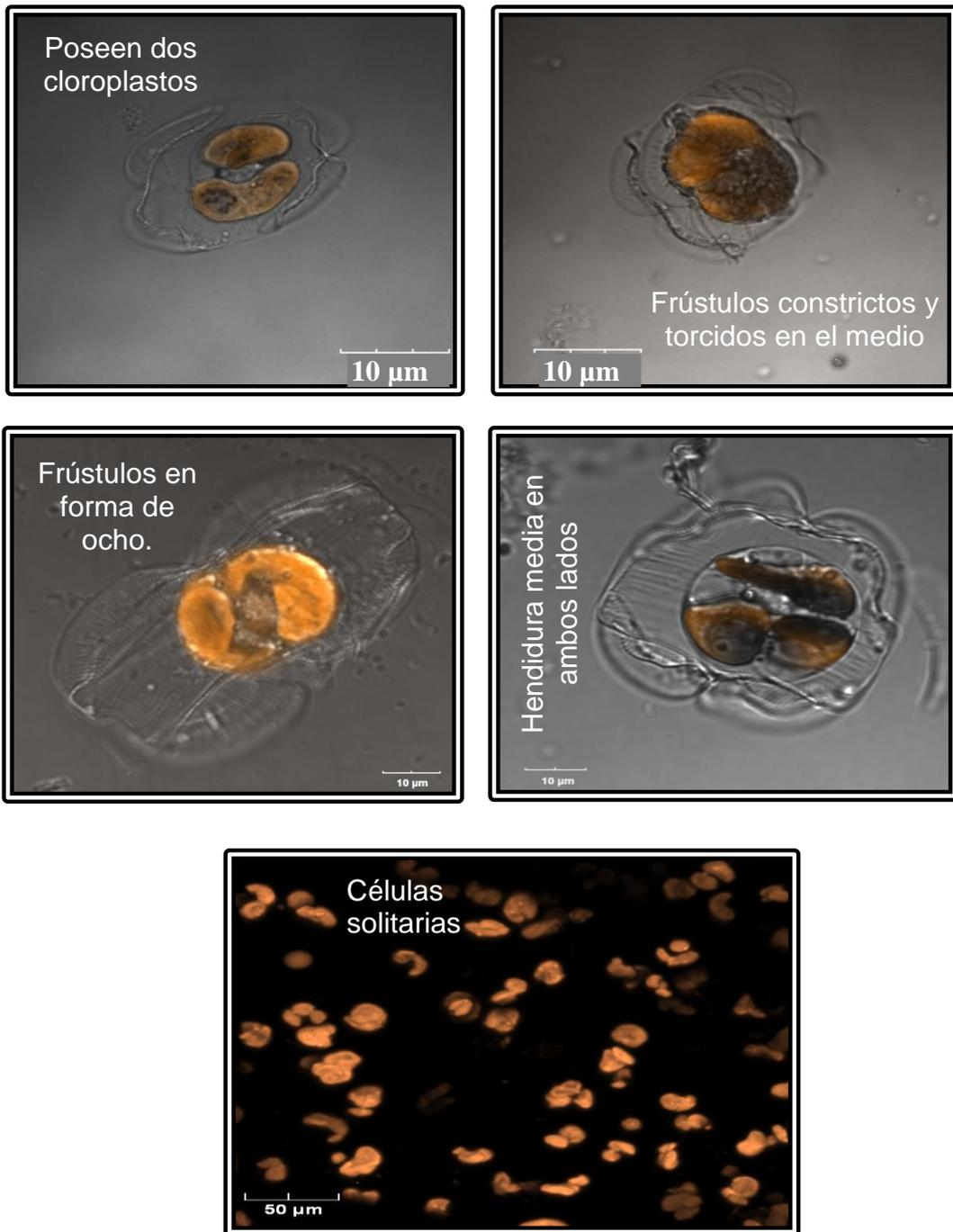


Fig. 66. Morfología de Diatomea 12: *Amphiprora* sp. (Microscopio Confocal).

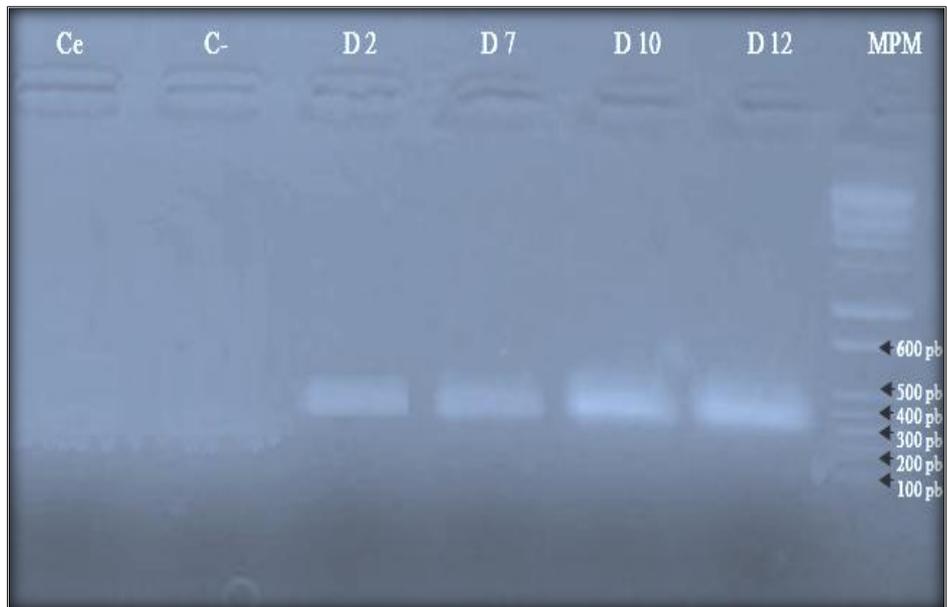


Fig. 67. Obtención de Amplicones (400 – 450 pb) de las Cepas D2, D7, D10, D12 aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1.

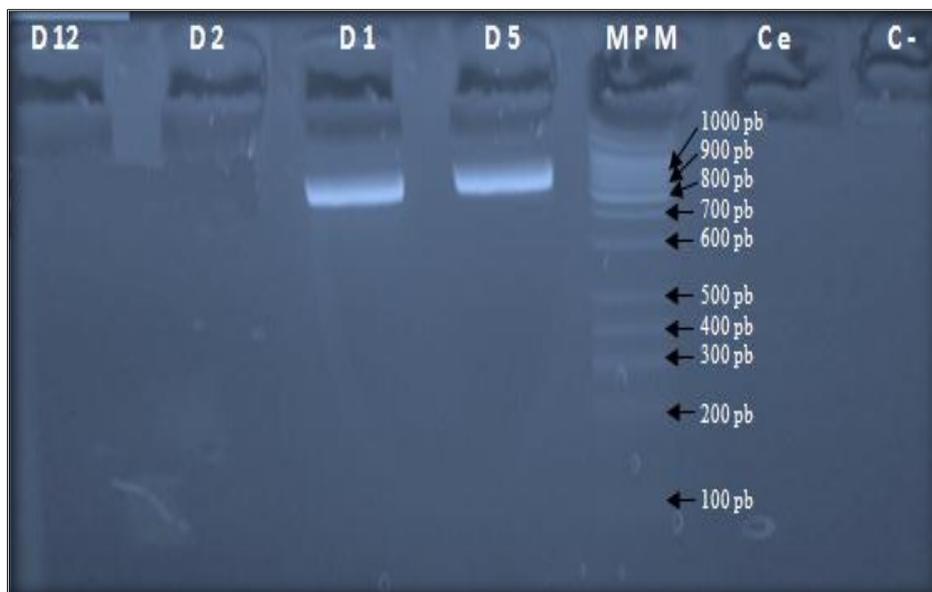


Fig. 68. Obtención de Amplicones (950 - 1000 pb) de las Cepas D1, D5 aplicando el juego de primers ITS1-DiatomF/R. Las muestras D12 y D2 no amplificaron.

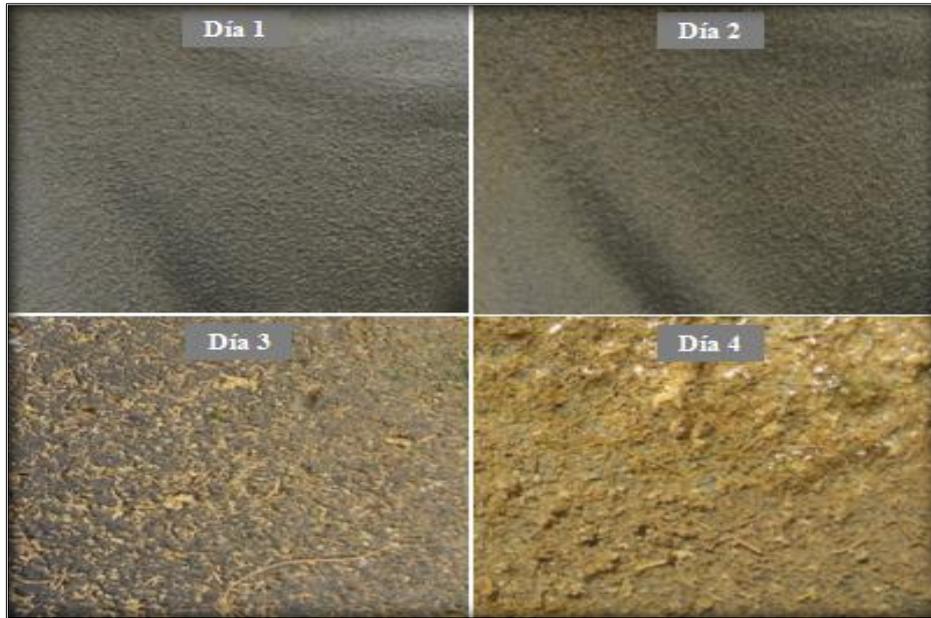


Fig. 69. Evaluación Macroscópica de la Colonización del Geotextil por *Nitzschia* *sp.*

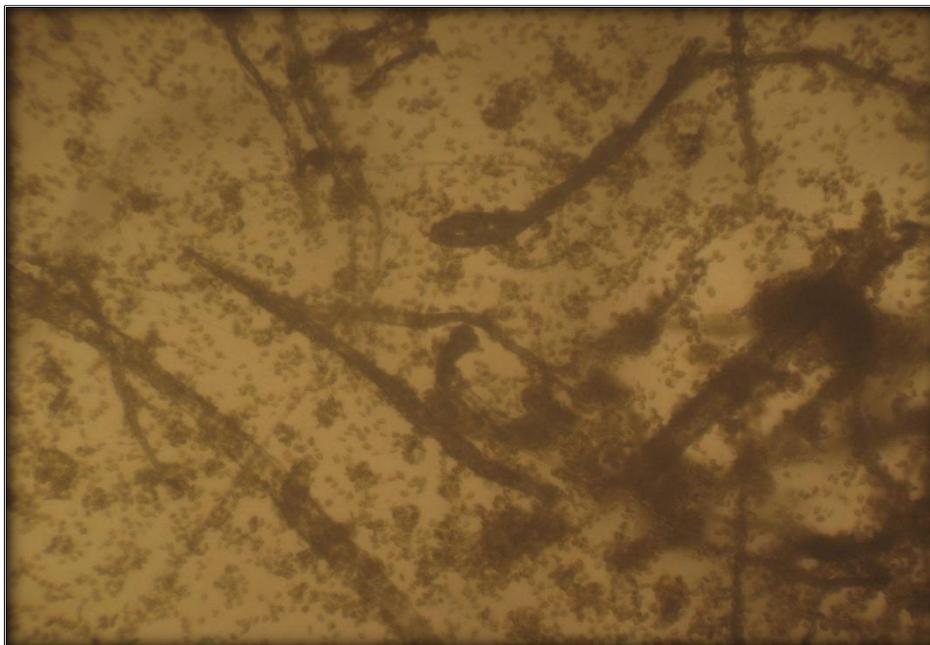


Fig. 70. Evaluación Microscópica de la Colonización del Geotextil por *N. veneta*

Día 1

Día 2

Día 3

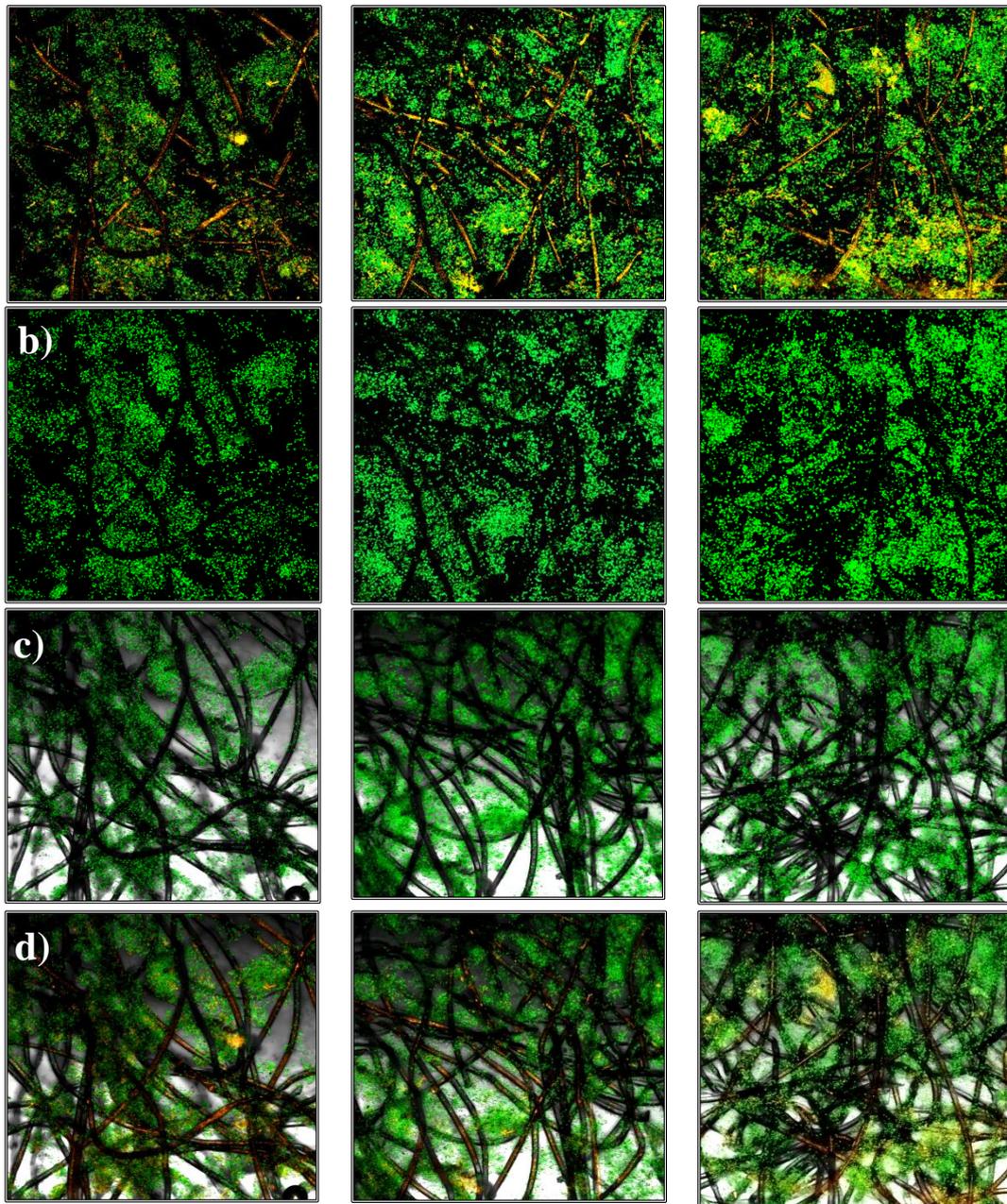


Fig. 71. Dinámica de Colonización de *Amphora salina* durante tres días (10 X).
a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

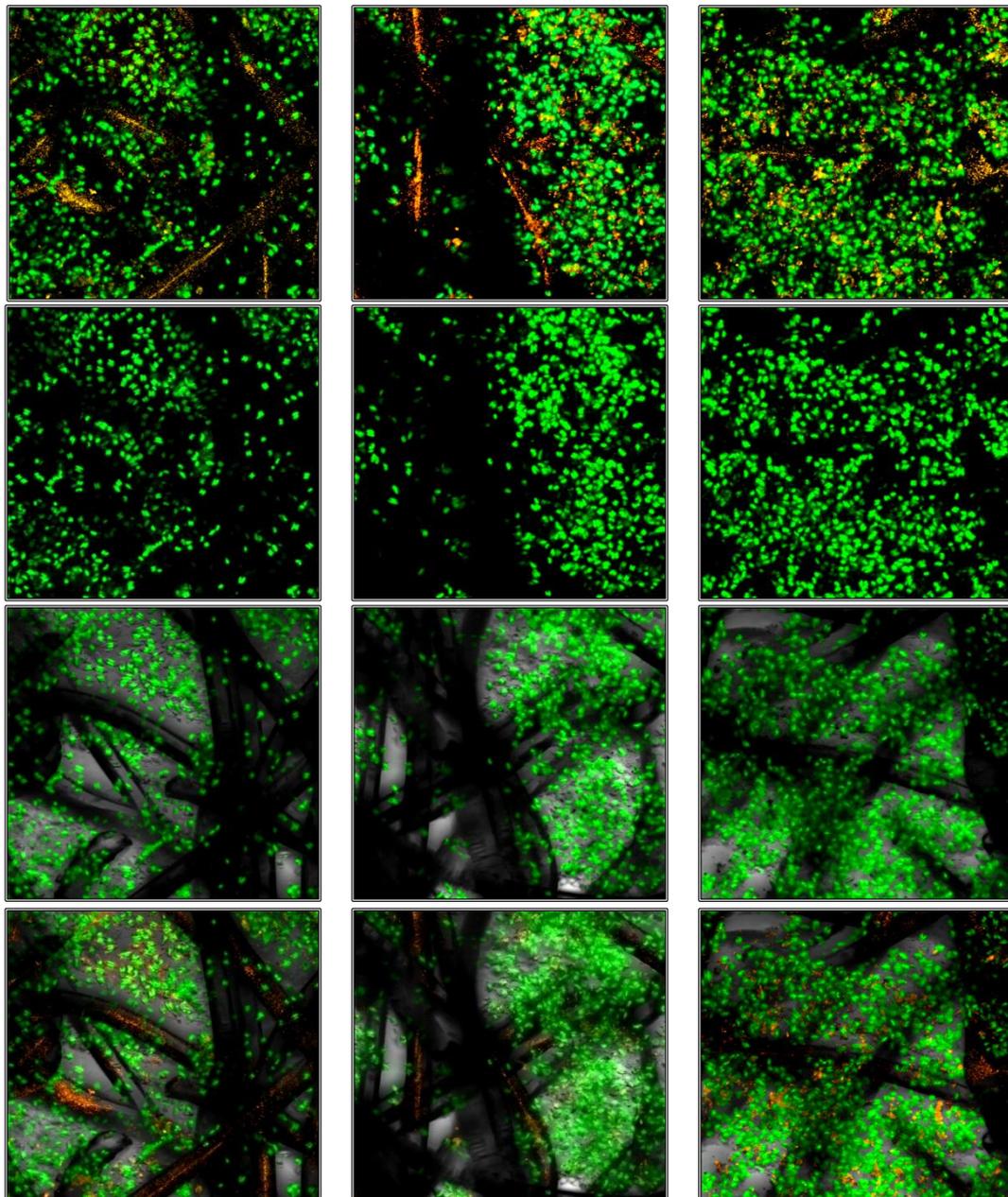


Fig. 72. Dinámica de Colonización de *Amphora salina* durante tres días (40 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

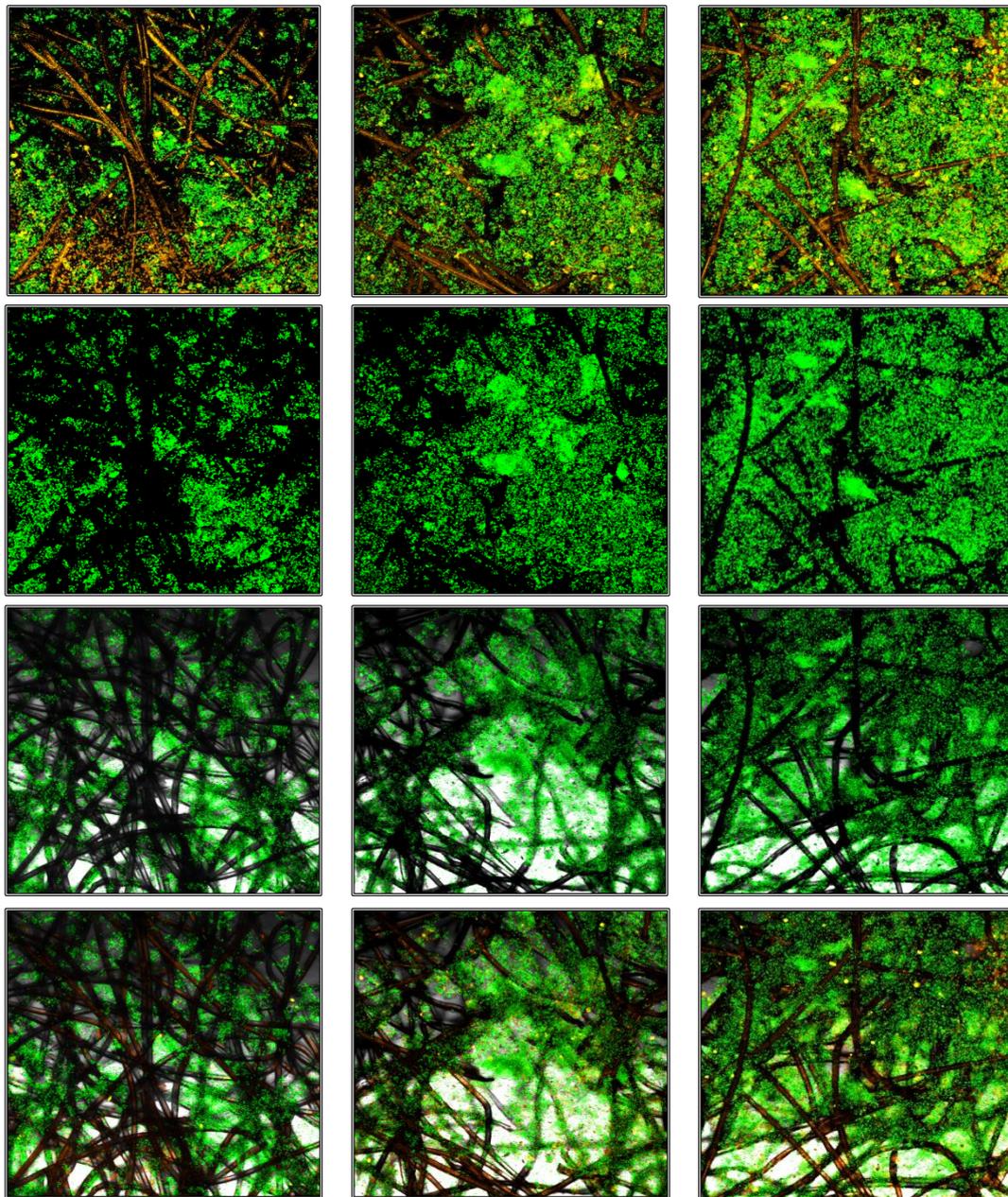


Fig. 73. Dinámica de Colonización de *Amphora sp* durante tres días (10 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

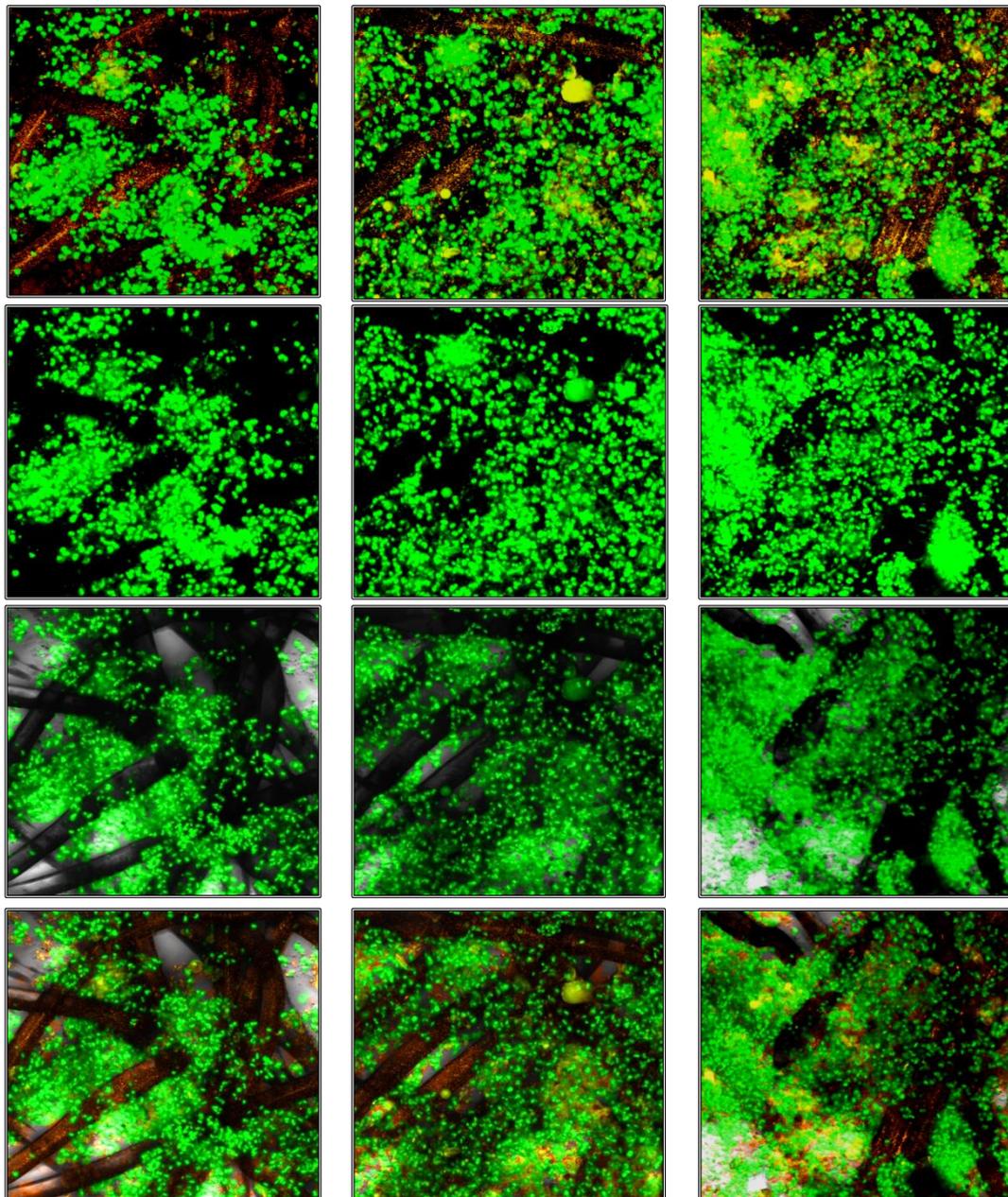


Fig. 74. Dinámica de Colonización de *Amphora sp* durante tres días (40 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

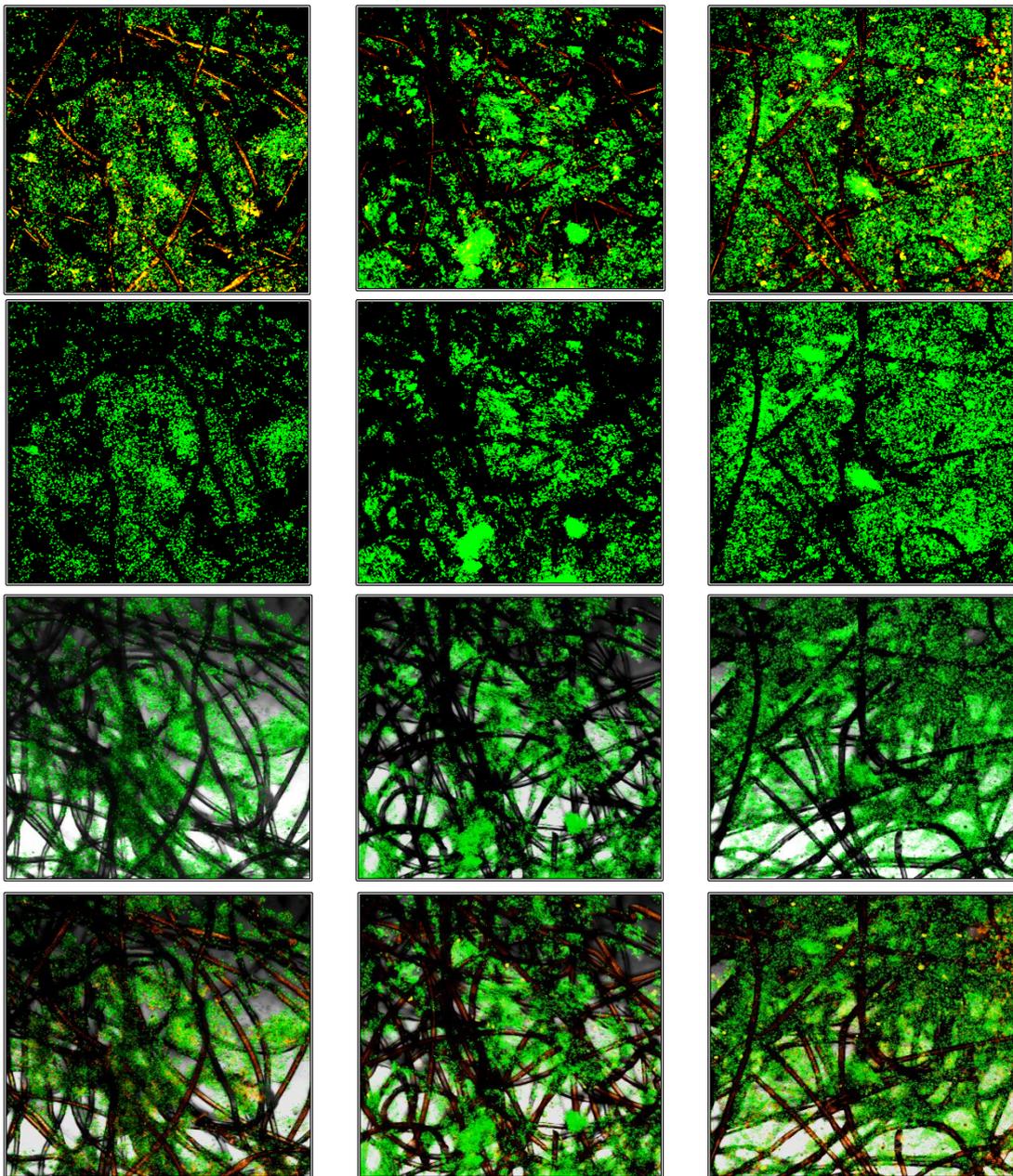


Fig. 75. Dinámica de Colonización de *Nitzschia sp* durante tres días (10 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 2

Día 4

Día 6

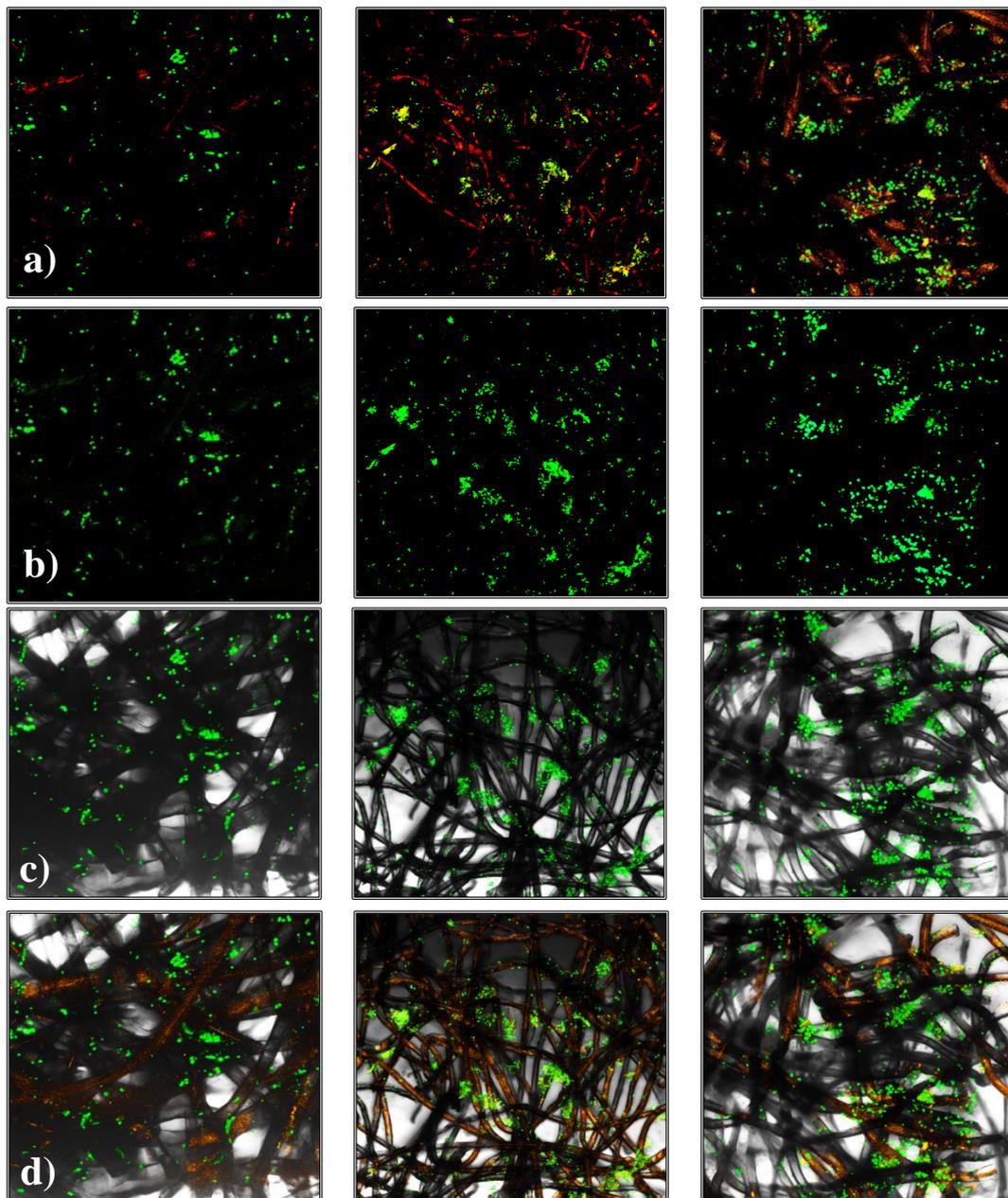


Fig. 76. Dinámica de Colonización de *Navicula veneta* durante seis días (10 X).
a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 2

Día 4

Día 6

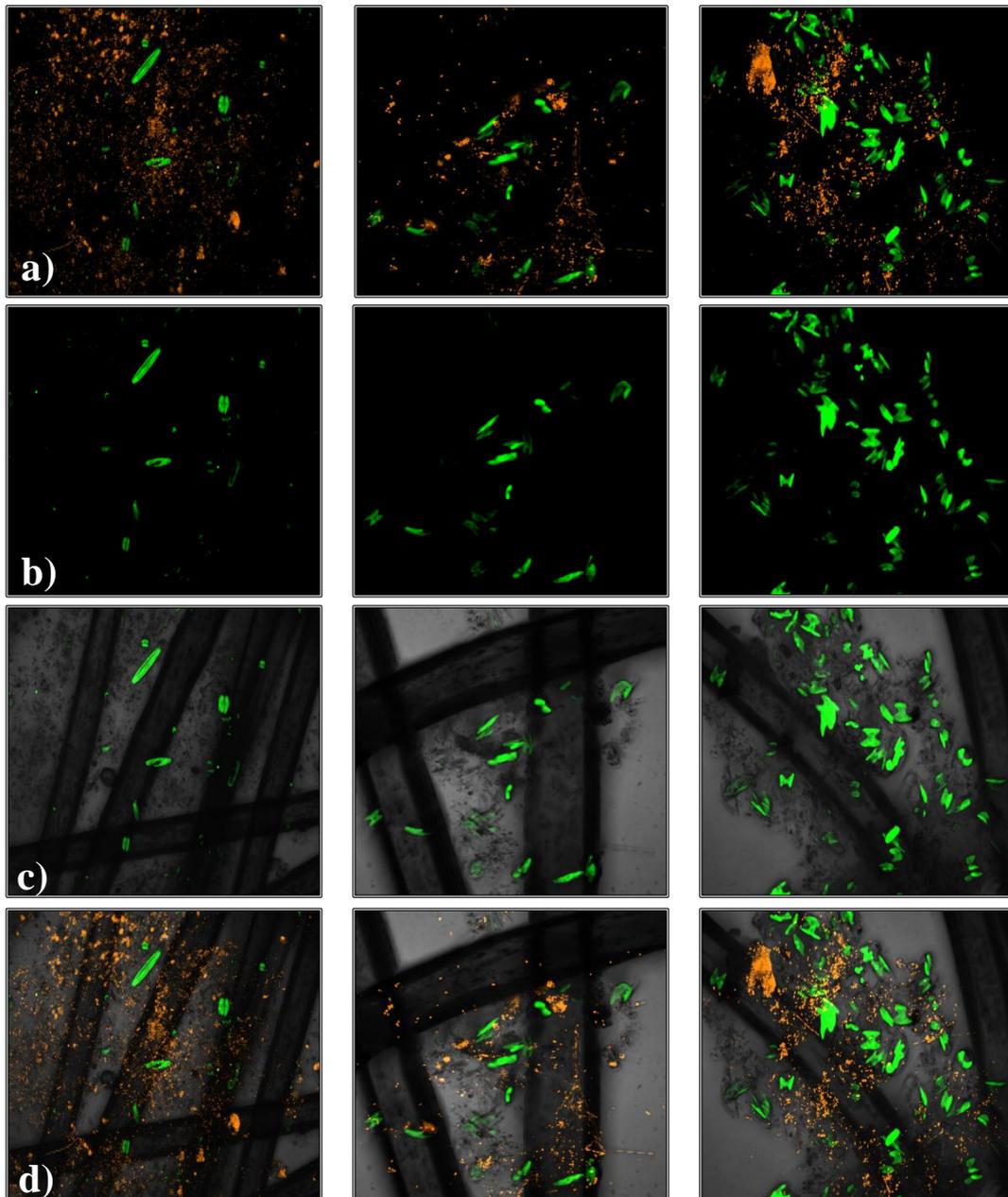


Fig. 77. Dinámica de Colonización de *Navicula veneta* durante seis días (40 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

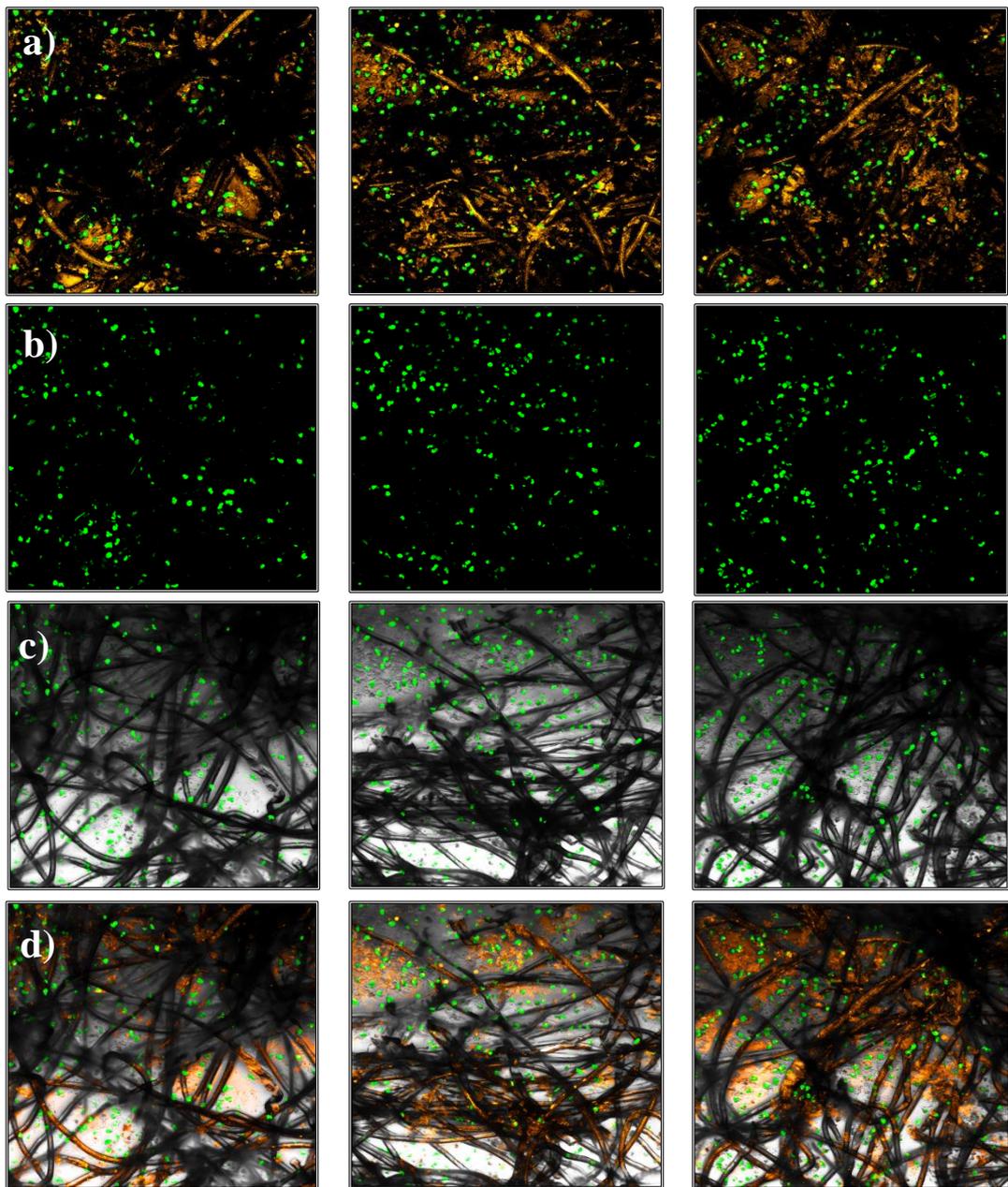


Fig. 78 a. Dinámica de Colonización de *Amphiprora sp* durante seis días (10 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 4

Día 5

Día 6

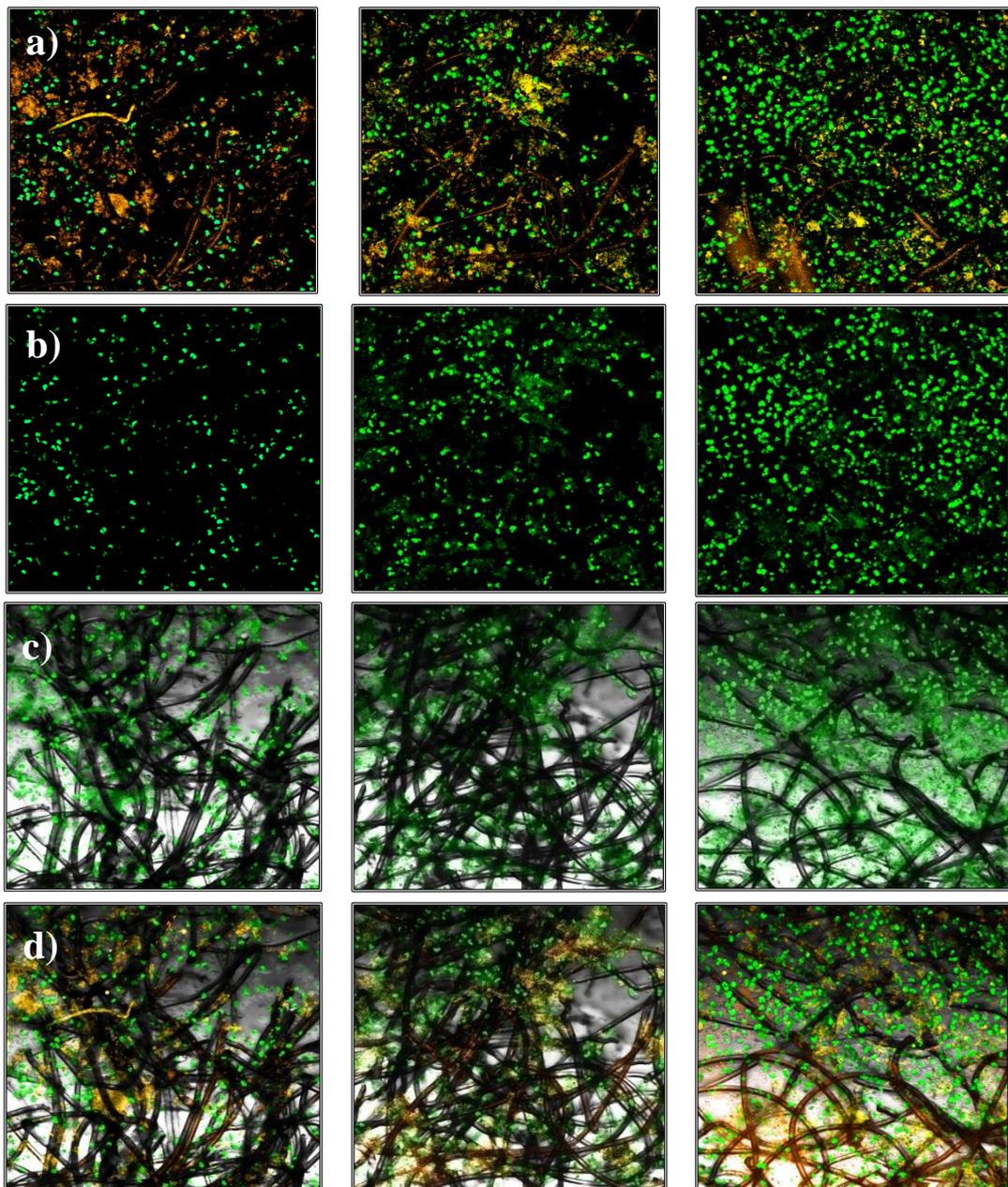


Fig. 78 b. Dinámica de Colonización de *Amphiprora sp* durante seis días (10 X).
a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 1

Día 2

Día 3

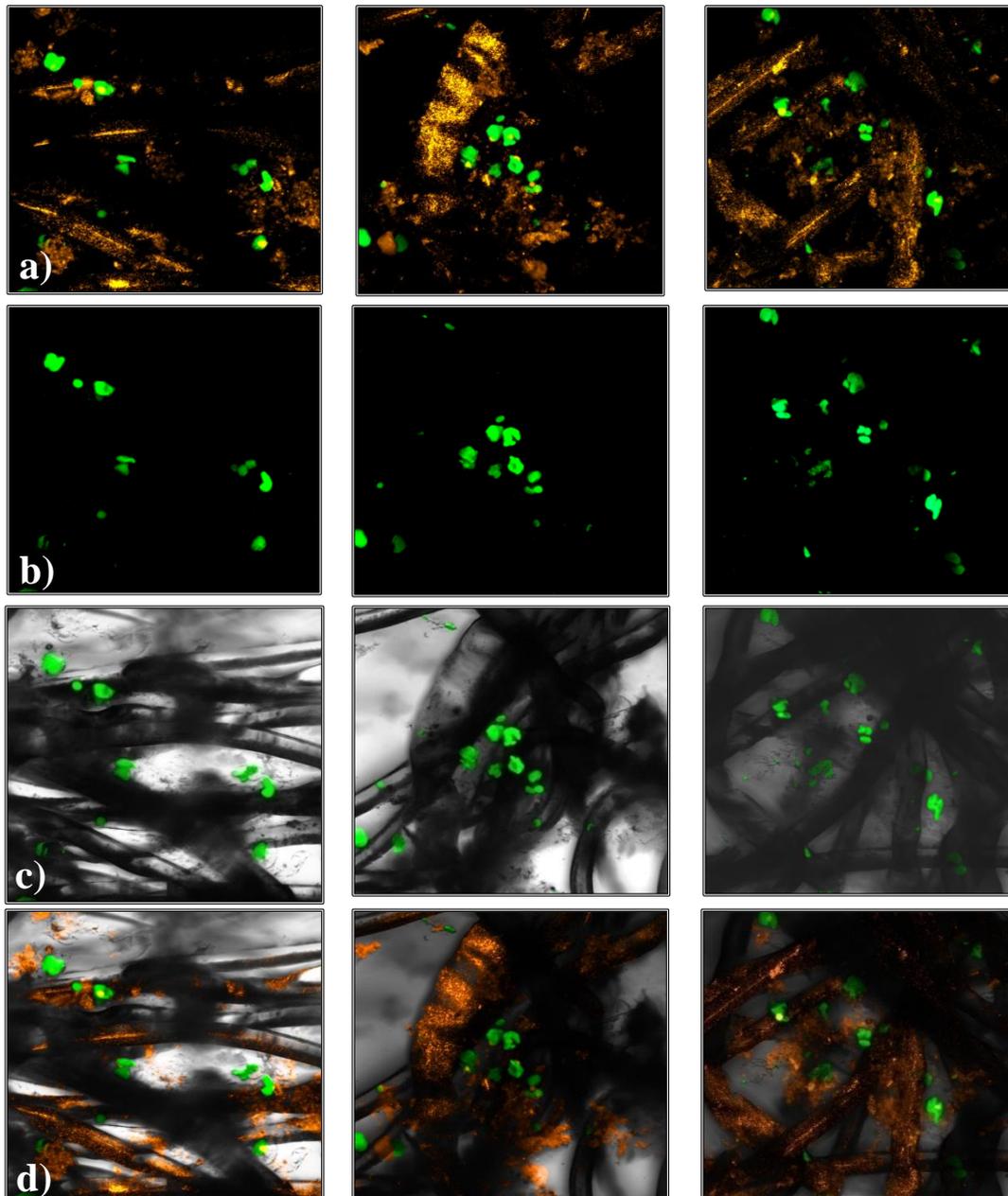


Fig. 79 a. Dinámica de Colonización de *Amphiprora sp* durante seis días (40 X).
a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Día 4

Día 5

Día 6

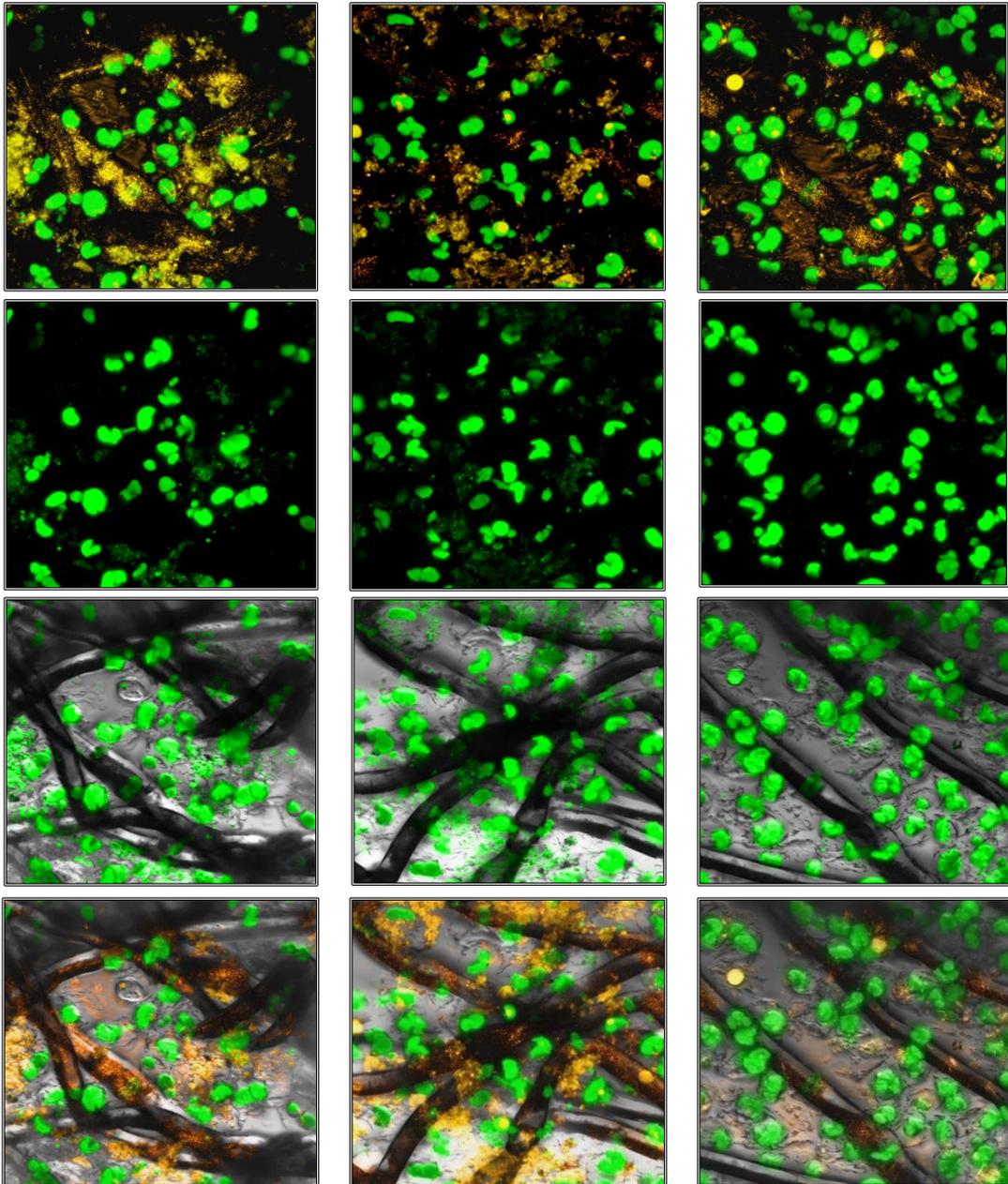


Fig. 79 b. Dinámica de Colonización de *Amphiprora sp* durante seis días (40 X).
 a) Microalgas y Bacterias. b) Microalgas, c) Microalgas y Fibras de Geotextil,
 d) Microalgas, Bacterias y Fibras de Geotextil.

Amphora sp.

Nitzschia sp.

a)

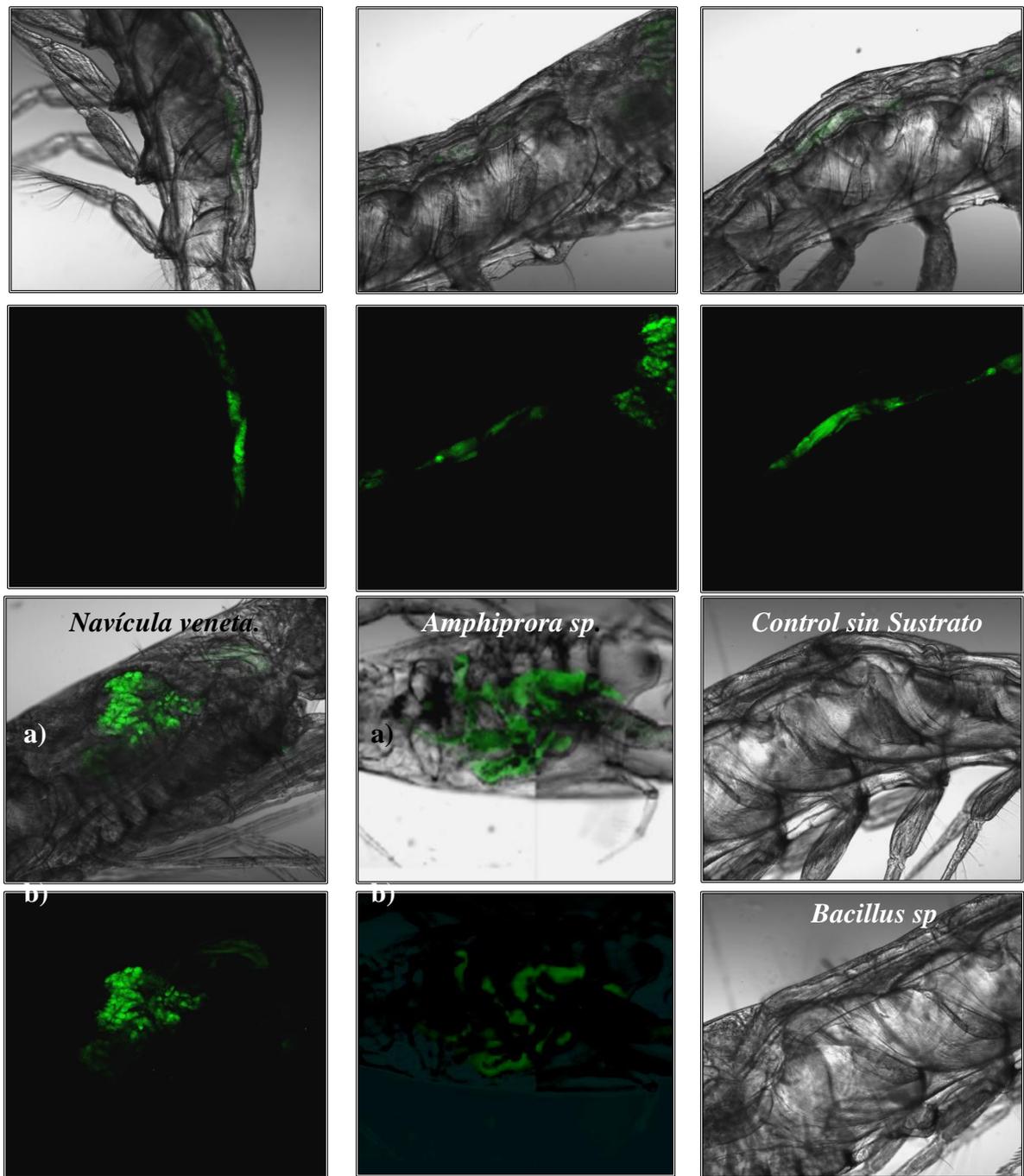


Fig. 80. Evaluación del Consumo de Microalgas por Microscópica Confocal: Observación de Residuos de Clorofila

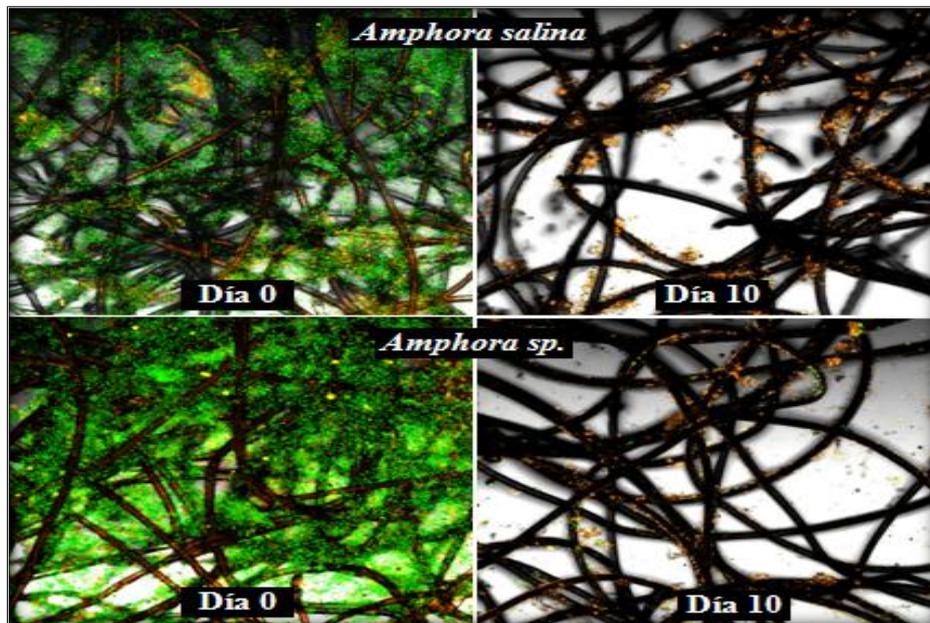


Fig. 81. Evaluación de la presencia de Microalgas (*Amphora salina* y *Amphora sp.*) en el Sustrato al Inicio y al Final de la Experimentación.

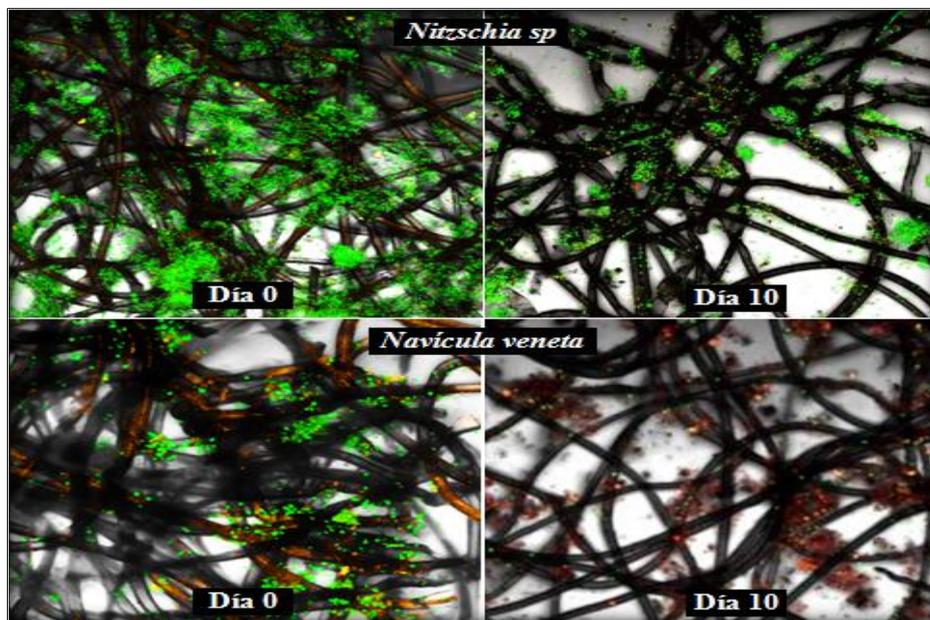


Fig. 82. Evaluación de la presencia de Microalgas (*Nitzschia sp* y *Navícula veneta*) en el Sustrato al Inicio y al Final de la Experimentación.

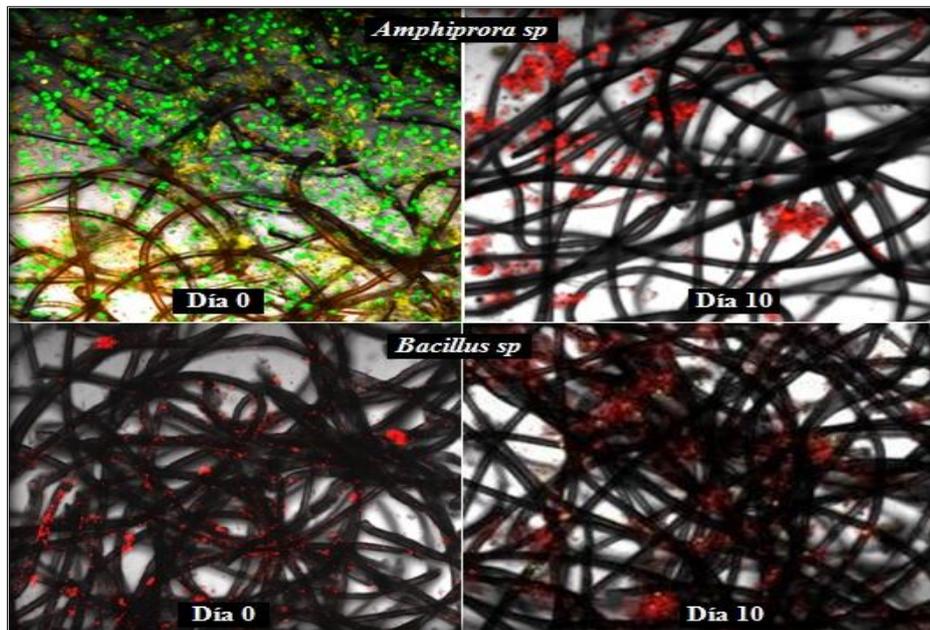


Fig. 83. Evaluación de la presencia de Microalgas y Bacterias (*Amphiprora sp* y *Bacillus sp*) en el Sustrato al Inicio y al Final de la Experimentación.

ANEXOS ESQUEMAS

Extracción de muestras



Tratamiento de muestras

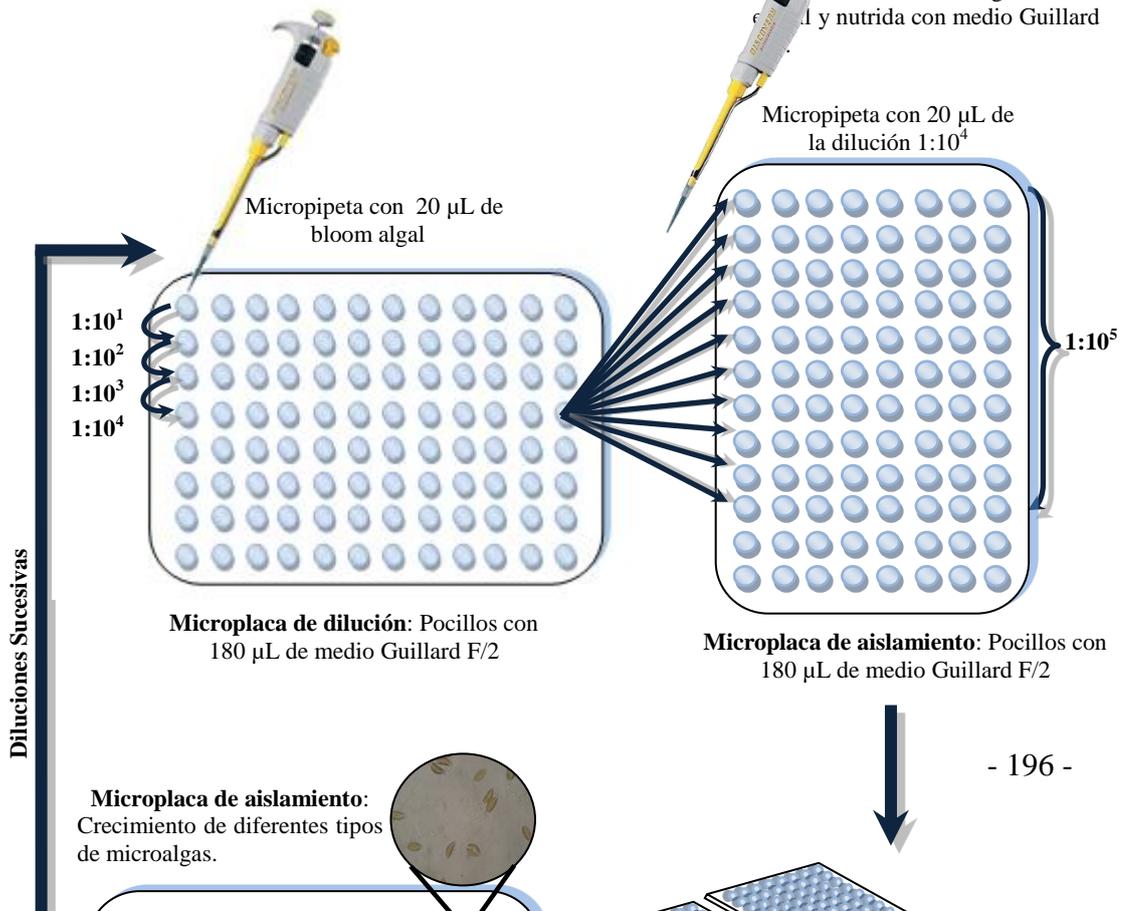


Incubación de muestras

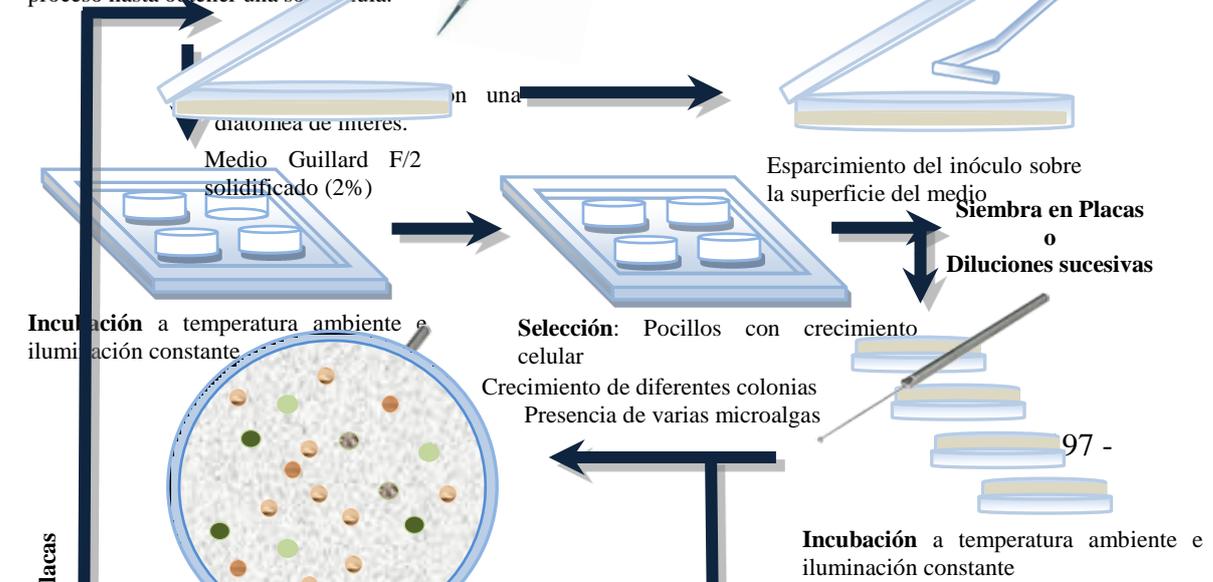
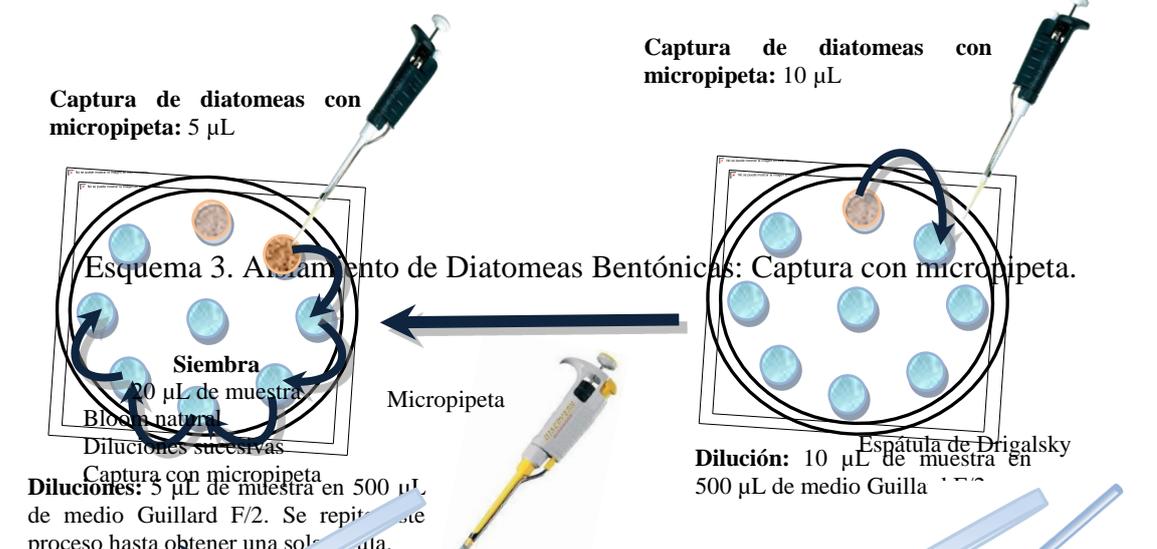
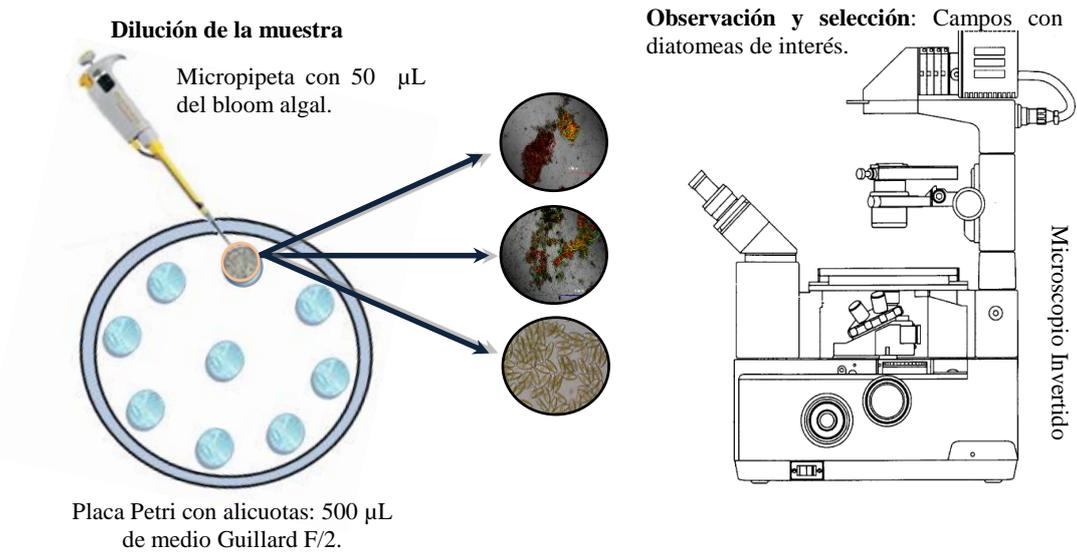


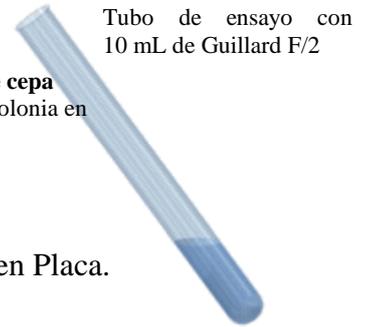
tratamiento de muestras

Medio con 450 mL de agua de mar estéril y nutrida con medio Guillard



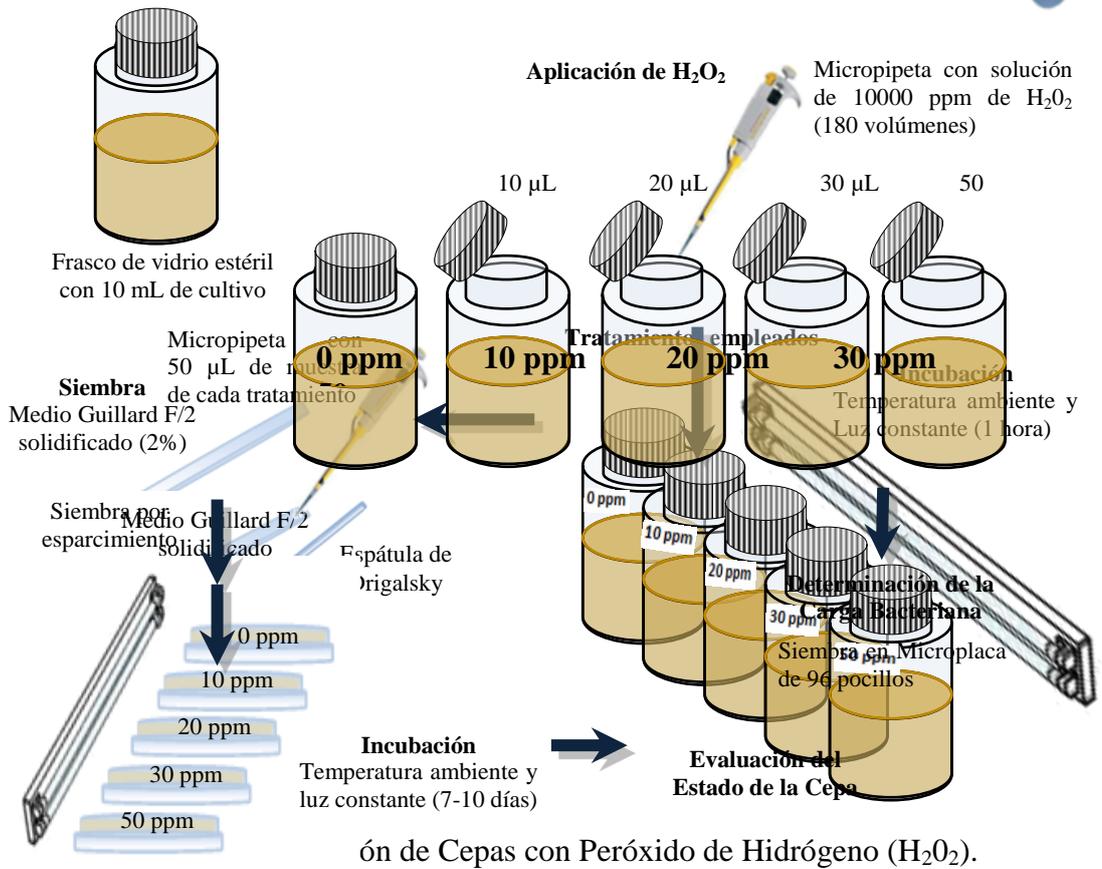
Esquema 2. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas: Diluciones sucesivas.





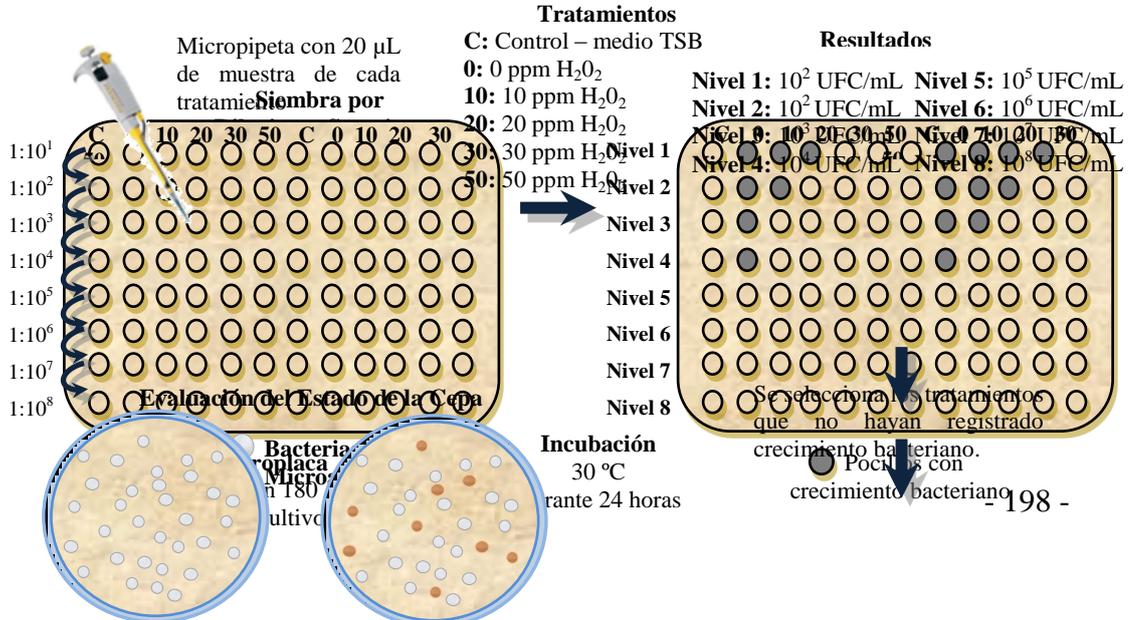
Obtención de cepa
Siembra de una colonia en medio f/2

Esquema 4. Aislamiento de Diatomeas Bentónicas: Siembra en Placa.



Siembra de Cepas con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂).

Determinación de la Carga Bacteriana



1. Crecimiento Bacteriano 2. Mayor crecimiento

Se relaciona si ha afectado o no la viabilidad de la cepa

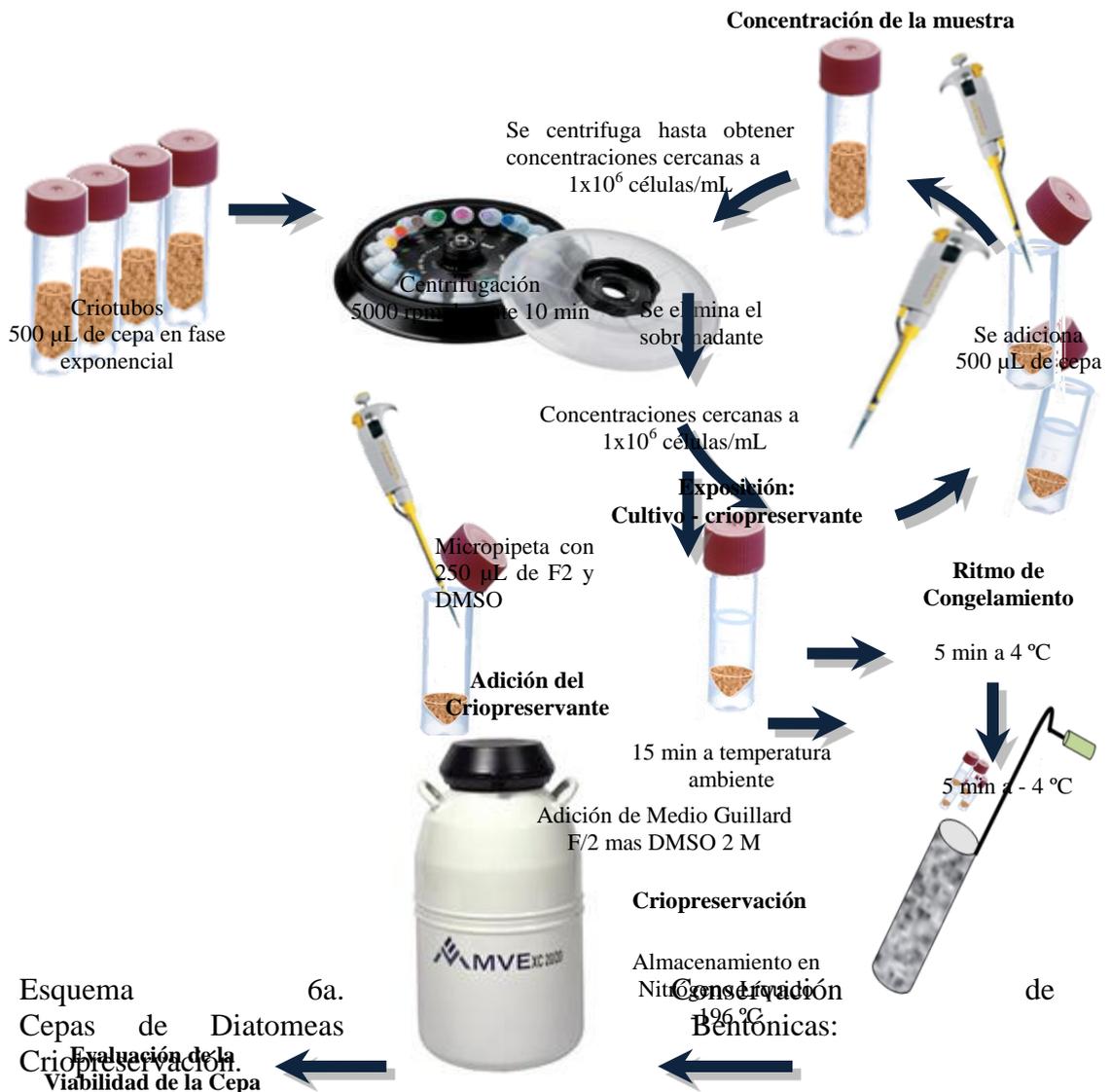
Resultados

1. Viabilidad de la cepa de microalga afectada.
2. Mínima reducción del crecimiento bacteriano
3. Reducción del crecimiento bacteriano
4. Inhibición del crecimiento bacteriano

Resultados Positivos

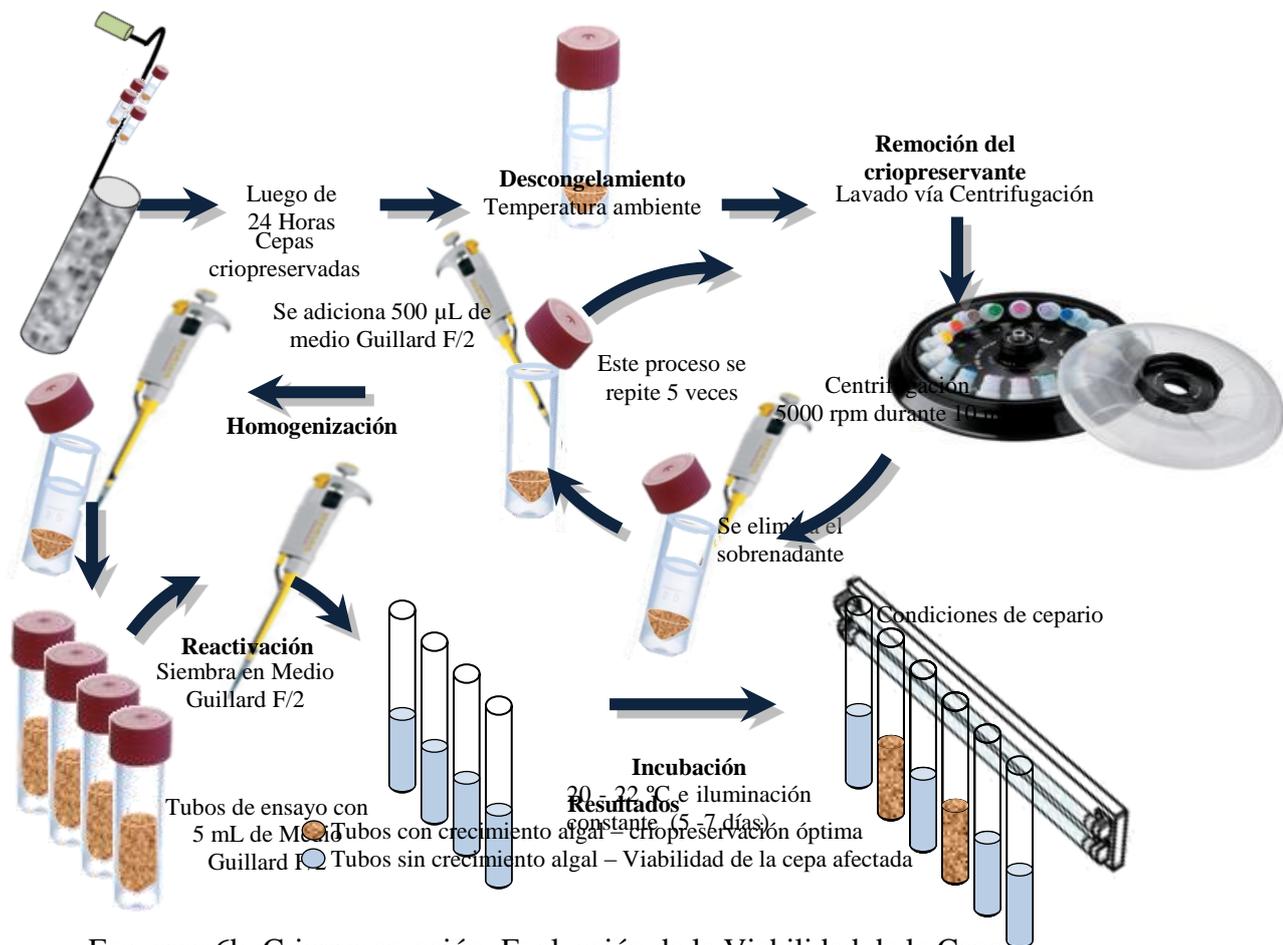
- Obtención de placas 3 y 4.
5. Inhibición del crecimiento bacteriano y microalgal

Esquema 5b. Purificación de Cepas: Determinación de la Carga Bacteriana y Evaluación del Estado de la Cepa de Microalga.

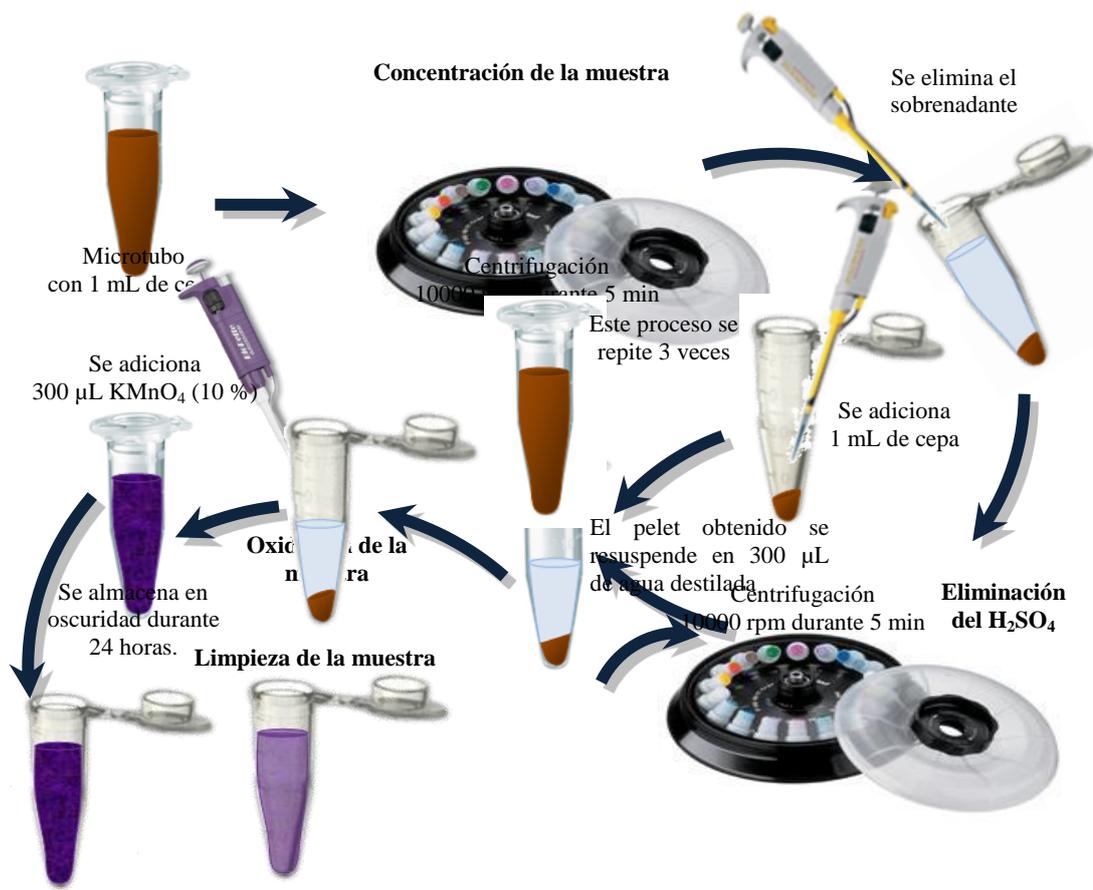


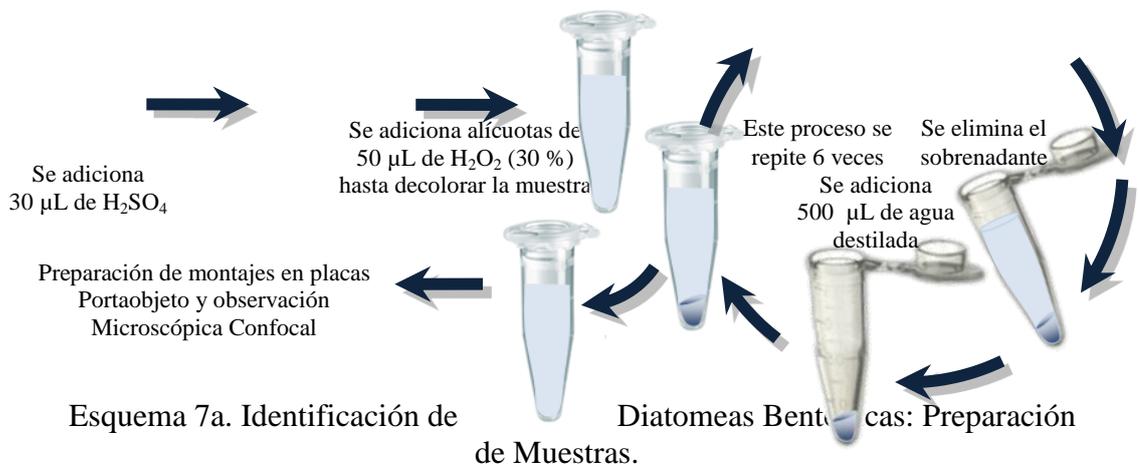
Esquema 6a. Cepas de Diatomeas Criopreservación. Evaluación de la Viabilidad de la Cepa

Evaluación de la Viabilidad de la Cepa



Esquema 6b. Criopreservación: Evaluación de la Viabilidad de la Cepa

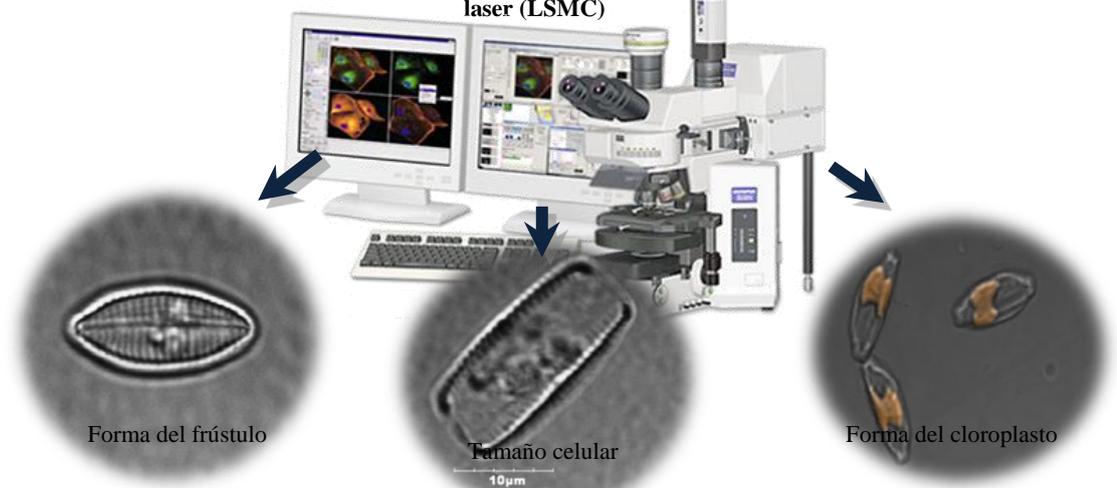




Preparación de Montajes

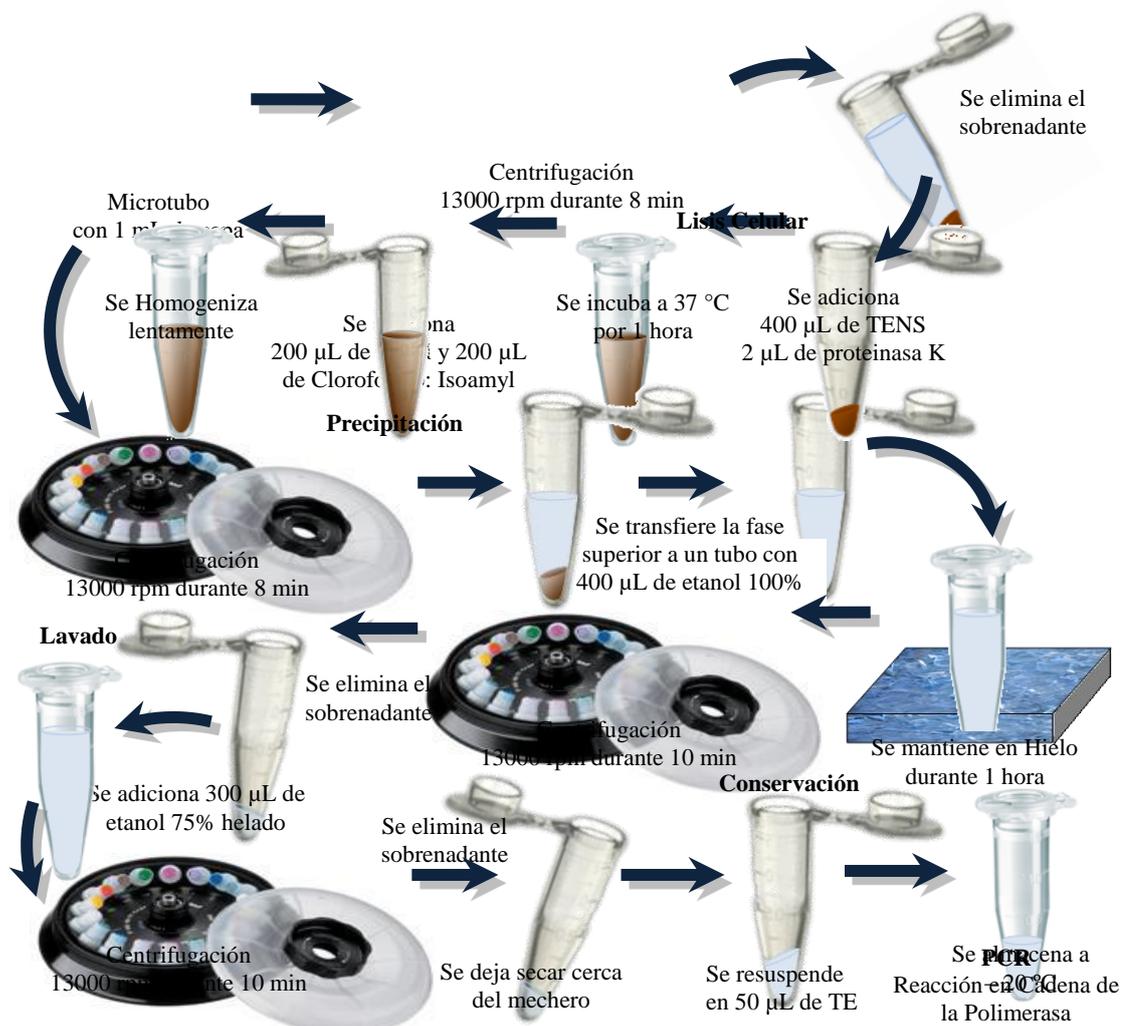


Observación y Análisis: Microscopio confocal a barrido laser (LSMC)

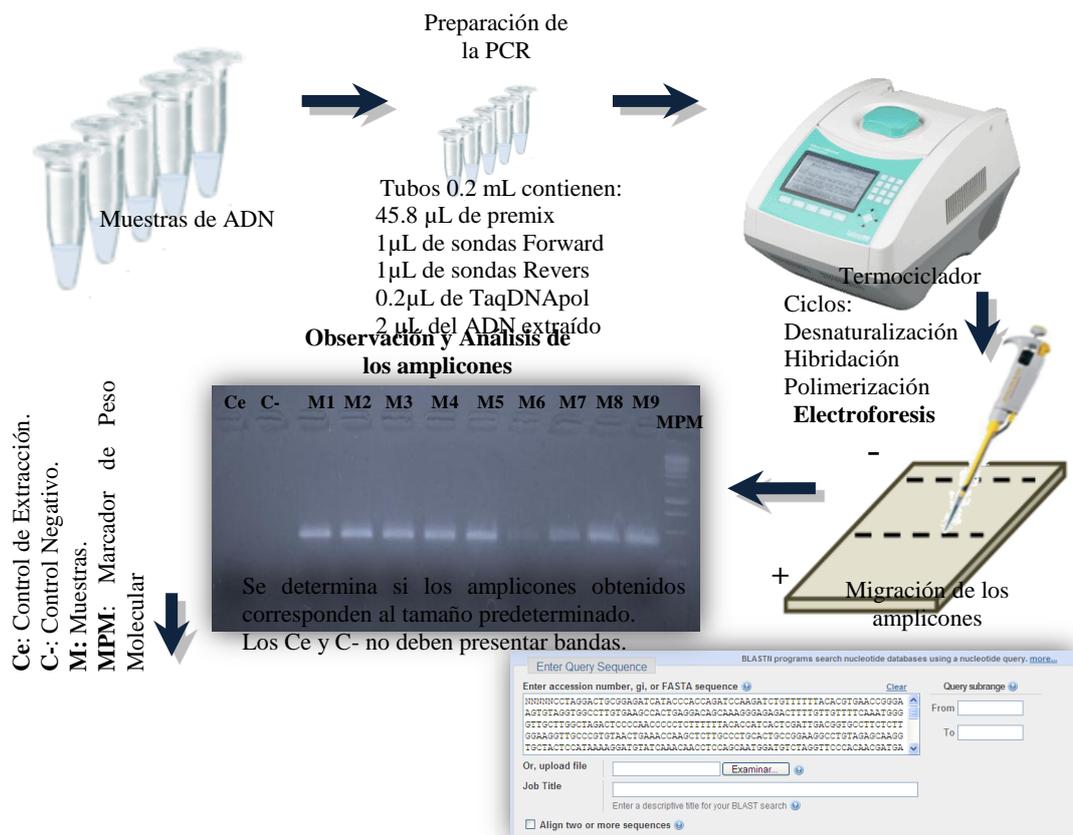


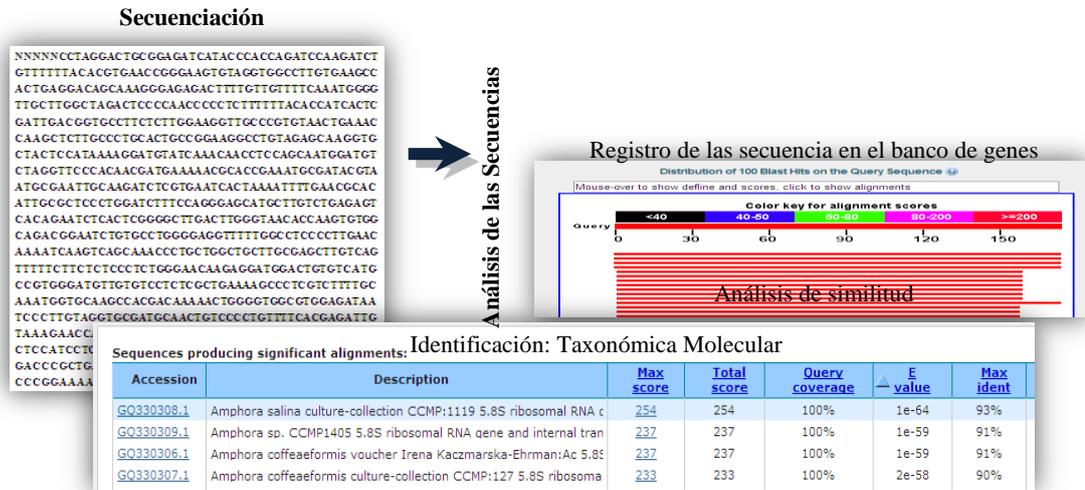
Esquema 7b. Identificación de Diatomeas Bentónicas por Microscopia Confocal.



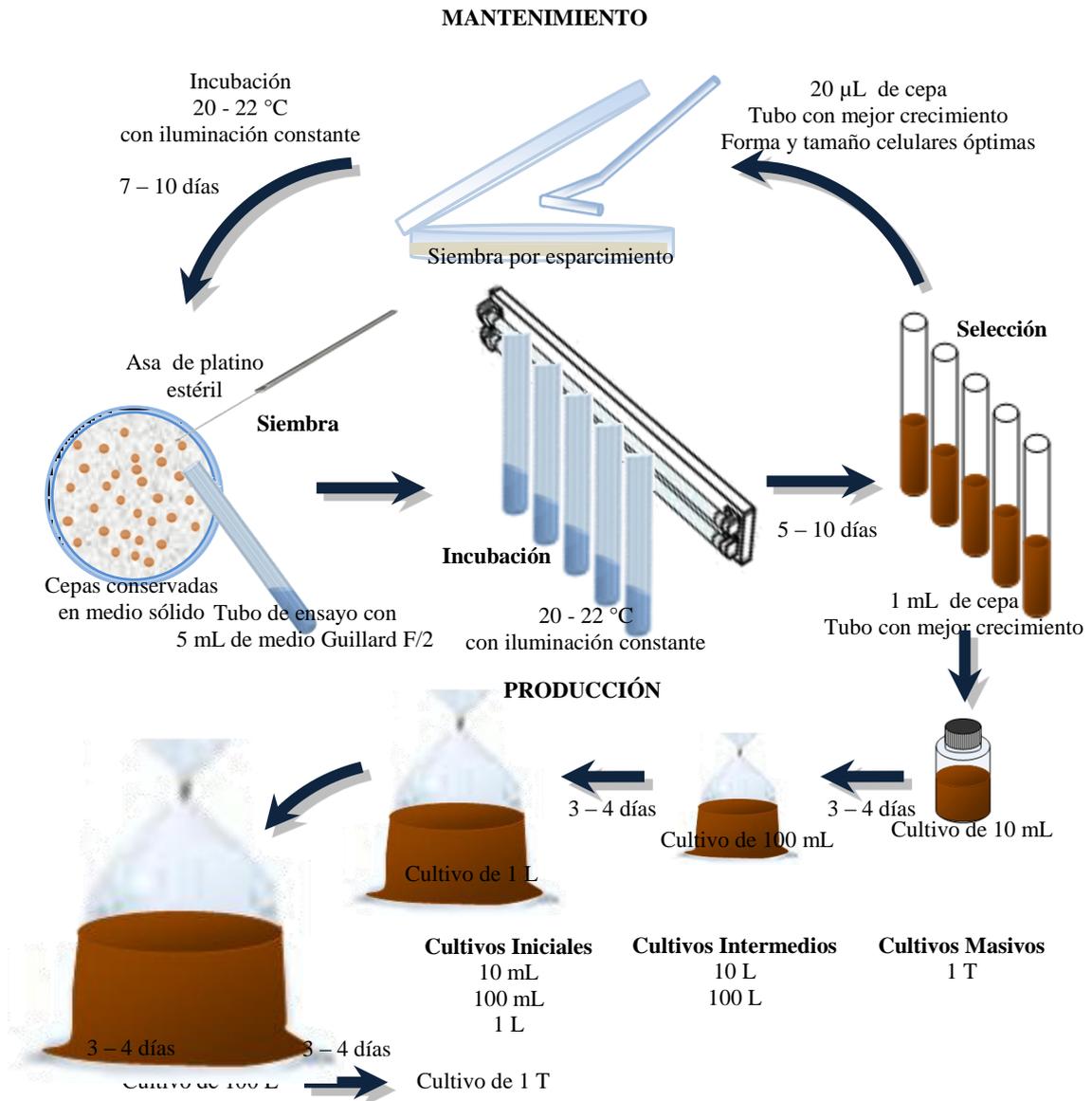


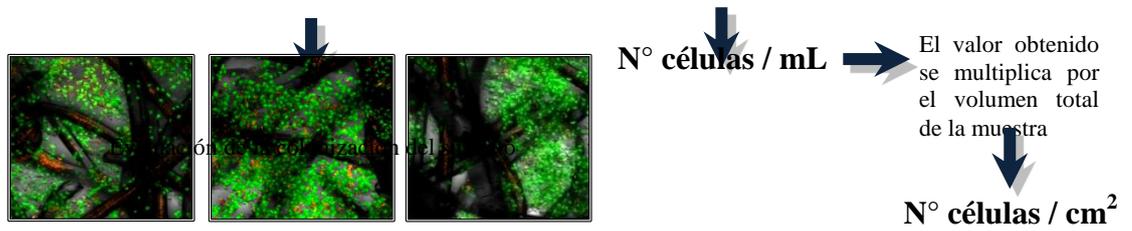
Esquema 8a. Taxonomía Molecular: Extracción de ADN





Esquema 8b. Taxonomía Molecular





Esquema 11. Pruebas de Colonización: Análisis Cuantitativo y Cualitativo