



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



***PRESENCIA DE BACTERIAS EN CINCO NIVELES DE CULTIVO EN TRES
ESPECIES DE MICROALGAS
EN AMBIENTE CONTROLADO***

Tesis para optar al título de Lic. en Biología

Presentado por:

Br. HILDA MARÍA BALMACEDA GONZÁLEZ

Tutor: SALVADOR ORTEGA URROZ MSc.



LEÓN, OCTUBRE 2005

ÍNDICE

Contenido	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	3
III. Marco Teórico	4
3.1 Microalga <i>Chaetoceros graciliis</i>	8
3.1.1 Taxonomía	8
3.1.2 Características Morfológicas	8
3.2 Microalga <i>Navícula sp.</i>	9
3.2.1 Taxonomía	9
3.2.2 Características Morfológicas	9
3.3 Microalga <i>Tetraselmis chuii</i>	10
3.3.1 Taxonomía	10
3.3.2 Características Morfológicas	10
3.3.3 Tipos de Nutrientes Utilizados en los Laboratorios	10
3.4 Condiciones Físicas para el Cultivo	12
3.5 Aireación y Agitación	12
3.6 Iluminación	13
3.7 Medios Enriquecidos	13
3.7.1 Agar McConkey	13
3.7.2 Agar TCBS	15
3.7.3 Agar Cetrimide	16
3.7.4 Agar Nutritivo Standar	17
IV. Materiales Y Métodos	19
V. Resultados Y Discusión	24
5.1 Resultados para <i>Chaetoceros graciliis</i>	24
5.2 Resultados para <i>Navícula sp.</i>	29
5.3 Resultados para <i>Tetraselmis chuii</i>	32
VI. Conclusiones	36
VII. Recomendaciones	37
VIII. Bibliografía	38



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo:

A Dios nuestro creador y padre eterno, que ilumino mi entendimiento y me dio la fuerza de voluntad y fé para lograr la culminación de este trabajo.

A mis queridos padres con todo cariño y respeto que se merecen por su amor, esfuerzo y comprensión, apoyo y paciencia que me han tenido, así como el sacrificio que han realizado para conducirme por el camino del bien y lograr con éxito culminar mis estudios y alcanzar mis metas.

A todas las personas que me brindaron ayuda y servicios que eran necesarios para culminar este trabajo.

A todos los docentes de la facultad de Ciencias de la UNAN-León



AGRADECIMIENTO

Agradezco:

A Dios sobre todas las cosas por ser mi principal guía en el transcurso de mi vida y trabajo.

A mis padres: Sr. Rodolfo Díaz y Sra. Nubia González:

Por el esfuerzo, dedicación y paciencia que han tenido para ver la culminación de este trabajo, así como darme sus votos de confianza.

A mi hija Gabriela Guadalupe por ser el motivo de mi inspiración.

A mi esposo Mario José López por brindarme amorosamente sus votos de confianza.

Al MSc Salvador Ortega por su apoyo incondicional y por el tiempo que me ha dedicado

Y a todo el personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias de la UNAN-

León, que de una u otra forma han contribuido en la culminación de esta monografía.



RESUMEN

La investigación se realizó con tres especies de Microalgas que se utilizan como alimento para larvas de camarón por los Laboratorios marinos: *Chaetoceros gracilis*, *Navicula* sp y *Tetraselmis chuii*, se siguió el protocolo que se utiliza en el área de bacteriología del laboratorio productor de larvas, ubicado en el sector del balneario de Las Peñitas Costa del Océano Pacífico. Se encontraron que las especies de microalgas cultivadas en ambiente controlado tienen una interrelación bacterias-microalgas con las *Aeromonas*, *Vibrios*, *Pseudomonas* y otras bacterias por encontrarse en todos los niveles de cultivo.



I. INTRODUCCION

En Nicaragua en el sector del balneario de Las Peñitas costa del Océano Pacífico se encuentran ubicados Laboratorios Marinos dedicados a la producción de post-larva de camarón con diferentes tecnología, cada uno de ellos tiene una sección de cultivo de microalgas que se utiliza como alimento natural para larvas y postlarvas que producen estos laboratorios, a la fecha en Nicaragua no se ha reportado ningún estudio que este relacionado con la presencia de bacterias marinas en los diferentes niveles de cultivos de las microalgas y que puedan ser afectadas o puedan convivir durante la producción.

El estudio de la presencia de microorganismos ajenos a la producción en los Laboratorios Marinos en ambiente controlado, es considerado como punto crítico de contaminación para el cultivo de camarones, por la presencia de bacterias en los cultivos de microalgas, ya que los estadios larvales y postlarvales de camarones las requieren como alimento fundamental para su desarrollo.

El conocimiento de la interacción bacterias–microalgas es de gran importancia por ser componentes básicos del ecosistema al ser recicladores de la materia orgánica y por tener la capacidad de absorber nutrientes (Azan et al 1983) y hacer circular estas fuentes de carbono, mediante diversas interacciones ecológicas. La visión que se tiene de estas relaciones en el aspecto productivo de organismos cultivados es de solo presentar aspectos negativos, sin esperar que los problemas que se presentan, tengan un origen por diferentes



vías: manipulación inadecuada de las microalgas, cristalería no esterilizada y por visitas de personas ajenas al sector de trabajo.

El propósito del estudio, es conocer mediante diferentes medios enriquecidos de cultivo detectar la presencia de bacterias en el cultivo de microalgas cultivadas en ambiente controlado, las que sirven de alimento a camarones en los diferentes estadios larvales y post-larvas. El estudio se realizó en el laboratorio marino LARVINIC. S A.

La información que se pretende dar en el estudio, son los elementos básico que se obtienen de las muestras microbiológicas que se realizaron en el laboratorio marino.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Contribuir al conocimiento de la presencia de bacterias en los cinco niveles de cultivo que se realizan en los Laboratorios Marinos de las especies *Chaertoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii*, *Navicula sp.*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Determinar mediante el uso de cuatro medios enriquecidos la presencia de bacterias en los cinco niveles de cultivos de microalgas en ambiente controlado.
- ❖ Conocer que tipo de bacterias se presentan en las tres especies de microalgas cultivadas, siguiendo el protocolo que utilizan en el Laboratorio Marino
- ❖ Identificar en que nivel de cultivo de las microalgas se encuentra mayoritariamente la presencia de bacterias.



III. MARCO TEORICO

El fitopláncton se encuentra constituido por cianobacterias y algas eucarióticas, las cuales se extienden por todos los océanos. En el medio natural este fitopláncton no se encuentra solo, sino que está interactuando con otros organismos como: zooplancton, bacterias, y virus, estos últimos son los principales responsables del decaimiento de un **bloon** fitoplanctónico en aguas costeras.(Turutani et al 2000) al analizar las fluctuaciones de la abundancia de partículas virales durante un bloom de fitoplancton, detectaron un rápido incremento de la abundancia de partículas virales después de la abundancia de bacterias.

En el caso de los componentes bacterianos, la capacidad de provocar la inhibición y lisis de las células algales ha sido extensamente estudiada en aguas costeras, determinándose que las bacterias y sus productos extracelulares son un factor clave para el rápido decaimiento de floraciones de fitoplancton (Bratbak et al. 1990).

En el mundo se han realizado estudios diversos relacionados con las bacterias y el fitopláncton en ambientes marinos, dulceacuícolas y sistemas de cultivos, en general se acepta que uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento de los componentes bacterianos en el ecosistema acuático es la producción primaria, debido a que los productos extracelulares del fitoplancton estimulan la proliferación de bacterias (Bird & Kalff, 1984).

Riquelme et al. 1987; a puesto en evidencia que la presencia de bacterias ocurre solo después de la máxima producción de fitoplancton sugiriendo que este aumento bacteriano



se produce por la utilización de fitoplancton muerto y detritus es de considerar las interrelaciones microbianas en los ecosistemas acuáticos que los componentes del fitopláncton influyen la bacterioflora asociada.

Estudios desarrollados por investigadores japoneses, han permitido conocer que las interacciones bacteria-microalga son altamente específicas,(Fukami et al. 1992) detectaron una bacteria del género *Flavobacterium* aislada del agua de mar, inhibe específicamente el crecimiento de una microalga. Esta cepa se incorporó en cultivo de dinoflagelados *Gynodinium nagasakiense* y la diatomea *Chattonella antiqua*, detectándose efectos deletéreos solo en el dinoflagelado, el cual fue atribuido a los productos celulares liberados por las bacterias. Lo anterior permite sugerir que diversas bacterias podrían actuar como alguicidas o inhibidores del crecimiento microalgal.

Viso et al. 1987; Pesando 1990. Describieron efectos antibacterianos producidos por algunas clase de microalgas y principalmente diatomeas, las cuales son el mayor constituyente del fitoplancton. *Tetraselmis* ha sido extensamente descrita como una microalga con capacidad inhibitoria de bacterias, fenómeno considerado como natural. Similares propiedades antibacterianas han sido descritas en cultivos de microalgas de *Skeletonema costatum*

Estudios realizados con extractos de *Tetraselmis suecica*, indican que la reproducción de exudados microalgales inhiben el crecimiento de diversas bacterias patógenas en cultivos de peces (Austin et al. 1992). El mismo grupo de investigadores señalan que la misma microalga afecta las comunidades bacterianas asociadas a alimento vivo.



Irianto & Austin 2002. Describen que los monocultivos de microalgas de *Piravinosa virginica*, *Phytomonas sp*, *Tetraselmis chuii* y *Pseudoisocrchysis paradoxa*, presentan asociadas en su bacterioflora un 30% de cepas productoras de sustancias bacterianas, esta asociación permitiría tener un bajo nivel bacteriano en sistemas de cultivos de organismos marinos, previniendo algunas enfermedades y además brindar algunos requerimientos nutricionales necesarios.

En cultivo de *Artemia franciscana*, organismos utilizados como alimento para peces en acuicultura, ha sido demostrado que la adición de *Tetraselmis sp* durante dos días reduce y modifica la carga bacteriana asociada al crustáceo (Olsen et al. 2000).

Otro ejemplo de la utilización de microalgas para controlar mortalidades larvales es el empleo de aguas verdes, el cual ha sido utilizado en el cultivo de camarones para prevenir enfermedades causadas por bacterias luminosas como *Vibrio harveyi* (Corre et al. 2000)

Rico-Mora & Voltolina 1995. Reportaron que la actividad antibiótica y bacteriostática de *Skeletonema Costatum* sobre bacterias presentes en el cultivo, es provocado por otras dos bacterias asociadas a la microalga, siendo identificadas como *Aeromonas sp* y *Flavobacterium sp*, Probablemente interacciones de este tipo podrían constituirse en una estrategia para mantener un bajo crecimiento bacteriano en los cultivos microalgales. Posteriormente los mismos autores corroboraron las propiedades antibacterianas de una de las bacterias contra el patógeno *Vibrio alginolyticus*, señalando que la eliminación de este se debe a un mecanismo de exclusión competitiva.(Rico-Mora & Voltolina 1998)



Las microalgas juegan un papel importante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos cultivados, siendo altamente nutritivas y fácil de ingerir debido al tamaño que poseen (Brown et al. 1997).

En los sistemas de producción acuícola es imposible trabajar con cultivos microalgales axénicos, debido a que las células de microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano, de esta forma el alimento utilizado en los sistemas de cultivos es mixto y está compuesto por una especie de microalga y una o varias bacterias asociadas, dependiendo de la especie de microalga cultivada (Munro et al. 1995).

En los Laboratorios Marinos ubicados en el sector del Balneario de las Peñitas en Nicaragua, se cultivan para la producción de larvas y postlarvas de camarón de la especie *Litopenaeus vananmei* como alimento las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Navícula Sp*, y *Tetraselmis Chuii*.

En los laboratorios marinos del mundo hay muchas especies de *Chaetoceros* disponible como comida para los estadíos larvales de los camarones peneidos.



3.1 Microalga *Chaetoceros gracilis*

3.1.1 Taxonomía:

División:	Chrysophyta
Clase:	Bacillariophyceae
Orden:	Centrales
Fam:	Chaetoceraceae
Género:	Chaetoceros
Especie:	<i>Chaetocero gracilis</i>

3.1.2 Características morfológicas:

Chaetoceros gracilis: es una diatomea marina céntrica de vida solitaria. tiene un esqueleto cilicio compuesto de dos valvas, las cuales se separan par formar dos células nuevas durante la división vegetativa. Es de forma rectangular mide de 4 a 6 micrómetros sin incluir las setas. Las células son de color café dorado bajo el microscopio, cuando se cultivan en altas densidades su concentración determina el color el que varia de un amarillento dorado en baja densidad, a un color café – marrón en densidades alta, por encima de 3 millones de células por mililitros.

La mayoría de las Chaetoceros están caracterizadas por su tolerancia a las altas temperaturas, la máxima para Chaetoceros gracilis es de 37 °C, con un crecimiento optimo de temperaturas en un rango entre 25 °C y 30 °C, el cultivo masivo de esta especie es generalmente llevada acabo dentro de un rango especifico. La salinidad máxima para su crecimiento es de 6 %, pero puede crecer bien en salinidades hasta de 50%1, en los



laboratorios el porcentaje de crecimiento de Chaetoceros es menor bajo una iluminación de 500 a 10.000 Lux.

3.2 Microalga *Navicula Sp.*

3.2.1 Taxonomía:

División: Chrysophyta
Clase: Bacillariophyceae
Orden: Pennales
Familia: Naviculaceae
Género: Navicula
Especie: *Navicula spp.*

3.2.1 Características morfológicas:

Navicula Sp. es una diátomea con valvas elípticas con un nódulo central pequeño, el rafe formado por una depresión fuerte, la superficie valvar presenta costas, con una salinidad de 25 a 32 %.

3.3 Microalga *Tetraselmis Chuii*

3.3.1 Taxonomía:

División: Chlorophyta
Clase: Prasinophyceae
Orden: Volvocales
Familia: Tetraselmisaceae
Genero: Tetraselmis
Especie: *Tetraselmis chuii*



(Hernández M, J. Áreas. 2000)

3.3.2 Características morfológicas:

Tetraselmis Chuii: es considerada por algunos cultivadores como la microalga menos nutritiva y un poco grande para ser ingeridos por las etapas tempranas de las larvas. Como características relevantes, es un flagelado verde de forma ovalada capaz de moverse por sí misma por medio del flagelo, mide de 10 a 15 micrómetros de diámetros, cuando es cultivada a medida que la concentración de células se incrementa, el color verde se oscurece hasta que alcanza una densidad máxima de aproximadamente 500,000 células por mililitros, los cultivos en masa de *Tetraselmis* crecen en el medio natural a temperaturas de 15 °C a una salinidad entre 15 a 36 % y en agua de mar artificial entre 22 a 36 %. la *Tetraselmis chuii* tiene una tendencia a depositarse en el fondo del recipientes cuando no es airada, igual sucede cuando el cultivo se contamina. (Hernández M, J. Áreas. 2000)

3.3.3. Tipos de Nutrientes utilizados en los Laboratorios

Los laboratorios marinos en el mundo utilizan medios de cultivos enriquecidos para mantener una población de microalgas deseable para la alimentación de camarones en cultivo, todo esta en dependencia de la metodología utilizada por cada centro productivo, pero en la generalidad se usan los siguientes tipos de nutrientes.



Tabla. N. 1 Nutrientes para enriquecer agua filtrada para cultivo de microalgas.

Tipos de nutrientes	Dilución
Nitrato de sodio	450g /l.
Fosfato de sodio	36g /l.
Silicato de sodio	20g /l.
Cloruro férrico	15g /l.
Edta	0.5g/l.
Vitaminas (stok madre 3 litros)	12m/l.
Metales (stok madre 3 litros)	12m/l.

Tabla. N. 2 Cantidad de nutrientes por mililitro de agua para cada nivel de cultivo de microalgas.

	Vasos	Bolsas	Cilindros	Masivos	Piscinas
Nitrato de sodio	0.5ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Fosfato de sodio	0.5ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Silicato de sodio	0.5ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Cloruro ferrico	0.5ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Edta	0.5ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Vitamina	12ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml
Metales	12ml	3.0ml	50ml	800ml	300ml

Todos los componentes nutricionales que se utilizan para el cultivo de microalgas son diluidos en agua salada, exceptuando el meta silicato de sodio que se prepara con agua



desionizada y esterilizada, para la microalga del genero Tetraselmis no se aplica silicato.

3.4 Condiciones físicas para el cultivo de microalga en ambiente controlado.

La mayoría de las microalgas que se cultivan en los Laboratorios Marinos en ambiente controlado crecen a temperatura de 18°C, esta condición ambiental generalmente se presenta al amanecer, la temperatura a las 11: am sube hasta 24°C y entre las 12 : m y 2:00 pm se encuentra a 28 °C. La intensidad de calor es producida por las lámparas flourecentes utilizadas, para regular la temperatura se utilizan aparatos de aire frío. La temperatura óptima en este ambiente controlado debe estar en un rango entre 18 °C y 22 °C por debajo de este intervalo el crecimiento del cultivo disminuye generalmente.

3.5 AIREACIÓN Y AGITACIÓN:

En los cultivos de microalgas en volúmenes pequeños (1 - 21 ml) generalmente se agita diariamente el frasco de manera manual.

En cultivos de mediano o gran volumen se aplica aireación leve durante dos días después de la inoculación, se incrementa la aireación al aumentar el volumen y la densidad del cultivo.

Al proporcionar aire a los cultivos de botella, vasos, bolsas, cilindros y masivo se logra una distribución efectiva de los nutrientes y a los aportes parciales de Co₂, lo que ayuda a estabilizar el pH del medio, así mismo se mantienen en suspensión la población de algas para mantener el cultivo de manera uniforme en el recipiente.



3.6 ILUMINACIÓN:

La intensidad lumínica que se utiliza para cada fase de cultivo está en relación con el volumen de agua, la densidad del cultivo y la especie cultivada. Cuando se utiliza un Erlenmeyer de 500ml es suficiente una iluminación de 1000lux para el mantenimiento de la mayoría de las especies de microalgas. Para la utilización de volúmenes mayores se requiere una intensidad lumínica de 500 a 10.000 lux. Las lámparas fluorescentes más utilizadas son del tipo “cool – white “de 40w. también se utilizan las “day – light “ warm – white “ y las “gro – lux que son marcas comerciales.

3.7 MEDIOS ENRIQUECIDOS PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

3.7.1 Agar McConkey.

Composición del agar en gramos por litro:

Peptona de caseína	7,0
Peptona de carne	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Lactosa	10,0
Mezcla de sales biliares	1,5
Rojo neutro	0,03
Violeta cristal	0,001
Agar- agar	13,5



Para la preparación de este medio, se debe disolver 50g en un litro de agua desmineralizada, calentar hasta ebullición, esterilizar a 250 °c y 15 de presión, dejar enfriar y vertir en platos petri.

En los laboratorios Marinos este agar se prepara utilizando agua salada debido a que bacterias del genero *Aeromonas* Sp. crecen bien en estas condiciones, son bacterias en forma de pequeños bastones gran-negativos que causan problemas patológicos en camarones juveniles y en estado de larva. Las colonias típicas de *Aeromonas* son de color rojo oscuro, pequeñas y de forma plana, no mayor de 2mm. En este medio también crecen bacterias del genero *Vibrio* y las colonias son un poco de color transparente.

Las muestras se siembran en los platos petri por el procedimiento de estría, se incuban durante 18 a 24 horas a una temperatura de 37 °c. Las colonias lactosas negativas son incoloras y las lactosas positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso del pH provocado por los ácidos biliares.

El agar MacConkey generalmente es selectivo para aislamiento de *Salmonellas*, *Shigelas* y Bacterias coliformes a partir de alimentos, aguas residuales, orina y heces, leche, agua potable y otros materiales líquidos.

El crecimiento de la flora gran-positiva de acompañamiento es inhibido por el violeta cristal, en tanto que las sales biliares seleccionan a los enterobacteriaceas. La degradación de



la lactosa a ácido se pone de manifiesto por un viraje al rojo del indicador de pH rojo neutro.

3.7.2 AGAR TCBS.

Composición en gramos por litro.

Peptona de caseína	5,0
Peptona de carne	5,0
Extracto de levadura	5,0
Citrato de sodio	10,0
Tio sulfato de sodio	10,0
Bilis de buey desecado	5,0
Colato de sodio	3,0
Sacarosa	20,0
Cloruro de sodio	10,0
Citrato de hierro (III)	1,0
Azul de timol	0,04
Azul de bromo timol	0,04
Agar-agar	14,0

Para la preparación de este medio, se disuelve 88 gramos por litro de agua salada previamente esterilizada, se calienta hasta ebullición, no esterilizar en autoclave, se deja enfriar a una temperatura de 50 a 45 °C y se vierte en platos petri.



Para la interpretación, las muestras se siembran en 1 platos petri usando la técnica en superficie por estría, se incuba durante 18 a 24 horas a una temperatura de 37° C

En este medio, crecen las bacterias del genero *Vibrio* a diferentes temperaturas y a diferentes salinidades, tienen la forma de coma semejante a bastones son gram-negativos, dan oxidasa positiva y son aeróbicos facultativos, forman parte de la flora de los ecosistemas acuáticos y cuando el oxígeno descende los organismos generalmente se estresan permitiendo que las bacterias causen problemas patológico.

3.7.3 AGAR CETRIMIDE

Composición en gramos litros

Peptona de gelatina	20,0
Cloruro de Magnesio	1,4
Sulfato de potasio	10,0
N-cetil-N, N, N- trimetilamonio bromuro(cetrimide)	0,3
Agar- Agar	13,6
Aditivo- Glicerina	10ml

Para la preparación de este medio, se disuelven 45,5 gramos litro de agua desmineralizada, se adicionan 10ml de glicerina por litro de agua, se lleva a ebullición, luego se esteriliza en el autoclave a 150° C y a 15 de presión, se deja enfriar a temperatura entre 45-50 ° C y se vierte en los platos petri



Para la interpretación, la muestra se coloca en la superficie del agar en estrías, se incuban durante 48 horas a 42 °C debido a que a esta temperatura crecen escasamente muchos de los gérmenes que forman la flora de acompañamiento de las pseudomónas.

Las colonias de pseudomónas aeruginosas forman un pigmento verde-azulado (piocianina) y son fluorescentes a la luz ultra violeta

Las pseudomónas son microorganismos que se encuentran en cualquier ambiente y pueden ser diseminadas por diferentes vías, agua, aire, en altas concentraciones causan problemas patológicos a los estadios de larvas de camarón, por esa razón se da seguimiento en los laboratorios marinos para detectar a tiempo cualquier afloramiento de estos microorganismos.

3.7.4 AGAR NUTRITIVO ESTÁNDAR.

Composición gramos por litro.

Peptona de carne.	8,0
Peptona de caseína.	8,0
Extracto de levadura	3,0
Cloruro de sodio	5,0
D(+)- Glucosa	1,0
Agar- Agar.	5,0



Para la preparación, disolver 23.5 gramos en agua desmineralizada y disolverlo completamente, calentar hasta ebullición y esterilizar al auto clave a una temperatura de 250 °C y 15 de presión, enfriar a una temperatura de 45-50° C para ser vertido en los platos petri.

La muestra se coloca en el medio con la técnica de estría, se detectan bacterias exigentes y poco exigentes, también sirve para cultivo de estreptococos, neumococos, bacterias y otros gérmenes.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó durante los meses de abril y mayo del 2004 en las instalaciones de un Laboratorio Marino de producción de postlarvas de camarón ubicado en el sector del balneario las Peñitas, Costa del Océano Pacífico.

El área de bacteriología está conformada con equipos y medios para hacer análisis de muestras de las diferentes áreas de producción del Laboratorio. Para el procedimiento de la investigación se siguió el protocolo de trabajo y las normas que tiene implementadas el Laboratorio.

La sección de cultivo de microalgas está dividida en áreas de cultivos con poco volumen (tubos de ensayo y botellas) y área de cultivo con volúmenes mayores (bolsas y Cilindros). Las especies que se cultivaron fueron *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* y *Navícula sp*, en condiciones ambientales controladas: temperatura 18-24° C, salinidad, 25-32 ppm, pH 6.8-7.5 se utilizaron lámparas fluorescentes de 40 watts de color blanco para proporcionar iluminación necesaria para el crecimiento de las algas. En el mismo espacio se almacenaron los nutrientes, los medios y vitaminas en condiciones de temperaturas adecuadas.

Los medios enriquecidos utilizados fueron preparados siguiendo el protocolo de trabajo que utiliza el Laboratorio: TCBS, Estándar, McConkey y Cetrimide; de cada uno de ellos



se pesó 3g, con un volumen de 75 ml de agua ozonada, se le adicionó 75 ml de agua ozonada para desprender las partículas de agar adheridas a las paredes del recipiente, se puso a ebullición, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se colocó en autoclave por 45 minutos a 121 grados Celsius y 15 grados de presión, dejando enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se vierte 1.5 ml en cada plato petri a temperatura entre 40-45° C, se agitó de manera circular para que se distribuya de manera uniforme el medio enriquecido. Los platos petri se colocaron de manera invertida a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se guardaron los medios en el refrigerador a temperatura de 2- 4 grados y listos para ser utilizados.

Para el proceso de la investigación, se diseñó un flujograma de transferencia de volumen de los cultivos de microalgas, cada dos días, por encontrarse en la fase exponencial de crecimiento. Se hizo uso de cinco niveles de cultivos con diferentes volúmenes: tubo de ensayo 10 ml, botella 200 ml, vaso 3000 ml, bolsas plásticas de 15 litros y cilindros de fibra de vidrio de 220 litros. Los frascos de los diferentes niveles encontrados con microorganismos se desecharon, los cuales fueron repuestos con otros libres de bacterias.



FLUJOGRAMA DE TRANSFERENCIA DE NIVELES DE CULTIVOS DE MICROALGAS

Transferencias de microalgas
Cada dos días de tubo a botella

Se usaron cinco tubos de ensayos de 10ml c/u con un volumen total de 50ml
T° C = 18 a 24
Salinidad = 25 – 32 ‰
PH = 6.8 – 7.4



Medios de cultivos - McConkey
- Estándar
enriquecidos - Cetrimide
- TCBS

En el cultivo de transferencia se usaron dos botellas con un volumen total de 200 ml el cual contiene:

Algas + vol. de agua
50ml 150ml

T° C = 18 a 24

Salinidad = 25 – 32 ‰
PH = 6.8 – 7.4



Transferencias de microalgas
Cada dos días de botella a vaso

En el cultivo de transferencia se usaron dos vasos con un volumen total de 3000 ml el cual contiene: Algas + vol agua
400 ml 2600ml

T° C = 18 a 24

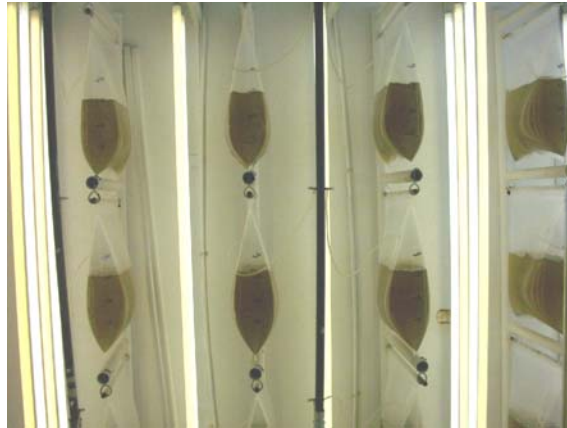
Salinidad = 25 – 32 ‰

PH = 6.8 – 7.4





Transferencias de microalgas
Cada dos días de vaso a bolsa



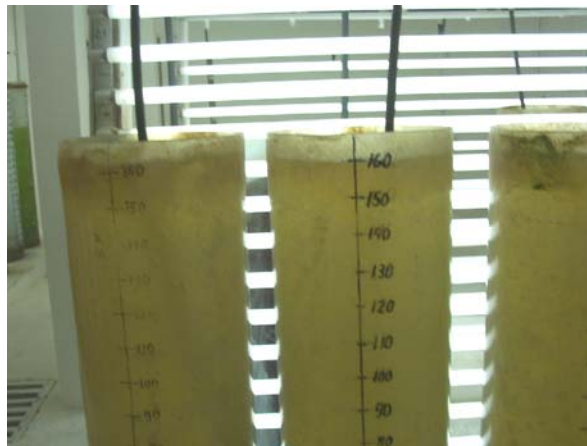
→ En el cultivo de transferencia se utilizó una bolsa con un volumen total de 15 litros, el cual contiene:
Algas + vol. de agua
6 lts. 9 lts.
T° C = 18 a 24
Salinidad = 25 – 32 ‰
PH = 6.8 – 7.4



Transferencias de microalgas
Cada dos días de bolsa a cilindro

En este cultivo final se uso un cilindro con un volumen total de 220 lts. el cual contiene: Algas + vol. agua
30 lts. 90lts.

T° C = 18 a 24
Salinidad = 25 – 32 ‰
PH = 6.8 – 7.4





Para identificar (*Vibrios*) se usó TCBS, Cetrimide para (*Pseudomonas*), McConkey (*aeromonas*) y Estándar (genéricos), se dejaron incubar durante 24 horas a temperatura de 30-35 ° C, se observaron diariamente los medios y se contaron las colonias presentes en cada plato, el número de colonias encontradas se multiplicó por el factor 200 para obtener las unidades formadoras de colonia (UFC).

Para reconocer las colonias de bacterias se tomó como referencia el protocolo de identificación de bacterias del Laboratorio marino, para *Vibrión* con TCBS. Colonias aisladas, pequeñas con el centro de color verde azulado para *V. alginolyticus*. Colonias agrupadas color amarillo *V. paraemolyticus*. *Pseudomonas*, Cetrimide. Colonias pequeñas aisladas y agrupadas con un color crema tendiendo a blanquecino. *Aeromonas* McConkey. colonias grandes y pequeñas de color rojo-oscuro aplanadas. Estándar como genérico para colonias grandes y pequeñas de color amarillo, agrupadas y aisladas.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados están referidos a 120 muestras por experimento de cultivo de microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chunii* y *Navícula sp.* realizado en los meses de abril y mayo del 2004.

5.1 Resultados para *Chaetoceros gracilis*.

Cuadro 1. UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Chaetoceros gracilis*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio Estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
04/04/03	Tubo	5,062.500	28,200	46,000	-----	-----
06/04/03	Botella	4,562.500	40,400	70,000	-----	-----
08/04/03	Vaso	5,250,000	59,000	44,000	21,000	-----
10/04/03	Bolsa	5,125,000	20,000	50,000	400	-----
12/04/03	Cilindro	6,250,000	43,800	39,400	200	-----

En el cuadro se presentan las UFC de las bacterias encontradas en el medio McConkey crecieron aeromónas desde tubo hasta cilindro. En el Estándar crecieron colonias de microorganismos también en todos los niveles.



El medio TCBS que es selectivo para bacterias del género *Vibrios* se observaron colonias a partir del tercer nivel. En el medio Cetramide no un hubo presencia de bacterias.

Para comprobar los resultados obtenidos, se realizó un nuevo cultivo de *Chaetoceros gracilis* siguiendo el mismo procedimiento del laboratorio.

Cuadro 2 UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Chaetoceros gracilis*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
23/04/03	Tubo	4,000,000	-----	34.000	-----	-----
25/04/03	Botella	2,562.500	15,000	40,000	-----	-----
28/04/03	Vaso	3,000.000	9,000	36,400	12,400	-----
30/04/03	Bolsa	3,875.000	28,000	50,000	200	-----
03/05/03	Cilindro	6,250.000	3,600	Se encontraron agrupadas en sig sag	74,000	----- -----

En este segundo experimento del cultivo de *Chaetoceros gracilis*, en el medio McConkey aparecieron bacterias a partir del nivel de botella. En el medio estándar la presencias de colonias fue a partir de tubo de ensayo.

En el medio TCBS los vibrios aparecieron a partir del nivel vaso. En el medio Cetrimide no hubo presencia de bacterias.



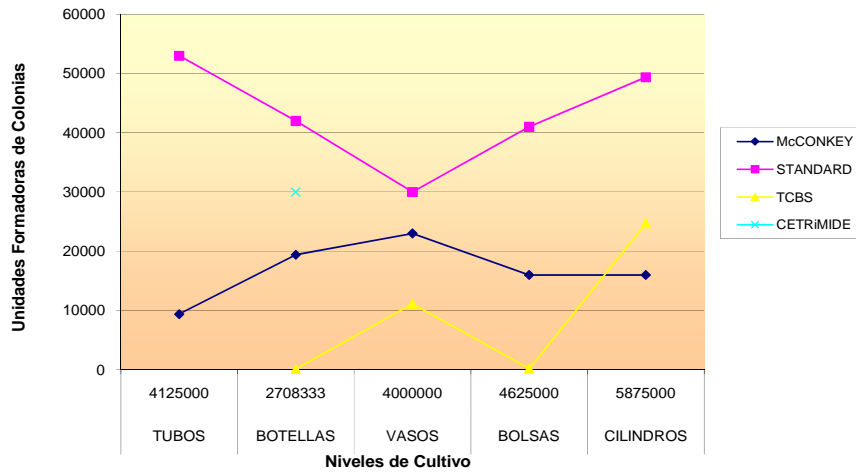
Para reafirmar lo resultados anteriores, se efectuó un tercer experimento en las mismas condiciones de cultivo que trabaja el Laboratorio.

Cuadro 3 UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Chaetoceros gracilis*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
15/05/03	Tubo	3,312.500		79,000	-----	-----
17/05/03	Botella	1,000.000	2,800	18,000	400	Gran cantidad de colonias grupadas
20/05/03	Vaso	3,750.000	800	12,000	-----	-----
22/05/03	Bolsa	4,875.000	800	24,000	-----	-----
24/05/03	Cilindro	5,125.000	880	13,680	-----	-----

En este tercer experimento de cultivo de *Chaetoceros gracilis* en el medio McConkey se encontraron Aeromónas en todos los niveles pero en menor cantidad. En el medio Estándar las colonias se encontraron en todos los niveles.

En el medio TCBS las colonias de Vibrios aparecieron solamente a nivel de botella y en Cetrimide aparecieron las colonias de pseudomónas a nivel de botella en grandes cantidades y agrupadas.



Gráfica 1. Representa el comportamiento de las bacterias en los diferentes niveles de cultivo de la microalga *Chaetoceros gracilis*.

La gráfica muestra tres aspectos del comportamiento de las bacterias como unidades formadoras de colonias en los niveles de cultivo de la microalga *Chaetoceros gracilis*: con el medio de cultivo estándar las unidades formadoras genéricas descienden en los niveles de tubo, botellas y vaso, a partir de este último nivel de cultivo al realizarse la resiembra con densidades mayores de microalgas, las unidades formadoras de colonias aumentan hasta 50,000 UFC.

Las unidades formadoras de colonias de aeromonas aumentan en los tres primeros niveles de cultivos, al aumentar la densidad de la microalga *Chaetoceros gracilis*. descienden lentamente y se mantienen constante en los siguientes niveles de cultivos.



Las unidades formadoras de colonias de los vibrios aparecen en el nivel de botella y aumenta hasta el nivel de vaso, luego desciende en el nivel de bolsa y crecen nuevamente en el nivel de cilindro.

En los tres experimentos con *Chaetoceros gracilis*, en niveles de mayores densidades y volúmenes y con aireación, aparecieron las bacterias del género Vibrios, lo cual indica que a mayor densidad de microalgas aparecen, según (Riquelme et al. 1987) afirma, que después de la máxima producción de fitoplancton en grandes volúmenes aparecen los Vibrios, sugiriendo que este aumento bacteriano se produce por la utilización de fitoplancton muerto y detritus.

Los resultados de los tres experimentos con la microalga *Chaetocero gracilis*, expresan que la presencia de Aeromonas detectadas en el medio McConkey y otros tipos de microorganismos en el medio Estándar, indica que estos microorganismos pueden convivir, por encontrarse en todos los niveles. Según (Cole et al. 1988) afirma, que la presencia de Aeromonas y otros microorganismos no identificados, tienen una correlación positiva de vivencia entre abundancia de bacterias y fitoplancton.

El no crecimiento de Pseudomónas en Cetrimide en los dos primeros experimentos indica que estas bacterias no tienen relación de convivencia con las *Chaetoceros* en altas densidades, si aparecieron en un solo nivel en el tercer experimento donde las densidades de la microalga son bajas. (Salvensen et al. 2000) afirma que los factores que provocan el crecimiento bacteriano y controlan la composición de la bacterioflora en el agua de cultivo, depende de la especie de alga y el estado de crecimiento de la misma.



5.2 Resultado de *Navícula sp.*

Cuadro 4. UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Navícula Sp.*

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio Estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
23/04/03	Tubo	2,125.000	191,000	480,000	-----	-----
25/04/03	Botella	2,625.000	11,000	37,000	-----	-----
28/04/03	Vaso	375,000	3,200	72,000	-----	-----
30/04/03	Bolsa	812,500	9,400	71,400	10,000	3000
03/05/03	Cilindro	1,062.500	19,400	116,000	2,000	-----

La bacteria *Aeromonas* se detectó en el cultivo de la microalga *Navícula sp* en todos los niveles con el medio McConkey y con Estándar la presencia de microorganismos.

En la microalga *Navícula sp*, las bacterias del genero *Vibrios* se presentaron en niveles de cultivo de grandes volúmenes (bolsas y cilindros) lo mismo sucede con la microalga *Chaetoceros gracilis*.

En el medio Cetrimide aparecieron las *pseudomonas* en el nivel de bolsa en este primer experimento y luego desaparece.



Se realizó un segundo experimento con *Navícula sp*, siendo los resultados lo siguiente:

Cuadro 5 UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Navícula sp*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio Estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
15/05/03	Tubo	3,312.500	23,600	72,000	-	-
17/05/03	Botella	4,000.000	16,000	64,000	-	1600
20/05/03	Vaso	5,187.500	9,200	40,000	-	-
22/05/03	Bolsa	5,250.000	1,600	10,000	-	-
24/05/03	Cilindro	12,500.000	200	20,000	-	-

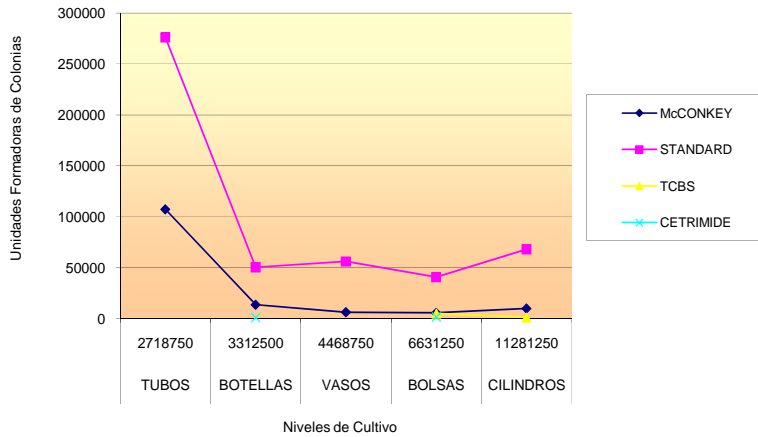
Los resultados en este segundo experimento con *Navícula sp*, las *Aeromonas* aparecen en todos los niveles en el medio McConkey y con el Estándar se detecta la misma situación con microorganismos, con la diferencia que las UFC se presentan en orden descendente a medida que aumenta la densidad de la microalga, esto nos indica que la microalga inhibe el crecimiento de bacterias.

En el medio Cetrimide las pseudomónas aparecen a nivel de botella y luego desaparece, igual situación se presentó en el primer experimento a nivel de bolsa, se puede notar que las pseudomónas son inhibidas por la microalga *Navícula sp*

En el medio TCBS no hubo presencia de *Vibrios*, pero si en el primer experimento, no existe estudio a la fecha de la microalga *Navícula sp* con bacterias, esto nos lleva a la



interpretación según nuestros resultados de que la *Navícula* a altas densidades permite la presencia de *Vibrios*.



Gráfica 2. Representa el comportamiento de las bacterias en los diferentes niveles de cultivo de la Microalga *Navícula sp*

En este gráfica las unidades formadoras de colonias de aeromónas y de bacterias genéricas descienden debido a ala falta de oxígeno. Al adicionar aireación al nivel de botella se detiene ese descenso de UFC manteniéndose constante en el resto de los niveles de cultivo. A la fecha no se ha encontrado estudio de correlación entre *Navícula sp* y bacteria, pero de acuerdo a nuestros resultados al correlacionar bacterias con algas, podemos decir que pueden convivir en volúmenes altos porque las UFC se mantienen constante .



5.3 Resultados de *Tetraselmis chuii*.

Cuadro 6 UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Tetraselmi chuii*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio Estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
23/04/03	Tubo	1,187.500	123,800	198,200	-	-
25/04/03	Botella	2,625.000	18,000	90,000	-	-
28/04/03	Vaso	4,937.500	9,000	30,000	-	-
30/04/03	Bolsa	6,437.500	25,800	70,000	62,800	14,400
03/05/03	Cilindro	7,625.000	200	116,000	180,000	-

Las aeromonas aparecieron en todos los niveles de cultivo en el medio McConkey y en Estándar la situación es igual.

Las bacterias genéricas y los Vibrios, sin embargo aparece solamente en los niveles de bolsa y cilindro. En Cetramide se presentaron pseudomonas a nivel de bolsa.

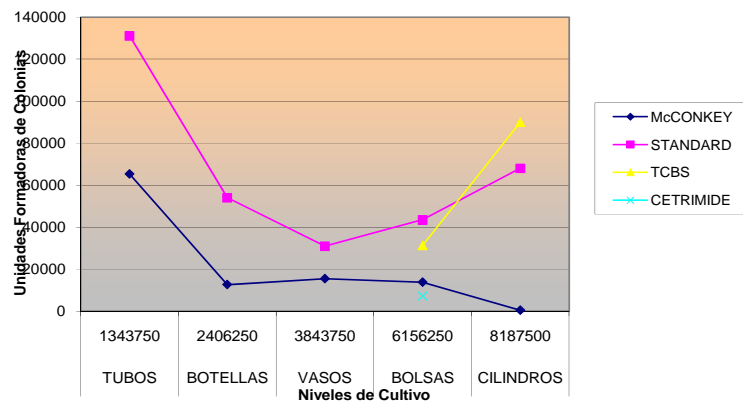


En el segundo cultivo experimental de *Tetraselmi chuii* los resultados fueron los siguientes.

Cuadro 7 UFC de bacterias en los niveles de cultivo de *Tetraselmi chuii*.

Fecha	Nivel de cultivo	Cel/ml de alga	Medio McConkey	Medio Estándar	Medio TCBS	Medio Cetrimide
15/05/03	Tubo	1,500.000	7.000	64.000	-	-
17/05/03	Botella	2,187.500	7.400	18.000	-	-
20/05/03	Vaso	2,750.000	22.000	32.000	-	-
22/05/03	Bolsa	5,875.000	1,800	17.000	-	-
24/05/03	Cilindro	8,750.000	720	20.000	-	-

En estos resultados las aeromónas se encontraron en todo los niveles de cultivo, lo mismo sucedió con el medio Estándar. En TCBS y Cetrimide no se detectó ninguna colonia de vibrión y pseudomóna.



Gráfica 3. Representa el comportamiento de las bacterias en los diferentes niveles de cultivo de la microalga *Tetraselmis chuii*.

La gráfica muestra que las UFC de las bacterias genéricas y aeromónas descienden hasta el nivel de vaso, a partir de este nivel las aeromónas descienden y las genéricas aumentan. La presencia de vibrios se da en el nivel de bolsa y por tanto las UFC aumentan hasta 90,000 en cilindro

Los resultados obtenidos de esta microalga, pueden ser discutidos con los diversos estudios realizados para cultivo de peces y Artemia.

Lodeiros et al. 1988 describe que los mono cultivos de *Tetraselmis chuii* presenta asociadas en su bacterioflora un 30% de cepas productoras de sustancias antibacterianas. (Austin et al. 1992) señala que en estudios realizados con extractos de *Tetraselmis suesica* la



producción de microalgas inhiben el crecimiento de diversas bacterias patógenas en cultivos de peces. En los cultivos de *Artemia franciscana*, organismo utilizado como alimento para peces en acuicultura, ha sido demostrado que la adición de *Tetraselmis sp* durante dos días reduce y modifica la carga bacteriana asociada al crustáceo (Olsen et al. 2000).



VI. CONCLUSIONES.

1. La microalga *Chaetoceros gracilis*, tiene una interacción de convivencia con las bacterias aeromónas, por encontrarse en todos los niveles de cultivo. Con las pseudomonas, esporádicamente lo que indica que se contamina por otras fuentes. Con los Vibrios cuando hay densidades mayores de microalga y se aumenta la aireación y el volumen de agua.

2. La microalga *Navicula sp*, tiene interacción de convivencia con aeromónas por encontrarse en todos los niveles de cultivo. Los Vibrios aparecen en altos volúmenes esporádicamente lo que indica que su presencia es por otras causas.

3. La microalga *Tetraselmis chuii* tiene interacción de convivencia con la presencia de aeromónas en todos los niveles. Con Vibrio y pseudomona esporádicamente lo que indica una vía de contaminación.



VII. RECOMENDACIONES

- Debido a que se encontró bacterias en los diferentes niveles de cultivo de las tres especies de microalgas estudiadas, se recomienda una investigación orientada a la convivencia microalga - bacteria, tomando como referencia, el volumen, densidad poblacional, aireación y especie de microalga.
- Es necesario hacer investigaciones repetidas usando el protocolo que se utilizó en el Laboratorio para el estudio, ya que en la práctica con los medios preparados con agua marina se reconoce el crecimiento de grupos de bacterias en base a su color, forma y tamaño de colonias; estas fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrios* y grupos genéricos.
- Enfatizar estudios con la microalga *Navicula sp*, ya que a la fecha solamente el presente estudio existe.



VIII. BIBLIOGRAFIA.

AUSTIN B, E BAUDET & M STOBIE. (1992). Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetrselemis suesica*. Journal of Fish Diseases. Volúmen 15. pag. 55 – 61.

AZAM F, T FENCHEL, JG FIELD, JS GRAY, LA MEYER- REIL & F THINGSTAD. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series. Volúmen 10. pag. 257 – 263.

BIRD DF & J KALFF. (1984). Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine water. Canadian Journal of fisheries and Aquatic Science. Volúmen 41. pag. 1015 – 1023.

BRATBACK, G; M HELDAL, S NORLAND & TF THINGSTAD. (1990). Viruses as partenrs in spring bloom microbial trophodynamics. Applied and Enviromental Microbiology. Volúmen 56. pag. 1400 – 1405.

BROWN MR; SW JEFFREY, JK VOLKMAN, & GA DUNSTAN. (1997). Nutritional properties of micralgae for maruculture. Aquaculture. Volúmen 151. pag. 315 - 331.

COLE, J; M PACE & S FINDLAY (1988) Bacterial production in fresh and saltwater esystems: a cross system overview. Marien Ecology Progress series. Volúmen 43. pag. 1-10.



CORRE VL; R. JANEÓ, C.M. CAIPANG & A.T. CALPE. (2000). Use of probiotics and reservoirs with **green water**. Aquaculture Asia. Volúmen 2. pag. 34 – 38.

FUKAMI, K; A YUZAWA, T NISHIJIMA & Y HATA. (1992). Isolation and properties of bacterium inhibiting the growth of *Gynodinium nagasakiense*. Nippon Suisan Gakkaishi. Volúmen 58. pag. 1073 – 1077.

HERNÁNDEZ M; J. ÁREAS (2000). Protocolo para cultivo de Microalgas y Bacterias. Larvinic S. A, León Nicaragua.

IRIANTO A & B. AUSTIN. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease. Volúmen 25 pag. 333 – 342.

LODEIROS, CJ; E. FERNANDEZ; A. VELEZ & J. BASTARDO. (1988). Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. Boletín del Instituto Oceanográfico Venezuela. Volúmen 27. pag. 63 – 69.

MERCK, E DARMSTADT. (1994). Manual de Medios de Cultivo. Alemania.

MORALES DE RUIZ, VIELKA. (1991). Guía práctica para la cría de Camarones Peneidos. Estación de Maricultura del Pacífico. Dirección Nacional de Acuicultura. Panama.



MUNRO; PD, BARBOUR A & TH BIRKBECK. (1955). Comparison of the growth and survival and larval turbot in the absence of cultivable bacteria with dose in the presence of vibrio anguillarum, Vibrio alginolyticus or a marine Aeromonas sp. Applied and Environmental Microbiology. Volúmen 61. pag. 4425 – 4428.

NAVINER M, JP BEREGE, P DURAND & H LEBRIS. (1999). Antibacterial activity of marine diatom Skeletonema costatum against aquacultural pathogens. Aquaculture. Volúmen 174. pag. 15 – 24.

OLSEN; AI, Y OLSEN Y ATTRAMADAL, K CHRISTE, TH BIRKBECK, J SKJERMO & O VADSTEIN. (2000). Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile Artemia franciscana. Aquaculture. Volúmen 190. pag. 11 - 25.

RICO-MORA, R. & D. VOLTOLINA (1995). Bacterial interaction in Skeletonema costatum cleve (bacillariophyceae) culture. Revista Italiana Acquacoltura. Volúmen 30. pag. 105 – 109.

RIEMANN, L; GF STEWARD & F. AZAM (2000). Dynamics of bacterial community composition and activity during mesocosm diatom bloom. Applied and Environmental Microbiology. Volúmen 66. pag. 578 – 587.



RIQUELME, C. E; K. FUKAMI & Y. ISHIDA. (1987). Annual fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru bay and their interrelationship. Bulletin of the Japanese Society of microbial Ecology. Volúmen 2. pag. 29 -37.

SANCHO VALLS J, R. BALDIRIS NACENTE, M. SÁNCHEZ COLL. 1996. Medios de Cultivo para Microbiología. Cuarta edición. España.

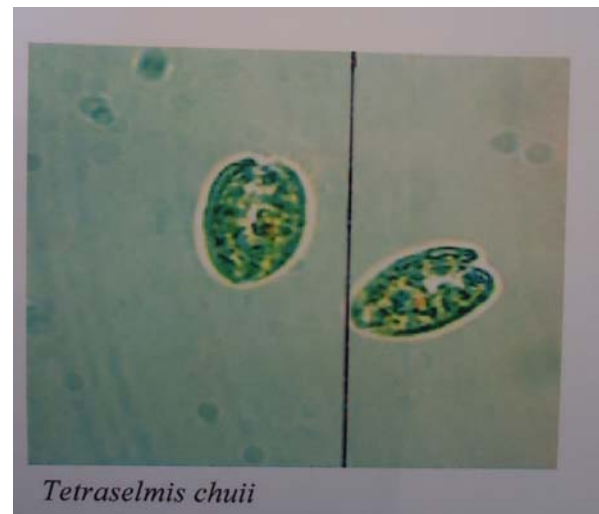
SALVESEN I, KI REITAN, J SKGERMO & G OIE. (2000). Microbial environment in marine larviculture: Impact of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. Aquaculture International. Volúmen 8. pag. 275 – 287.

VISO AC, D PESANDO & C BABY. (1987). Antibacterial and antifungal properties of some marina diatoms in culture. Botánica Marina. Volúmen 30. pag. 41 – 45.



ANEXOS.

MICROALGAS CULTIVADAS.





SECCIÓN DE CULTIVOS PUROS



Fig. 1 Revisión de muestras de las tres especies de Microalgas



Fig. 2 Área donde se encuentran los niveles de cultivo (tubos de ensayos y botellas)

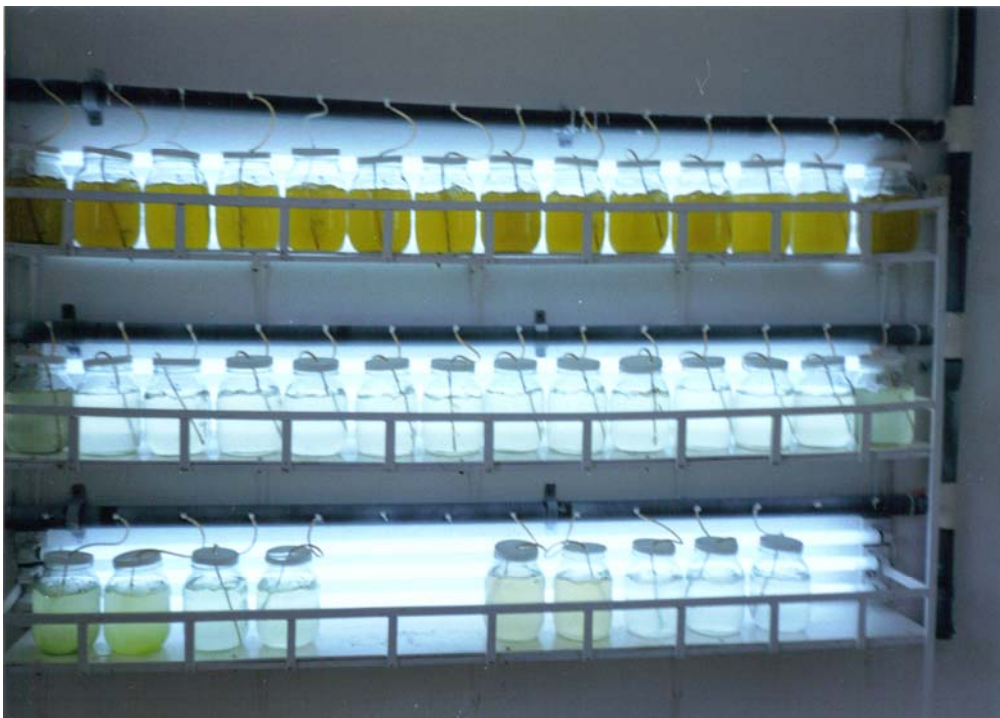


Fig. 3 Área donde se encuentra el nivel de cultivo (vasos)



Fig. 4 Área de preparación de los medios de cultivos utilizados (MacConkey, Estándar, TCBS Y Cetramide



Fig. 5 Área de siembra de las muestras de Microalgas en los diferentes medios e incubación.