

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Estrategias de manejo con bacterias beneficiosas para mejorar la
calidad de cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniera Acuícola

Presentado por:

Mónica Adriana Rivera Jaramillo

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

Dedicado a Dios por alumbrar mi camino y guiar mis pasos. A mi madre Amelia Jaramillo, a mi abuelita Rosita Salazar por inspirarme a ser cada día una persona mejor, por el regalo invaluable de la educación durante mi niñez y adolescencia, lo cual ha sido la base de mi capacidad para costear mis estudios universitarios y seguir mis sueños. A mi novio Francisco Salazar E., por acompañarme en este camino, alentándome en todo momento para cumplir esta meta de vida, darme ánimos y recordarme que podía lograrlo. A mi tío Carlos, a mi tía Ivonne, a mis primas Karlita y Michelle por su alegría genuina ante cada uno de mis logros, por orar por mí y constantemente llevarme en su corazón. Y, por último, un tributo con gratitud y amor a la niña Mónica Adriana, que siempre tuvo fe en sí misma y en el poder de sus sueños, porque su actitud positiva nos ha llevado lejos.

Mónica Adriana Rivera Jaramillo

Agradecimientos

Agradezco a Dios por extenderme sus entrañables misericordias, abrazarme con su amor incondicional y ayudarme a obtener este logro. A mi mamá Amelia Jaramillo por mostrarme que la búsqueda constante de conocimiento es un valioso tesoro que ilumina el camino hacia un futuro prometedor. A quien ahora me alumbra desde el cielo, mi abuelita Rosita Salazar por sus esfuerzos en brindarme la base para mi educación e inculcarme valores y principios sólidos desde la infancia. A Francisco Salazar E., mi novio por estar conmigo en cada etapa, ayudarme constantemente en todo cuanto ha estado a su alcance y permanecer junto a mí con empatía y amor compartiendo mis alegrías y tristezas.

A mi tutora Alba Calles PhD, por su tiempo al compartirme su experiencia en el área Acuícola, por motivarme, orientarme con paciencia en mi proyecto integrador y permitirme formar parte de su proyecto investigativo. Así como también al equipo del laboratorio de Bentos de la FIMCM, el Tnlgo. Matías Calles y el Ing. Leandro Parrales por apoyarme en la fase experimental.

A mi cotutor Luis Galarza PhD, por darme la oportunidad de orientarme hacia la investigación científica y compartirme sus conocimientos que enriquecieron mi trabajo. Al personal del CIBE, en particular el Ing. Fernando Espinoza y la Lcda. Diana Maldonado por el apoyo recibido en el área de fitopatología.

A cada uno de mis maestros de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por transmitirme con dedicación sus conocimientos a lo largo de mi trayectoria universitaria. A Lissette Zavala por las experiencias vividas. A mi alma mater, la ESPOL por alimentarme intelectualmente y formarme como una excelente profesional, estudiar en esta institución ha sido un honor para mí. A cada uno de los ángeles que Dios fue colocando en mi camino a fin de que pueda continuar en esta meta. Y finalmente, no puedo dejar de expresar la gratitud que mi corazón siente hacia mí misma, por la inquebrantable determinación de trabajar arduamente, perseverar con valentía y tener fe de que tengo la capacidad de lograr mis objetivos.

Mónica Adriana Rivera Jaramillo

Declaración Expresa

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Mónica Adriana Rivera Jaramillo y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Guayaquil, 08 de septiembre del 2023.

Mónica Adriana Rivera Jaramillo

Evaluadores



Firmado electrónicamente por:
JOSE JERRY LANDIVAR
ZAMBRANO

Jerry Landívar, PhD.

Profesor de Materia



Firmado electrónicamente por:
ALBA KATHERINE
CALLES PROCEL

Alba Calles, PhD.

Tutora de proyecto



Firmado electrónicamente por:
LUIS LENIN
GALARZA
ROMERO

Luis Galarza, Ph.D.

Cotutor de proyecto

Resumen

La presencia de microorganismos patógenos en cultivos acuícolas incide negativamente en la producción de especies bioacuáticas, un ejemplo de ello es la proliferación de protozoarios que se ha evidenciado en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*, la cual es suministrada como alimento a larvas de crustáceos. Las bacterias beneficiosas tienen el potencial de interactuar de manera positiva con las microalgas, por tal razón el presente estudio propone el uso de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* para probar la efectividad que tienen en la inhibición de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* para asegurar el éxito sostenible del cultivo de este microorganismo fotosintético. Cinco ensayos fueron realizados para analizar el comportamiento de *A. peroxydans* y *B. yapensis*, principalmente frente a ciliados y flagelados. Se evidenció el 100% de mortalidad de protozoarios en cada una de las réplicas a las 144 horas de haber aplicado los tratamientos., mejorar la densidad de crecimiento y la calidad de la microalga *Kirchneriella sp.* . En la producción acuícola las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* representan una técnica clave de control biológico, la proliferación de protozoarios en el cultivo de *Kirchneriella sp.* reduce significativamente por la acción de estas bacterias.

Palabras Clave: Clorofita, agua estuarina, protozoo, acuicultura.

Abstract

The presence of pathogenic microorganisms in aquaculture cultures has a negative impact on the production of bioaquatic species, an example of this is the proliferation of protozoa that has been evidenced in the culture of the microalgae Kirchneriella sp., which is supplied as food to crustacean larvae. Beneficial bacteria have the potential to interact positively with microalgae, therefore the present study proposes the use of Acetobacter peroxydans and Bacillus yapensis to test their effectiveness in inhibiting protozoa present in the culture of the microalga Kirchneriella sp. to ensure the sustainable success of the culture of this photosynthetic microorganism. Five trials were carried out to analyse the behaviour of A. peroxydans and B. yapensis, mainly against ciliates and flagellates. A 100% mortality of protozoa was observed in each of the replicates 144 hours after application of the treatments, improving the growth density and the quality of the microalgae Kirchneriella sp. In aquaculture production, the bacteria Acetobacter peroxydans and Bacillus yapensis represent a key biological control technique, the proliferation of protozoa in the culture of Kirchneriella sp. is significantly reduced by the action of these bacteria.

Keywords: Chlorophyte, estuarine water, protozoa, aquaculture.

Índice general

Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas	VIII
Capítulo 1.....	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema.....	2
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Microalgas.....	5
1.4.2 Cultivo de microalgas	5
1.4.3 Beneficios de las microalgas en acuicultura	5
1.4.4 <i>Kirchneriella sp.</i>	6
1.4.5 Proliferación de protozoarios en el cultivo de microalgas.....	7
1.4.6 Bacterias beneficiosas en acuicultura	8
1.4.7 <i>Acetobacter peroxydans</i>	9
1.4.8 <i>Bacillus yapensis</i>	9
1.4.9 Interacción entre microalgas y bacterias.....	10

Capítulo 2.....	11
2. Metodología	11
2.1 Recolección de la muestra de agua de manglar.....	11
2.2 Medición de salinidad	11
2.3 Observación de la muestra de agua de manglar	12
2.4 Primer ensayo.....	12
2.5 Segundo ensayo.....	13
2.6 Tercer ensayo	17
2.7 Cuarto ensayo.....	19
2.8 Quinto ensayo.....	21
2.9 Análisis estadístico y de datos.....	23
Capítulo 3.....	24
3. Resultados y análisis	24
3.1 Comportamiento de los protozoarios frente a <i>Acetobacter peroxydans</i> y <i>Bacillus yapensis</i>	24
3.2 Efecto de los extractos de <i>Acetobacter peroxydans</i> y <i>Bacillus yapensis</i> en el cultivo de la microalga <i>Kirchneriella sp.</i> ante la presencia de protozoarios	27
3.3 Costos.....	32
Capítulo 4.....	34
4. Conclusiones y recomendaciones	34
4.1 Conclusiones.....	34
4.2 Recomendaciones	35
Referencias.....	37
Apéndice	44

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
FIMCM	Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ANOVA	Analysis of Variance

Simbología

ml	Militro
g	Gramos
ppt	Partes por mil
ppm	Partes por millón \geq
lx	lux
OD	Oxígeno disuelto
h	Horas
pH	Potencial de hidrógeno
C	Control
\pm	Más -Menos
\leq	Menor o igual que
\geq	Mayor o igual que
p	Probabilidad
P	<i>Acetobacter peroxydans</i>
Y	<i>Bacillus yapensis</i>
C	Tratamiento control

Índice de figuras

Figura 1.1 Células de la microalga <i>Kirchneriella sp</i>	7
Figura 1.2 Protozoarios presentes en el cultivo de <i>Kirchneriella sp</i>	8
Figura 2 .1 Ubicación de la Zona La Caleta en la provincia del Guayas	11
Figura 2.2 Producción de microalgas.....	14
Figura 3.1 Cantidad de individuos (protozoarios) en el lapso de 144 horas de haber suministrado los diferentes tratamientos en relación de los tratamientos control	26
Figura 3.2 Comparación del oxígeno disuelto, cantidad de individuos (protozoarios) y densidad de crecimiento de la microalga <i>Kirchneriella sp</i> . a las 144 horas de haber inoculado los diferentes extractos bacterianos a 5 ppt de salinidad	30
Figura 3.3 Comparación del oxígeno disuelto, cantidad de individuos (protozoarios) y densidad de crecimiento de la microalga <i>Kirchneriella sp</i> . a las 144 horas de haber inoculado los diferentes extractos bacterianos a 9 ppt de salinidad	31

Índice de tablas

Tabla 1.1 Compuestos bioactivos presentes en <i>Acetobacter peroxydans</i>	9
Tabla 1.2 Compuestos bioactivos presentes en <i>Bacillus yapensis</i>	10
Tabla 2.1 Tratamientos utilizados para la observación del comportamiento de los protozoarios frente a los extractos de <i>Acetobacter peroxydans</i> y <i>Bacillus yapensis</i>	13
Tabla 2.2 Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de <i>Kirchneriella sp.</i> en el cual había presencia de protozoarios (segundo ensayo).....	16
Tabla 2.3 Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de <i>Kirchniriella sp.</i> en el cual había presencia de protozoarios (tercer ensayo)	18
Tabla 2.4. Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de <i>Kirchneriella sp.</i> con presencia de protozoarios (cuarto ensayo)	20
Tabla 2.5 Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de <i>Kirchniriella sp.</i> con presencia de protozoarios (quinto ensayo)	23
Tabla 3.1. Efecto de los tratamientos con <i>Acetobacter peroxydans</i> y <i>Bacillus yapensis</i> ante la presencia de protozoarios en muestras de aguas estuarinas del Golfo de Guayaquil.	25
Tabla 3.2 Efecto de los tratamientos con <i>Acetobacter peroxydans</i> y <i>Bacillus yapensis</i> ante la presencia de protozoarios en cultivo de <i>Kirchneriella sp.</i>	29
Tabla 3.3 Insumos utilizados en el desarrollo de la metodología del presente proyecto.....	32
Tabla 3.4. Presupuesto para transporte	33

Capítulo 1

1. Introducción

La acuicultura es una de las principales actividades de producción de alimentos a nivel global (Oviedo-Olvera et al., 2023). En la cadena alimenticia acuática, las microalgas representan la base nutricional de diversas especies acuícolas (O'Neill et al., 2022) debido a la alta composición de lípidos, proteínas, carbohidratos y otros productos de alto valor que son esenciales para su crecimiento y desarrollo (Tham et al., 2023). Sin embargo, la contaminación biológica por parte de protozoos presentes en cultivos de microalgas afecta de manera adversa la productividad de estas algas microscópicas (Zhu et al., 2020), por lo que inhibir la proliferación de protozoarios en este tipo de cultivos es esencial para mantener un equilibrio óptimo en los ecosistemas acuáticos.

Por otro lado, la incorporación de bacterias en cultivos de microalgas brinda la posibilidad de mejorar la calidad de estas últimas (Palacios et al., 2022), y a la vez de detener la proliferación de patógenos (Kiron et al., 2022). Como señala (Lépinay et al., 2018), las bacterias pueden producir ciertos antibióticos para proteger a las microalgas contra microorganismos que las perjudican, ya que las sustancias químicas secretadas por las bacterias benéficas (Oviedo-Olvera et al., 2023), les permite descomponer la materia orgánica y promover el crecimiento del fitoplancton (Sial et al., 2020).

Dado que, en el cultivo de las microalgas *Kirchneriella sp.* del laboratorio de bentos de la FIMCM se ha detectado principalmente la presencia de flagelados y ciliados, para garantizar la sostenibilidad del cultivo, el presente estudio se desarrolló con el propósito de inhibir la proliferación de estos microorganismos que impactan negativamente a estas algas microscópicas, mediante el uso de los compuestos secretados por las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* a fin de mejorar el cultivo de estas clorofitas.

Es importante destacar que esta investigación es el primer estudio que involucra a las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el ámbito acuícola. Hasta la fecha, la información relacionada con estas bacterias, principalmente con *Bacillus yapensis*, es escasa. Actualmente no se tiene conocimiento de un producto comercial para acuicultura que haga uso de los compuestos secretados por estas bacterias.

De manera que, el presente estudio radica en el potencial que poseen estos microorganismos como agentes de control biológico, lo cual a más de beneficiar al cultivo de *Kirchneriella sp.*, y brindar la posibilidad de obtener un alimento idóneo para larvas de cangrejo rojo a fin de obtener una mayor supervivencia en su estadio larval para tener un exitoso cultivo de este crustáceo en condiciones de laboratorio, a largo plazo contribuiría con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (Bele et al., 2023), específicamente los ODS dos, doce y catorce, cuyo fin es lograr “hambre cero”, producción y consumo responsables” y “vida submarina” respectivamente (*Objetivos de Desarrollo Sostenible / Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo*, n.d.).

1.1 Descripción del problema

La proliferación descontrolada de protozoarios en el cultivo de *Kirchneriella sp.* puede causar daño directo a las células de las microalgas (Zhu et al., 2020), ya que afecta negativamente la productividad, la calidad y el equilibrio del ecosistema acuático. Los protozoarios consumen una parte significativa de las microalgas (Rego et al., 2015), reduciendo la biomasa y el rendimiento del cultivo. Su presencia compromete la salud y la supervivencia de las microalgas (Zhu et al., 2020), generando una disminución en la calidad del cultivo y mayores pérdidas económicas (Kiron et al., 2022). Controlar de manera efectiva la proliferación de protozoarios es esencial para mantener un ambiente óptimo de crecimiento de *Kirchneriella sp.* y asegurar el éxito sostenible del cultivo.

1.2 Justificación del problema

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares (Tham et al., 2023) cuyo rol en los sistemas acuícolas es de suma importancia. Ya que son utilizadas como alimento de muchos organismos acuáticos (Noreikaitė, Balčiūnaitė-Murzienė, et al., 2021), incluyendo larvas de peces, camarones, moluscos y crustáceos (Mishra et al., 2023), debido a que son ricas en proteínas y carbohidratos (Noreikaitė, Balčiūnaitė, et al., 2021). Además, las microalgas también contribuyen a la producción de oxígeno y a la absorción de nutrientes en el agua (Dolganyuk et al., 2020).

Las bacterias beneficiosas, también conocidas como probióticos (Miyasaka et al., 2023), pueden desempeñar un papel crucial en la mejora de la calidad del cultivo de microalgas (Midhun et al., 2023). Estas bacterias pueden interactuar de manera positiva con las microalgas (Dolganyuk et al., 2020), proporcionando beneficios como la mejora de la disponibilidad de nutrientes (Sial et al., 2020), la estimulación del crecimiento (Oviedo-Olvera et al., 2023), la reducción de la competencia de otras especies de algas (Liu et al., 2020) la protección contra patógenos (Kiron et al., 2022) y, dado a que tienen secretan compuestos antimicrobianos y, por consiguiente, inhiben directamente el crecimiento de patógenos (Baumgärtner et al., 2024).

Kirchneriella sp. es una microalga que se ha utilizado en acuicultura como alimento para larvas de peces y otros organismos acuáticos (Kandathil Radhakrishnan et al., 2020), debido a los compuestos bioactivos valiosos que estas producen (Fu et al., 2023), tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, y vitaminas (Khoo et al., 2023). Sin embargo, su cultivo puede verse afectado por depredadores (Khoo et al., 2023), como protozoos (Zhu et al., 2020), lo que limita su producción a gran escala y su calidad como alimento para especies bioacuáticas.

Basado en la problemática que existe a nivel global sobre la sostenibilidad acuícola (Afewerki et al., 2023; Brugere et al., 2023; Verdegem et al., 2023), la presente investigación implementa estrategias de manejo con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de *Kirchneriella sp.*, ya que estas tienen el potencial de ayudar a mejorar la disponibilidad de nutrientes para la microalga, aumentar la resistencia al estrés ambiental, reducir la competencia de otras especies de algas y mejorar la calidad del cultivo en términos de valor nutricional y pureza (Sarwer et al., 2022).

Además, el presente proyecto promueve los Objetivos de Desarrollo Sostenible, de manera puntual el ODS 2 “Hambre cero”, el ODS 4 “Producción y consumo responsables” y el ODS 14 “Vida submarina” (*Objetivos de Desarrollo Sostenible | Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo*, n.d.), y va a contribuir al Proyecto “Strengthening the Climate change, ecosystems and livelihood nexus in coastal zones of Ecuador through transdisciplinary research and innovate teaching (CELICE)”, dirigido por Alba Calles PhD.

Actualmente, es importante mantener en buenas condiciones el cultivo de *Kirchneriella sp.*, en el laboratorio de Bentos de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL, ya que servirá de alimento para las larvas de la especie de cangrejo rojo *Ucides occidentalis*, a fin de lograr una mayor supervivencia de las larvas de cangrejo en laboratorio, por ello se está experimentando con la dieta, pues es una base de la alimentación de estos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Inhibir la proliferación de protozoarios presentes en el cultivo de *Kirchneriella sp.*, a través de los compuestos secretados por las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis*, para la mejora del cultivo de la microalga.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Medir la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* que determine la efectividad de las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el medio de cultivo a concentraciones de 5 y 9 ppt de salinidad.
2. Determinar la interacción de las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* mediante el análisis estadístico de los tratamientos aplicados para el mantenimiento de un ambiente óptimo de crecimiento de las microalgas *Kirchneriella sp.*

1.4 Marco teórico

1.4.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos similares a las plantas (Sial et al., 2020) que habitan tanto en ecosistemas marinos, como de agua dulce (Dolganyuk et al., 2020). Las microalgas reúnen todas las características que las califican como una opción de alimento acuícola sostenible excepcional (Mishra et al., 2023), ya que son una fuente de productos biológicamente valiosos (Dolganyuk et al., 2020), con una gama alta de aplicaciones (Aoyagi et al., 2023).

1.4.2 Cultivo de microalgas

Debido al alto potencial que tienen las microalgas en diversos campos, el cultivo de estos microorganismos ha generado un gran interés en los últimos años (Durán et al., 2018). Dependiendo de la especie cultivada, el medio propicio para el cultivo de microalgas debe incluir elementos inorgánicos como nitrógeno (N) y fósforo (P) (Durán et al., 2018), y otros nutrientes, como los oligoelementos magnesio (Mg), azufre (S), calcio (Ca), sodio (Na), cloro (Cl), hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), boro (B) y cobalto (Co), con énfasis en Mg, S y Fe (Dolganyuk et al., 2020).

1.4.3 Beneficios de las microalgas en acuicultura

Las microalgas tienen el potencial de proporcionar soluciones viables como alimentos acuícolas de mejor calidad, dado que son ricas en proteínas y carbohidratos, fácilmente digeribles, apetitosas y proporcionan aminoácidos esenciales, pigmentos, carotenoides, antioxidantes, vitaminas, polisacáridos, ácidos grasos omega-3 (Aoyagi et al., 2023; Mishra et al., 2023).

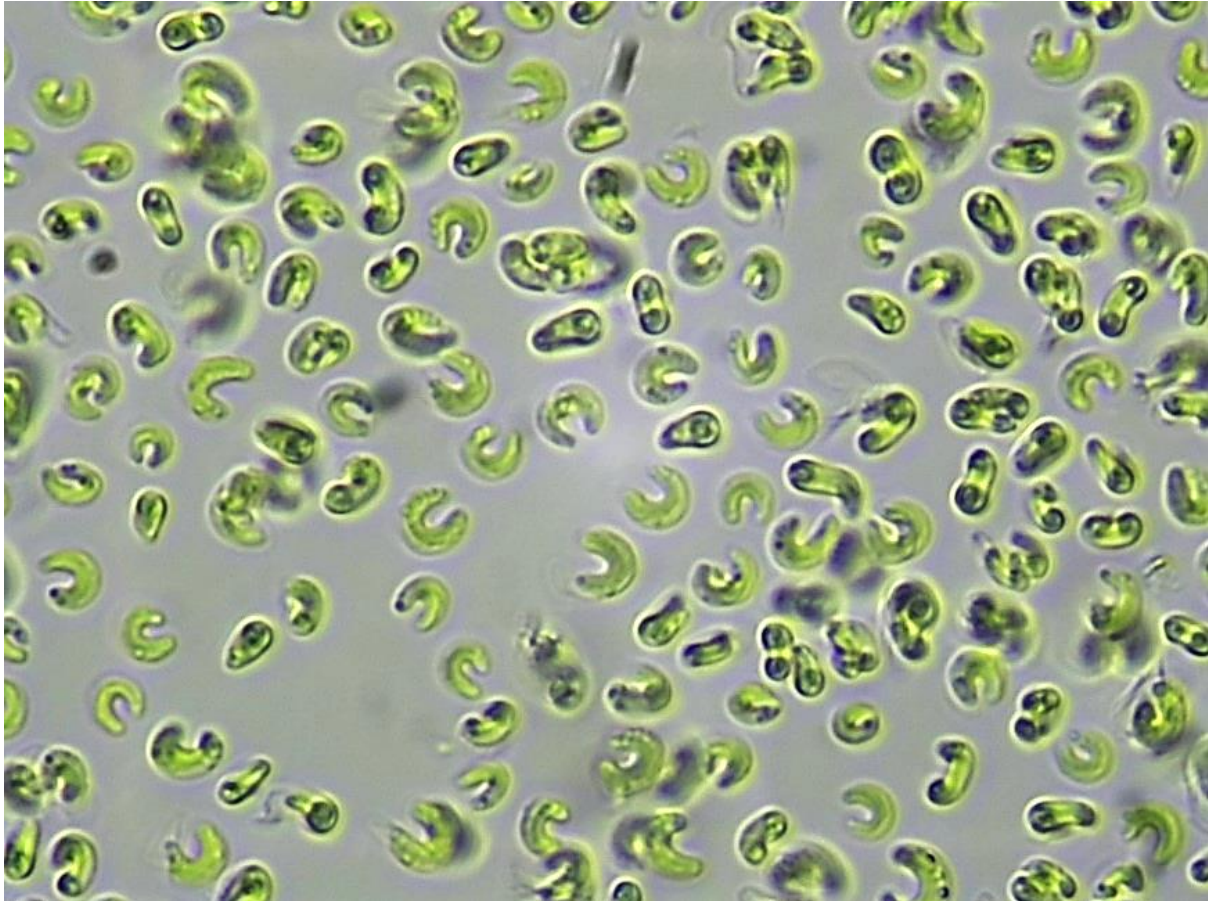
1.4.4 *Kirchneriella sp.*

Kirchneriella sp. es un género de microalga unicelular perteneciente a la familia *Selenastraceae*, pertenece al grupo monofilético de la clase *Chlorophyceae* (*Taxonomy Browser:: AlgaeBase*, n.d.), de gran utilidad como alimento para larvas de crustáceos (Kandathil Radhakrishnan et al., 2020), tiene células arqueadas, en forma de medialuna, cilíndrico-fusiformes (irregularmente curvadas) e incluso sigmoides (da Silva et al., 2013), cuyos extremos son puntiagudos, redondos, puntiagudos o redondos. Se reproduce asexualmente mediante autoesporas (*Taxonomy Browser: AlgaeBase*, n.d.) dispuestas en serie dentro de la pared celular madre o, de manera menos común en disposición paralela.

Las autoesporas son liberadas a partir de la ruptura de la pared de la célula madre, a continuación, los restos de la pared de la célula madre permanecen dentro del mucílago colonial (da Silva et al., 2013). Cada célula contiene un cloroplasto (*Kirchneriella Sp. - 2404 - Biodiversidad Virtual / Mundo Microscópico*, n.d.), estos organelos celulares le proporcionan su color verde característico.

Figura 1.1

Células de la microalga Kirchneriella sp.



Nota. La figura muestra a las microalgas *Kirchneriella sp.* observadas a través del microscopio en el laboratorio de Bentos, de la FIMCM.

1.4.5 Proliferación de protozoarios en el cultivo de microalgas:

Entre los desafíos del cultivo de microalgas ya sea a escala comercial o de laboratorio, figuran los microorganismos contaminantes como los protozoos depredadores de microalgas, los cuales generan estrés e impactan de manera adversa la salud (Reese et al., 2021) de estas clorofitas, ya que, resulta en la reducción de la densidad de la población de microalgas en el cultivo.

Figura 1.2

Protozoarios presentes en el cultivo de Kirchneriella sp.



Nota. La figura muestra la presencia de protozoarios presentes en el cultivo de las microalgas *Kirchneriella sp.* observadas mediante el microscopio en el laboratorio de Bentos, de la FIMCM.

1.4.6 Bacterias beneficiosas en acuicultura

Las bacterias beneficiosas en el área acuícola son los principales descomponedores de la materia orgánica en el medio ecológico acuático (Ji et al., 2018), promueven el crecimiento, ayudan a la reproducción y mejoran la resistencia a organismos patógenos en microalgas (Li et al., 2023). Dicho lo anterior, las bacterias beneficiosas pueden ser utilizadas para proveer una alimentación eficiente a organismos bioacuáticos, así como también son claves en la gestión de la calidad del agua (Arun & Midhun, 2023).

1.4.7 *Acetobacter peroxydans*

Las bacterias del ácido acético se caracterizan por su gran capacidad de oxidar una variedad de sustratos en el periplasma (Peters et al., 2017). Como señala (De Ley & Vervloet, 1961), las células en reposo de *Acetobacter peroxydans* exhiben una marcada actividad peroxidasa. Los compuestos bioactivos de las cepas de *Acetobacter peroxydans* reflejados en la tabla 1.1, les permite subsistir en condiciones ambientales adversas. También es capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía (Gaballa et al., 2021).

Tabla 1.1

Compuestos bioactivos presentes en Acetobacter peroxydans

Compuestos producidos por <i>Acetobacter peroxydans</i>					
Enzimas		Ácidos	Quinonas	Piruvato	Peroxidasas
Catalasa	Actividad enzimática	Ácido acético, Ácido 2-ceto-glucónico.	Q-9		D, L-lactato, lactato, etanol, acetaldehído formiato, hidrógeno molecular y p-fenilendiamina
	+				

1.4.8 *Bacillus yapensis*

Como señala (Xu et al., 2020), *Bacillus yapensis* es formadora de endosporas con múltiples flagelos con capacidad de producir una amplia gama de compuestos antimicrobianos activos. Por lo general una sola cepa de *Bacillus* es capaz de producir diversos tipos de moléculas estables en un amplio rango de pH y temperatura, estas sustancias por lo general son compuestos basados en proteínas y péptidos, como enzimas, bacteriocinas y lipopéptidos (Baruzzi, 2011), (Yuki Tsukakoshi, 2022), tal como se resume en la tabla 1.2. Los

lipopéptidos (LP), son una clase de péptidos antimicrobianos naturales, principalmente producidos por *Bacillus spp* (HOU Zhengjie, 2021).

Tabla 1.2

Compuestos bioactivos presentes en Bacillus yapensis

Compuestos producidos por <i>Bacillus yapensis</i>					
Enzimas		Lipopéptidos	Lípidos polares	Quinona	Ubiquinona
	Actividad enzimática			Q-9	MK-7
Fosfata ácida	+/-	Surfactina	Difosfatidil		
Fosfata alcalina	+/-	Iturina	gli-cerol		
Alfa-quimotripsina	+/-	Fengicina	(DPG)		
Alfa-fucosidasa	+		Fosfatidilgli		
Alfa-glucosidasa	+		ce-rol (PG)		
Alfa-manosidasa,	+/-		Fosfatidileta		
Beta-glucosidasa,	+		nolamina		
Catalasa,	+		(PE)		
Citocromo oxidasa	+				
Esterasa (C 4)	+				

1.4.9 Interacción entre microalgas y bacterias

La sinergia entre microalgas y bacterias influye en el crecimiento del fitoplancton, lo cual representa un importante avance en la biotecnología de microalgas (Li et al., 2023), debido a que en el medio acuático las bacterias descomponen la materia orgánica, mientras que las microalgas absorben nutrientes, es decir, estos dos tipos de microorganismos por lo general intercambian micronutrientes (vitaminas) y macronutrientes como nitrógeno (Choudhary et al., 2022), oxígeno y carbono durante la coexistencia, lo cual se ve reflejado en la mejora de la productividad y la calidad de la biomasa (Sial et al., 2020).

Capítulo 2

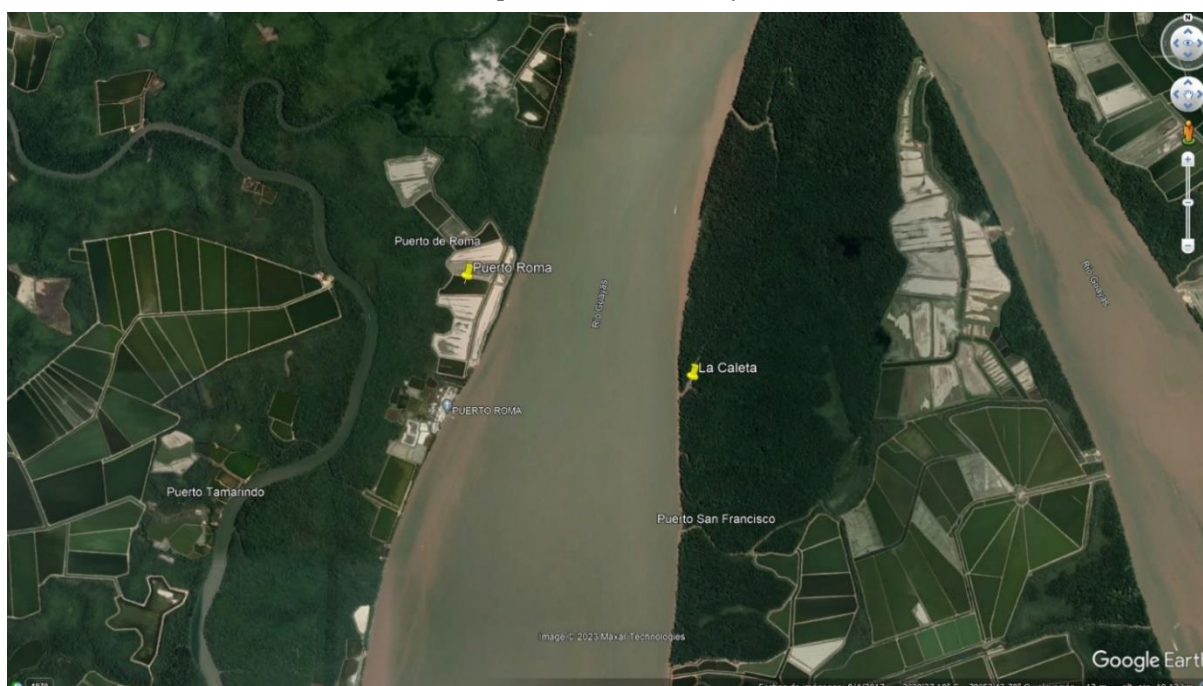
2. Metodología

2.1 Recolección de la muestra de agua de manglar

El agua de manglar utilizada en el presente estudio fue recolectada de la Zona La Caleta, ubicado en las coordenadas (2°30'46.13"S 79°51'40.27"W. Figura 2.1) en el golfo interino de Guayaquil al frente de la comunidad Puerto Roma durante junio de 2023. La muestra fue almacenada en un bidón plástico estéril de 20 litros de capacidad, seguidamente se la transportó al laboratorio de Bentos de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL para su posterior análisis.

Figura 2.1

Ubicación de la Zona La Caleta en la provincia del Guayas (Ecuador)



Nota. La figura muestra el lugar en el que se recolectó la muestra de agua de manglar para los análisis del primer, segundo y tercer ensayo del presente proyecto. Tomado de Google Earth, 2023

2.2 Medición de salinidad

Al llegar el agua de manglar al laboratorio de Bentos de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL, se procedió a medir la salinidad de la muestra de

agua de manglar obtenida mediante el uso del refractómetro ATAGO™ Master- α R, ATC, de lo cual fue posible conocer la salinidad del agua, la cual fue de 3 ppt.

2.3 Observación de la muestra de agua de manglar

A fin de verificar la existencia de protozoarios en la muestra de agua de manglar recolectada, se procedió a observarla a través del Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5.

2.4 Primer ensayo

Comportamiento de los protozoarios en agua de estuario tratada y sin tratar frente a *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis*

Para observar el comportamiento de los protozoarios ante los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis*, inicialmente se colocaron 500 ml de agua de manglar en 3 diferentes frascos para laboratorio Boeco Germany boro 3.3.

El agua contenida en el primer frasco se procedió a esterilizar mediante la autoclave GEMMY SA-300H para su posterior uso en el tratamiento C3, P3, Y3 y PY3. El agua del segundo frasco fue esterilizada durante 10 minutos a través del uso del Ozonificador AH1000 Ozono para ser utilizada como parte del tratamiento C2, P2, Y2 y PY2, mientras que la tercera muestra permaneció en su condición original a fin de ser utilizada como parte del tratamiento C1, P1, Y1 y PY1.

Una vez listas las respectivas muestras de agua se procedieron a colocar 3 réplicas de 25 ml de cada tratamiento en tubos de ensayo Pyrex™, posteriormente se utilizó la cámara de flujo laminar Jouan MSC 9 junto a la micropipeta Finnpipette® F2 Thermo Scientific para inocular 1 ml de los respectivos extractos de bacterias en los correspondientes tratamientos.

Durante 7 días se llevaron a cabo observaciones diarias mediante el Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5 a fin de observar

el comportamiento de los protozoarios tratados con los extractos bacterianos, para de este modo determinar el impacto que tienen los extractos bacterianos en los protozoarios.

Tabla 2.1

*Tratamientos utilizados para la observación del comportamiento de los protozoarios frente a los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis**

Tratamiento	C1	C2	C3	P1	P2	P3	Y1	Y2	Y3	PY1	PY2	PY3
Agua de manglar (ml)	25			25			25			25		
Agua de manglar ozonificada (ml)		25			25			25			25	
Agua de manglar autoclavada (ml)			25			25			25			25
<i>Acetobacter peroxydans</i> (ml)				1	1	1				1	1	1
<i>Bacillus yapensis</i> (ml)							1	1	1	1	1	1

Nota. Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento.

2.5 Segundo ensayo

Efecto que tienen los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*

Siguiendo el proceso de producción de microalgas, figura 2.2, llevado a cabo en el laboratorio de bentos de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL se extrajo las microalgas *Kirchneriella sp.* para ver el efecto que tienen los extractos de las bacterias probióticas *A. peroxydans* y *B. yapensis* en el cultivo de microalgas, en el cual había presencia de protozoarios; para ello, inicialmente se colocaron 500 ml de agua de manglar en cada uno de los 3 diferentes frascos para laboratorio Boeco Germany boro 3.3.

Figura 2.2
Producción de microalgas



Nota. La figura muestra el proceso de cultivo de microalgas llevado a cabo en el laboratorio de bentos, de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la cual se tomaron las muestras de *Kirchneriella sp.*

A fin de asegurar un esquema libre de contaminantes se procedió a esterilizar el agua contenida en el primer frasco mediante la autoclave GEMMY SA-300H para su posterior uso en el tratamiento C3, P3, Y3 y PY3 a 5 ppt, y a 9 ppt, mientras que el agua del segundo frasco fue esterilizada durante 10 minutos a través del uso del Ozonificador AH1000 Ozono para ser utilizada como parte del tratamiento C2, P2, Y2 y PY2 a 5 ppt, así y a 9 ppt; sin embargo, la

tercera muestra permaneció en su condición original a fin de ser utilizada como parte del tratamiento control C1, P1, Y1 y PY1 a 5 ppt y 9 ppt respectivamente.

A continuación, se procedieron a colocar 3 réplicas de 20 ml de cada tratamiento en tubos de ensayo Pyrex™, en el caso de los tratamientos para salinidad 9 ppt, en promedio se inocularon células de la microalga *Kirchneriella sp.* en cada tubo de ensayo, mientras que para 5 ppt de salinidad en promedio se inocularon células de *Kirchneriella sp.*, cada uno de los tratamientos mencionados se detallan en la tabla 2.2. Luego se utilizó la cámara de flujo laminar Jouan MSC 9 junto a la micropipeta Finnpiptette ® F2 Thermo Scientific para inocular 1 ml de los respectivos extractos de bacterias en los correspondientes tratamientos.

Posteriormente, se procedió a medir la salinidad de cada una de las muestras mediante el refractómetro ATAGO™ Master- α R, ATC, a fin de comprobar que finalmente los tratamientos estaban en 5 y 9 ppt de manera correspondiente. Luego se procedió a verificar la medición de luz del área a partir del luxómetro portátil Milwaukee MW700 PRO-LUX (Light), de lo cual se verificó que el área en la cual permanecerían los tratamientos se encuentre en 358 lx para que las microalgas permanezcan en las condiciones apropiadas para su desarrollo.

Por el lapso de 7 días se llevaron a cabo observaciones diarias mediante el Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5 y la cámara de recuento de Neubauer Marienfeld a fin de medir la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* Finalmente, en el séptimo día de tratamiento se procedió a medir el oxígeno disuelto en cada una de las muestras de los respectivos tratamientos con el medidor portátil de oxígeno disuelto HI9146 HANNA.

Tabla 2.2

Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de Kirchneriella sp. en el cual había presencia de protozoarios (segundo ensayo)

Tratamiento	C1	C2	C3	P1	P2	P3	Y1	Y2	Y3	PY1	PY2	PY3
Agua de manglar (ml)	10			10			10			10		
Agua de manglar ozonificada (ml)		10			10			10			10	
Agua de manglar autoclavada (ml)			10			10			10			10
<i>Acetobacter peroxydans</i> (ml)				1	1	1				1	1	1
<i>Bacillus yapensis</i> (ml)							1	1	1	1	1	1
<i>Kirchneriella sp.</i> (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Nota. Cada uno de los tratamientos descritos en la tabla adjunta se utilizaron en una salinidad de 5 ppt, así como también a una salinidad de 9 ppt. Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento.

2.6 Tercer ensayo

Efecto que tienen los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*

Considerando los resultados del segundo ensayo se decidió realizar un tercer ensayo, en el cual se modificó el volumen del extracto bacteriano inoculado, así como también las observaciones realizadas se realizaron únicamente durante el primer y el último día de haber aplicado cada uno de los tratamientos.

Inicialmente se agregaron 500 ml de agua de manglar en 3 diferentes frascos para laboratorio Boeco Germany boro 3.3. El agua contenida en el primer frasco se procedió a esterilizar mediante la autoclave GEMMY SA-300H para su posterior uso en el tratamiento C3, P3, Y3 y PY3 a 5 ppt, y a 9 ppt. El agua del segundo frasco fue esterilizada durante 10 minutos a través del uso del Ozonificador AH1000 Ozono para ser utilizada como parte del tratamiento C2, P2, Y2 y PY2 a 5 ppt, así y a 9 ppt, mientras que la tercera muestra permaneció en su condición original a fin de ser utilizada como parte del tratamiento control C1, P1, Y1 y PY1 a 5 ppt y 9 ppt respectivamente.

Una vez listas las muestras de agua se procedieron a colocar 3 réplicas de 20 ml de cada tratamiento en tubos de ensayo Pyrex™, en el caso de los tratamientos para salinidad 9 ppt, tras lo cual se inoculó la microalga *Kirchneriella sp.* en cada uno de los tratamientos, en la tabla 2.3 se detalla el volumen de cada uno de los compuestos utilizados en esta fase.

Tabla 2.3

Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de Kirchneriella sp. en el cual había presencia de protozoarios (tercer ensayo)

Tratamiento	C1	C2	C3	P1	P2	P3	Y1	Y2	Y3	PY1	PY2	PY3
Agua de manglar (ml)	10			10			10			10		
Agua de manglar ozonificada (ml)		10			10			10			10	
Agua de manglar autoclavada (ml)			10			10			10			10
<i>Acetobacter peroxydans</i> (ml)				0.1	0.1	0.1				0.1	0.1	0.1
<i>Bacillus yapensis</i> (ml)							0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Kirchneriella sp.</i> (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Nota. En cada uno de los tratamientos descritos en la tabla adjunta se utilizaron en una salinidad de 5 ppt, así como también a 9 ppt de salinidad. Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento.

Seguidamente se procedió a medir la salinidad de cada una de las muestras mediante el refractómetro ATAGO™ Master- α R, ATC, a fin de comprobar que finalmente los tratamientos estaban en 5 y 9 ppt de manera correspondiente. Luego se procedió a verificar la medición de luz del área a partir del luxómetro portátil Milwaukee MW700 PRO-LUX (Light), de lo cual se verificó que el área en la cual permanecerían los tratamientos se encuentre en 358 lx para que las microalgas permanezcan en las condiciones apropiadas para su desarrollo.

Por el lapso de 7 días se proveyó oxígeno a cada una de las muestras mediante agitación, en el día 1 y 7 se observó cada una de las muestras mediante el Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5 y la cámara de recuento de Neubauer Marienfeld a fin de medir la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* Finalmente, se procedió a medir el oxígeno disuelto en cada una de las muestras de los respectivos tratamientos con el medidor portátil de oxígeno disuelto HI9146 HANNA.

2.7 Cuarto ensayo

Efecto que tienen los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*

Teniendo en cuenta los resultados del tercer ensayo, se procedió a realizar un cuarto ensayo, en el cual nuevamente se modificó el volumen del extracto bacteriano inoculado, así como también ya no se hizo uso del agua de manglar, sino más bien se procedió a utilizar agua purificada mediante el destilador de agua Stuart A4000 Aquatron, se colocó 500 ml de agua destilada en 2 diferentes frascos para laboratorio Boeco Germany boro 3.3.

El agua contenida en el primer frasco fue llevada a 5 ppt de salinidad, para ello se pesó en la balanza analítica KERN ALT 310-4AM 2.5 g de sal libre de toxinas, mientras que para llevar a 9 ppt el agua contenida en el segundo frasco, se procedió a pesar 4.5 g de sal del libre de contaminantes, las muestras de sal luego fueron colocadas en los respectivos frascos.

A fin de verificar que las muestras de agua tengan la salinidad requerida nuevamente se hizo uso del refractómetro ATAGO™ Master- α R, ATC, y posteriormente las muestras de agua fueron esterilizadas mediante la autoclave GEMMY SA-300H para su posterior uso en los tratamientos C, P, Y y PY a 5 ppt, y a 9 ppt respectivamente, cabe mencionar que se estudiaron 3 réplicas para cada tratamiento.

Una vez que las muestras de agua fueron autoclavadas se procedió a colocar 10 ml de agua en 12 tubos de ensayo para cada tipo de salinidad, y posteriormente se inoculó 10 ml de la microalga *Kirchneriella sp.* y 0.1 ml de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en los respectivos tratamientos.

Tabla 2.4

Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de Kirchneriella sp. con presencia de protozoarios

Tratamiento	C	P	Y	PY
Agua destilada (ml)	10	10	10	10
<i>Acetobacter peroxydans</i> (ml)		0.1		0.1
<i>Bacillus yapensis</i> (ml)			0.1	0.1
<i>Kirchneriella sp.</i> (ml)	10	10	10	10

Nota. Cada uno de los tratamientos descritos en la tabla adjunta se utilizaron en una salinidad de 5 ppt, así como también a 9 ppt de salinidad. Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento.

Luego se procedió a verificar la medición de luz del área a partir del luxómetro portátil Milwaukee MW700 PRO-LUX (Light), de lo cual se verificó que en área en la cual permanecerían los tratamientos se encuentre en 358 lx para que las microalgas permanezcan en las condiciones apropiadas para su desarrollo. Durante el primer día de cada uno de los tratamientos se procedió a medir el oxígeno disuelto de cada una de las muestras mediante el medidor portátil de oxígeno HI9146 HANNA.

Por el lapso de 7 días se proveyó oxígeno a cada una de las muestras mediante agitación, al séptimo día de tratamiento cada una de las muestras fueron observadas en el Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5 y la cámara de recuento de Neubauer Marienfeld a fin de medir la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* Finalmente se procedió nuevamente a medir el oxígeno disuelto en cada una de las muestras de los respectivos tratamientos con el medidor portátil de oxígeno disuelto HI9146 HANNA.

2.8 Quinto ensayo

Efecto que tienen los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*

A fin de determinar el volumen preciso del extracto bacteriano inoculado requerido para inhibir la proliferación de protozoarios, así como también para mejorar la densidad de crecimiento de *Kirchneriella sp.*, se procedió a realizar un último ensayo, para ello nuevamente se hizo uso de agua purificada mediante el destilador de agua Stuart A4000 Aquatron, se agregaron 500 ml de agua destilada en 2 diferentes frascos para laboratorio Boeco Germany boro 3.3.

El agua contenida en el primer frasco fue llevada a 5 ppt de salinidad, para ello se pesó en la balanza analítica KERN ALT 310-4AM 2.5 g de sal libre de yodo, mientras que para llevar a 9 ppt el agua contenida en el segundo frasco, se procedió a pesar 4.5 g de la misma sal, las muestras de sal luego fueron colocadas en los respectivos frascos. Los tratamientos utilizados en esta etapa se describen en la tabla 2.5.

Para verificar que las muestras de agua tengan la salinidad requerida nuevamente se hizo uso del refractómetro ATAGO™ Master- α R, ATC, y posteriormente las muestras de agua fueron esterilizadas mediante la autoclave GEMMY SA-300H para su posterior uso en los

tratamientos C, P, Y y PY a 5 y 9 ppt de salinidad respectivamente, cabe mencionar que se analizaron 3 réplicas para cada tratamiento.

Una vez que las muestras de agua fueron autoclavadas se procedió a colocar 10 ml de agua en 12 tubos de ensayo para cada tipo de salinidad, y posteriormente se inocularon 10 ml de la microalga *Kirchneriella sp.* y 0.4 ml de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en los respectivos tratamientos.

Mediante el medidor portátil de oxígeno disuelto HI9146 HANNA se procedió a medir el oxígeno disuelto en cada una de las muestras de los respectivos tratamientos tanto el primer día del ensayo como al día séptimo.

Por el lapso de 7 días se proveyó oxígeno a cada una de las muestras mediante agitación; tanto el primer y séptimo día del tratamiento se observaron cada una de las muestras en el Microscopio Motic BA310 LED Digital utilizando como complemento la cámara MOTICAM A5 y la cámara de recuento de Neubauer Marienfeld para medir la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.*

Tabla 2.5

Tratamientos utilizados para observar el efecto de los extractos bacterianos en el cultivo de Kirchniriella sp. con presencia de protozoarios (quinto ensayo)

Tratamiento	C	P	Y	PY
Agua destilada (ml)	10	10	10	10
<i>Acetobacter peroxydans</i> (ml)		0.4		0.4
<i>Bacillus yapensis</i> (ml)			0.4	0.4
<i>Kirchneriella sp.</i> (ml)	10	10	10	10

Nota. Cada uno de los tratamientos descritos en la tabla adjunta se utilizaron en una salinidad de 5 ppt, así como también a 9 ppt de salinidad.

2.9 Análisis estadístico y de datos

El efecto que tienen los tratamientos ante la presencia de protozoarios, densidad de crecimiento y oxígeno disuelto durante los siete días de los respectivos ensayos se determinaron mediante

el análisis estadístico ANOVA de medidas repetidas utilizando el programa Jamovi, luego del ANOVA se determinaron las diferencias significativas entre los tratamientos a partir de la prueba de Tukey. Cuando $p < 0.05$, el efecto de las diferencias entre los tratamientos analizados fue considerado significativo.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Comportamiento de los protozoarios frente a *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis*

Cabe mencionar que este es el primer estudio que se lleva a cabo con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el área acuícola. Por tal razón, hasta la fecha se desconoce en cuanto a un producto comercial a base de los extractos de estas bacterias probióticas que se comercialice como insumo para acuicultura. Debido al potencial que estos microorganismos tienen como bacterias probióticas se ha realizado la presente investigación.

La tabla 3.1, muestra la cantidad de individuos de protozoarios con las que se inició (0h) en las diferentes muestras de agua previo a suministrar los diferentes tratamientos, por tal razón, durante el primer día no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Además, se evidencia el resultado del efecto que mostraron los extractos bacterianos *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* ante la presencia de protozoarios en diferentes muestras de agua de manglar que previamente fueron tratadas mediante ozonificación y autoclavado, tratamientos: C2, C3, P2, P3, PY2, PY3, Y2 y Y3 respectivamente.

Tal como ante los respectivos controles (agua de manglar sin tratar), tratamientos: C1, P1, Y1 y PY1 durante la primera experimentación. A las 72 horas de haber suministrado los extractos bacterianos a los tratamientos P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3 se evidenció significancia estadística ($p < 0.05$) entre los controles C1, C2, y C3 con relación a los demás tratamientos. Los tratamientos P1, P2, PY1, PY2, Y1, Y2 y Y3 fueron significativamente similares, mientras que el tratamiento con *Acetobacter peroxydans* (P3), y el tratamiento al que se le suministró tanto *Acetobacter peroxydans* como *Bacillus yapensis* (PY3), en los cuales las

muestras de agua fueron previamente autoclavadas se logró inhibir mayor cantidad de protozoarios.

Tabla 3.1 Efecto de los tratamientos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* ante la presencia de protozoarios en muestras de aguas estuarinas del Golfo de Guayaquil. Se reporta el número de individuos de protozoarios (promedio \pm desviación estándar) registrados en el primer, tercer, sexto y séptimo día del primer ensayo para cada uno de los tratamientos: C1, C2, C3, P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA de medidas repetidas y la comparación múltiple de Tukey.

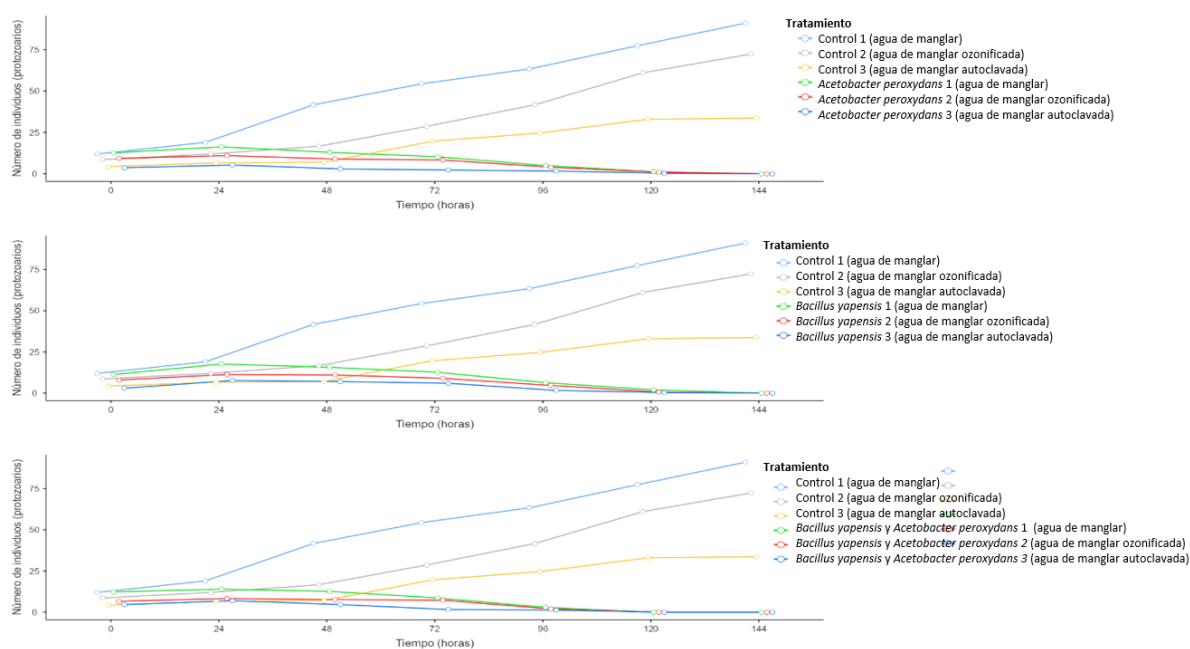
Tratamiento	Horas			
	0 h	72 h	120h	144 h
C1	12.0 \pm 4.36a	54.3 \pm 10.7 ^d	77.3 \pm 64.0 ^c	91.0 \pm 11.5 ^b
C2	8.67 \pm 4.73a	28.7 \pm 0.58 ^c	61.0 \pm 22.9 ^{bc}	72.3 \pm 92.6 ^{ab}
C3	4.33 \pm 6.66a	19.7 \pm 9.29 ^{bc}	33.0 \pm 14.1 ^{abc}	33.7 \pm 3.79 ^{ab}
P1	12.7 \pm 3.79a	10.3 \pm 5.51 ^{ab}	1.33 \pm 1.53 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P2	9.33 \pm 4.51a	8.33 \pm 2.08 ^{ab}	1.00 \pm 1.73 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P3	3.67 \pm 5.51 a	2.33 \pm 4.04 ^a	0.33 \pm 0.58 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY1	12.3 \pm 6.66 a	8.67 \pm 3.51 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY2	6.67 \pm 7.64 a	7.33 \pm 2.52 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY3	4.67 \pm 5.69 a	1.67 \pm 1.15 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y1	11.3 \pm 5.13 a	12.7 \pm 4.04 ^{ab}	2.00 \pm 3.46 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a
Y2	8.00 \pm 5.20 a	9.00 \pm 4.58 ^{ab}	0.67 \pm 1.15 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y3	3.00 \pm 4.36 a	6.00 \pm 4.58 ^{ab}	0.33 \pm 0.58 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a

Las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* mostraron sinergia al inhibir en totalidad a los protozoarios a las 120 horas de haber sido suministradas a los tratamientos PY1, PY2 y PY3; mientras que en cada uno de los controles se evidencia una proliferación significativa de protozoarios, cabe mencionar que la muestra de agua de manglar que fue utilizada en su estado original (C1) mostró una mayor proliferación diaria de protozoarios, en relación a los controles en los cuales se utilizó agua de manglar autoclavada u ozonificada.

Por último, a las 72 horas de haber suministrado los respectivos tratamientos se evidenció una inhibición total de protozoarios en los tratamientos en los que se inoculó los respectivos extractos bacterianos, por tal razón, no se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos ($p>0.05$).

Figura 3.1

Cantidad de individuos (protozoarios) en el lapso de 144 horas de haber suministrado los diferentes tratamientos en relación de los tratamientos control



Nota. Los tratamientos control C1, C2, y C3 se compararon con cada uno de los tratamientos en los que se inocularon los extractos bacterianos.

En tanto que, la mayor proliferación de protozoarios (91.0 ± 11.5) (número de individuos de protozoarios) se evidenció en la muestra de agua de manglar que no fue previamente tratada, el control C1 en relación con los demás tratamientos. Lo cual indica que cuando las muestras de agua de manglar son tratadas por medio del autoclave u ozonificación hay una proliferación menor de protozoarios, sin embargo, al ser tratadas con las bacterias probióticas *A. peroxydans* y *B. yapensis*, se logra una inhibición total de protozoarios (Figura 3.1).

3.2 Efecto de los extractos de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* ante la presencia de protozoarios

A fin de conocer el efecto inhibitorio ante la presencia de protozoarios por parte de *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* se llevaron a cabo 4 ensayos a dos diferentes salinidades: 5 y 9 ppt, a continuación, se detallan los resultados más relevantes:

En el quinto ensayo se trabajaron únicamente con 4 tratamientos y 3 controles para cada uno. Acorde a los datos expuestos en la tabla 3.2, en el caso de los tratamientos analizados a 5 ppt de salinidad se observaron diferencias significativas entre ellos a las 144 horas del análisis, mientras que en cuanto a la cantidad de individuos (protozoarios) en las muestras tratadas con los extractos bacterianos no hubo diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Sin embargo, al comparar el tratamiento control con los demás, se evidencia significancia estadística ($p < 0.05$), en el caso de las muestras tratadas tanto con *A. peroxydans* y *B. yapensis* a la vez, se obtuvo mejores resultados en cuanto a la inhibición de protozoarios y la densidad de crecimiento. Cabe mencionar que se logró inhibir gran parte de la proliferación de protozoarios presentes en las muestras en estudio, de igual forma la densidad de crecimiento y la calidad de la microalga *Kirchneriella sp.* fue mucho mejor en comparación al tratamiento control.

En el caso de los tratamientos estudiados a 9 ppt de salinidad en el lapso de 144 horas hubo una disminución en la concentración de oxígeno disuelto en todos los tratamientos, pero el ppm de OD del tratamiento de control fue estadísticamente significativo en comparación al OD de los tratamientos tratados con los extractos bacterianos.

Además, la cantidad de individuos (protozoarios) presentes en las muestras de agua a las 144 horas de haber suministrado los tratamientos siguió el mismo patrón, en el caso de las

muestras tratadas con *A. peroxydans* y *B. yapensis* se logró inhibir en totalidad la presencia de protozoarios del cultivo de *Kirchneriella sp.*, sin embargo, la densidad de crecimiento de la microalga en este caso fue menor, mientras *Acetobacter peroxydans* mostró un excelente desempeño para incrementar la densidad de crecimiento de *Kirchneriella sp.*

En la figura 3.2, como en la figura 3.3 se observa que a medida que la densidad de crecimiento de las microalgas incrementa, el oxígeno disuelto disminuye; mientras que cuando la proliferación de protozoarios incrementó (C), la densidad de crecimiento de *Kirchneriella sp.* fue menor.

Tabla 3.2

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis ante la presencia de protozoarios en cultivo de Kirchneriella sp. Se reporta el oxígeno disuelto, el número de individuos de protozoarios y la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. (promedio \pm desviación estándar) registrados en el primer, y séptimo día del quinto ensayo para los tratamientos: C, P, PY, y Y. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA de medidas repetidas y la comparación múltiple de Tukey

Salinidad	Tratamiento	Oxígeno disuelto		Cantidad de individuos		Densidad de crecimiento	
		(ppm)		(protozoarios)		(células/ml)	
		0 h	144 h	0 h	144 h	0 h	144 h
5 ppt	C	6.02 \pm 0.58 ^a	6.24 \pm 0.19 ^c	7.75 \pm 4.27 ^a	18.3 \pm 5.38 ^b	57500 \pm 39211 ^a	121250 \pm 57500 ^a
	P	6.15 \pm 0.16 ^a	3.98 \pm 0.19 ^b	9.50 \pm 3.70 ^a	1.25 \pm 1.50 ^a	45000 \pm 9789 ^a	170000 \pm 38676 ^a
	PY	5.84 \pm 0.33 ^a	5.35 \pm 0.52 ^c	12.5 \pm 3.11 ^a	0.250 \pm 0.500 ^a	47500 \pm 11726 ^a	254375 \pm 258975 ^a
	Y	5.97 \pm 0.72 ^a	2.52 \pm 0.90 ^a	9.75 \pm 4.03 ^a	1.75 \pm 2.06 ^a	32500 \pm 22079 ^a	64375 \pm 6575 ^a
9 ppt	C	6.19 \pm 0.40 ^a	6.17 \pm 0.67 ^b	8.25 \pm 2.63 ^a	21.3 \pm 5.56 ^b	68750 \pm 43036 ^a	247500 \pm 83541 ^a
	P	6.05 \pm 0.19 ^a	3.23 \pm 0.47 ^a	8.25 \pm 1.26 ^a	2.25 \pm 0.96 ^a	111250 \pm 58612 ^a	578750 \pm 75540 ^b
	PY	5.68 \pm 0.49 ^a	3.15 \pm 0.23 ^a	8.00 \pm 5.72 ^a	0.00 \pm 0.0 ^a	84375 \pm 90171 ^a	142500 \pm 87226 ^a
	Y	5.62 \pm 0.52 ^a	2.81 \pm 0.98 ^a	9.75 \pm 2.50 ^a	1.5 \pm 1.29 ^a	68750 \pm 74540 ^a	200000 \pm 86289 ^a

Figura 3.2

Comparación del oxígeno disuelto, cantidad de individuos (protozoarios) y densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella* sp. a las 144 horas de haber inoculado los diferentes extractos bacterianos a 5 ppt de salinidad.

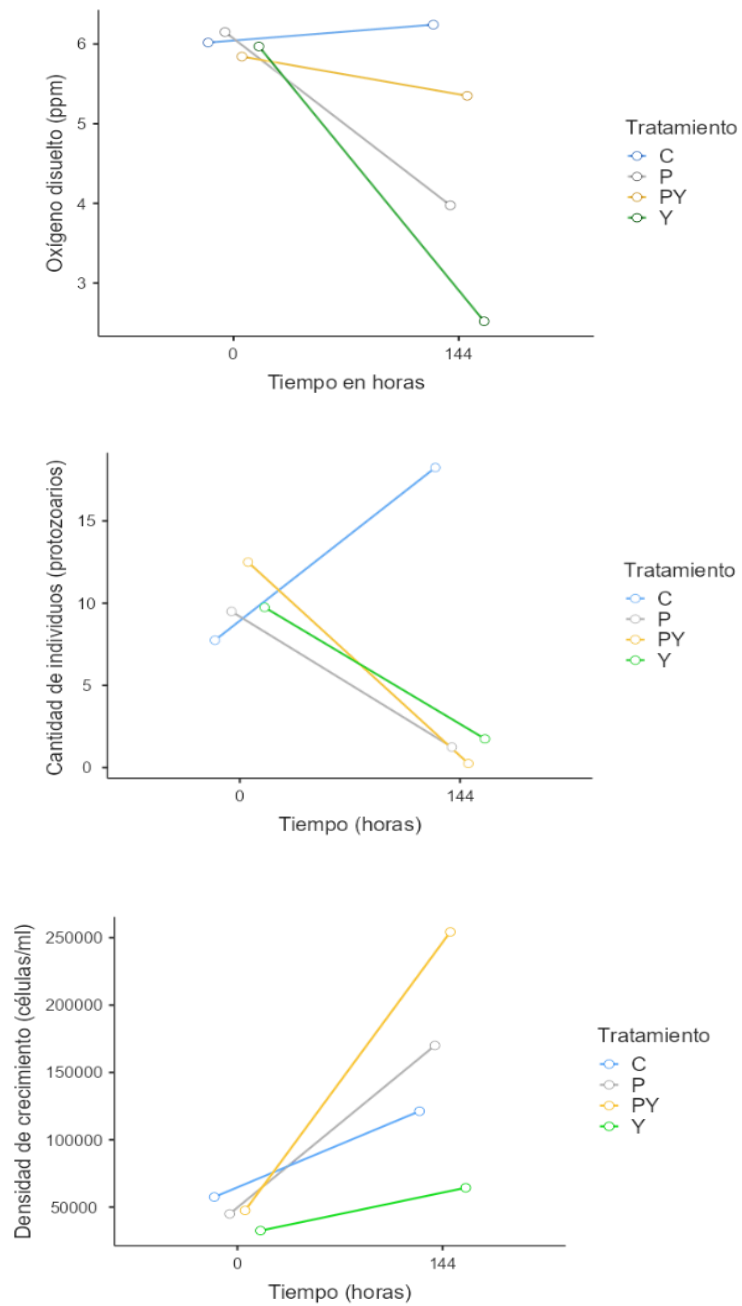
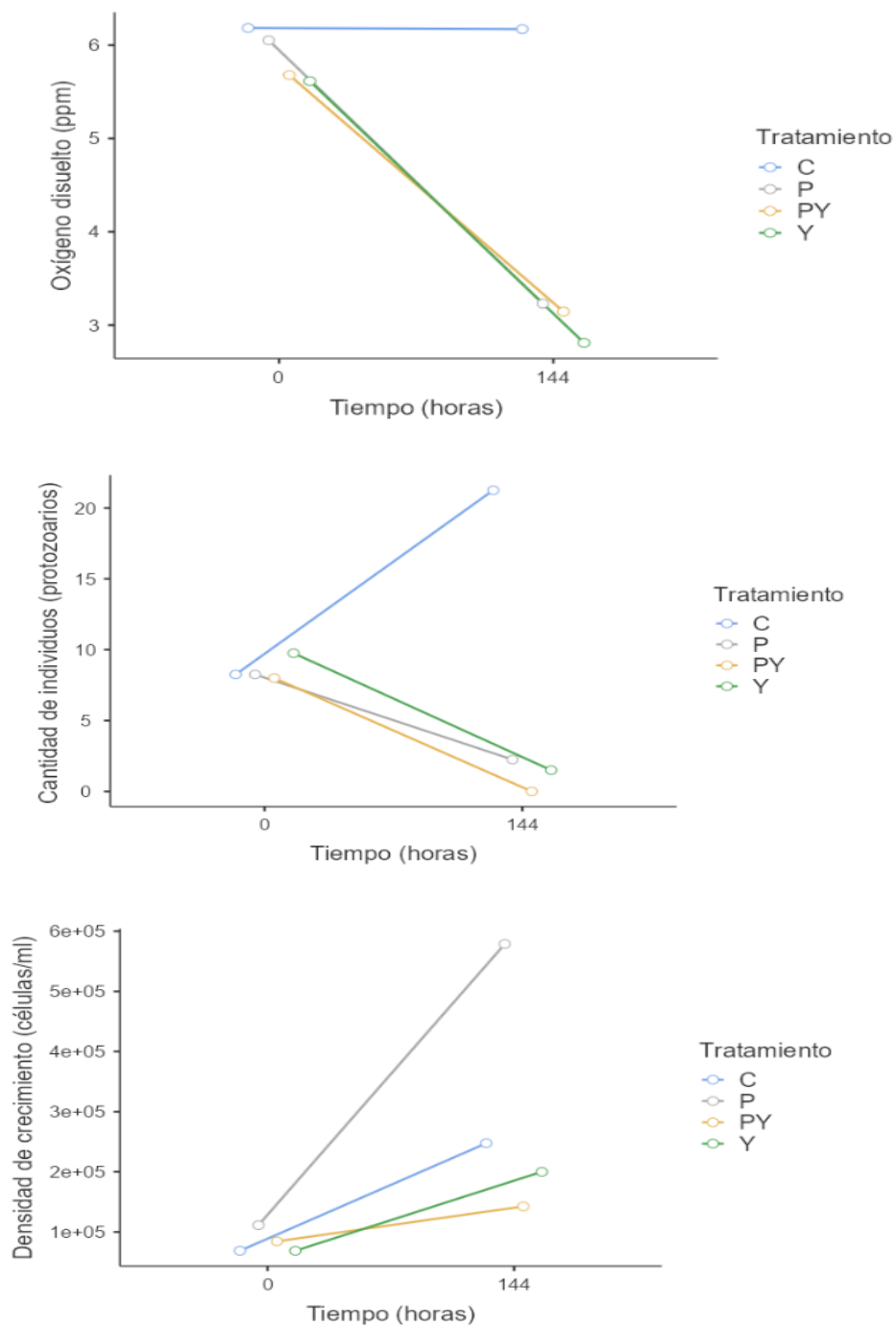


Figura 3.3

Comparación del oxígeno disuelto, cantidad de individuos (protozoarios) y densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella* sp. a las 144 horas de haber inoculado los diferentes extractos bacterianos a 9 ppt de salinidad.



3.3 Costos

La presente investigación impulsa la diversificación acuícola en el Ecuador, e implica gastos de materia prima, materiales, equipos, servicios básicos y presupuesto para transporte. La tabla 3.2 y la tabla 3.3 desglosan el presupuesto referencial de los recursos utilizados en la ejecución del presente estudio, dando como resultado un total de \$13,177.20. Cabe mencionar que los equipos y materiales utilizados en la metodología son propiedad de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL.

Tabla 3.3

Insumos utilizados en el desarrollo de la metodología del presente proyecto

Cantidad	Concepto	Costo	Costo
		Unitario (\$)	total (\$)
1	Bidón plástico estéril de 20 litros	20.00	20.00
1	Refractómetro atago™ master- α r, atc	350.00	350.00
3	Fascos para laboratorio boeco germany boro 3.3	14	42
1	Autoclave gemmy sa-300h	2,766.35	2,766.35
1	Ozonificador ah1000 ozono	93	93
40	Tubos de ensayo pyrex™ (72)	2.50	100
3	Tubo falcom de 10 ml	0.70	2.10
1	Cámara de flujo laminar jouan msc 9	4,000.00	4,000.00
1	Micropipeta finnpipette® f2 thermo scientific	98.00	98
25	Punta para micropipeta	0.47	11.75
1	Microscopio motic ba310 led digital	3,398.00	3,398.00
1	Cámara moticam a5	473.00	473.00
1	Luxómetro portátil milwaukee mw700 pro-lux	154.00	154.00
1	(light)	54.00	54.00
1	Cámara de recuento de neubauer marienfeld	672.00	672.00
1	Medidor portátil de oxígeno disuelto hi9146 hanna.	550.00	550.00
4	Aire acondicionado	25.00	100.00
1	Gradillas	2.00	2.00

1	Jabón neutro	2.00	2.00
1	Caja de mascarillas	9.00	9.00
-	Caja de guantes	-	-
-	Microalga <i>Kirchneriella sp.</i>	-	-
-	<i>Acetobacter peroxydans</i>	-	-
-	<i>Bacillus yapensis</i>	70	70
	Servicios públicos (agua, luz e internet)		
	Total		12,967.20

Tabla 3.4*Presupuesto para transporte*

Transporte	Salidas	Total
Salida hacia el golfo de Guayaquil	1	\$ 115
Transporte de ESPOL (buses y taxis)	35	\$ 95
Total		\$210

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

El presente estudio, “Estrategias de manejo con bacterias beneficiosas para mejorar la calidad de cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*” es el primer trabajo que se lleva a cabo con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el área acuícola, y estuvo orientado a la inhibición de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.*, para ello se realizaron varios ensayos en volúmenes pequeños. Este trabajo queda para seguir siendo probado en mayor volumen y para una posterior aplicación de la microalga *Kirchneriella sp.* tratada con las bacterias probióticas *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* suministradas como alimento al cultivo de larvas del cangrejo rojo *Ucides occidentalis*.

4.1 Conclusiones

- Las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* mostraron tener un efecto significativo en la inhibición de la proliferación de protozoarios. Este resultado fue más notable cuando las muestras de agua de manglar fueron previamente tratadas con autoclave u ozonificación, lo que sugiere que la combinación de varias estrategias de manejo mejora la eficacia de los agentes de control biológico utilizados en el presente estudio para la inhibición de estos depredadores de microalgas. Sin embargo, el uso de estas bacterias beneficiosas fue más efectivo en lograr una inhibición total de los protozoarios, independientemente del pretratamiento.
- En ambos niveles de salinidad (5 ppt y 9 ppt), se observó una reducción en la cantidad de protozoos presentes en las muestras tratadas con las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en comparación con los tratamientos de control.

- El tiempo transcurrido tras haber inoculado las bacterias *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yappensis* en el cultivo de *Kirchneriella sp.* tuvo un gran impacto en el presente estudio, ya que se observó una significativa disminución en la cantidad de protozoarios en los tratamientos con extractos bacterianos después de 72 horas, mostrando así la rápida acción de las bacterias.
- Los resultados indicaron una relación inversa entre la densidad de crecimiento de *Kirchneriella sp.* y el OD en el cultivo de la microalga. A medida que la densidad de crecimiento de la microalga incrementó, el oxígeno disuelto disminuyó. Lo cual se le atribuye al incremento en la demanda de oxígeno por parte de las microalgas a medida que crecen. Además, la disminución en el oxígeno disuelto también puede estar relacionada con la actividad bacteriana y el metabolismo de los protozoarios.

4.2 Recomendaciones

- A fin de complementar el presente estudio, sería recomendable identificar y aislar especies de bacterias benéficas propias del medio en el cual se desarrollan las microalgas *Kirchneriella sp.* y las larvas de *Ucides occidentalis*, lo cual daría la posibilidad de comprender la efectividad de estas bacterias potenciales en la inhibición de protozoos.
- Se recomienda llevar a cabo el presente ensayo a un mayor volumen, lo cual podría involucrar la colaboración de expertos acuícolas y la aplicación de estrategias de control de protozoarios en cultivos de microalgas a mayor escala.
- Además, es importante considerar el impacto ambiental que podría generar la introducción de nuevas bacterias beneficiosas en cultivos de microalgas, ya que lo ideal es que estas prácticas sean sostenibles y no alteren de manera negativa el ecosistema circundante.

- Por último, se sugiere explorar la posibilidad de desarrollar nuevos agentes de control biológico a partir de las bacterias *A. peroxydans* y *B. yapensis*, que beneficien a los diversos cultivos acuícolas a fin de generar nuevos conocimientos y promover prácticas de manejo sostenible.

Referencias

- Afewerki, S., Asche, F., Misund, B., Thorvaldsen, T., & Tveteras, R. (2023). Innovation in the Norwegian aquaculture industry. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 759–771. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12755>
- Aoyagi, L. M., Baracho, D. H., & Lombardi, A. T. (2023). Low-dose copper and blue light increases the yield of value-added biomolecules in *Kirchneriella contorta* (Chlorophyceae). <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2916076/V1>
- Arun, D., & Midhun, S. J. (2023). Beneficial microbial communities in aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Microbial Technology*, 35–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90261-8.00001-8>
- Baruzzi, F. and Q. L. and M. M. and C. L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. https://www.researchgate.net/publication/266504788_Antimicrobial_compounds_produced_by_Bacillus_spp_and_applications_in_food
- Baumgärtner, S., Creer, S., Jones, C., James, J., & Ellison, A. (2024). *Bacillus indicus* and *Bacillus subtilis* as alternative health and colouration promoters to synthetic astaxanthin in cyprinid aquaculture species. *Aquaculture*, 578, 740016. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2023.740016>
- Bele, V., Rajagopal, R., & Goyette, B. (2023). Closed loop bioeconomy opportunities through the integration of microalgae cultivation with anaerobic digestion: A critical review. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101336. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2023.101336>
- Brugere, C., Bansal, T., Kruijssen, F., & Williams, M. (2023). Humanizing aquaculture development: Putting social and human concerns at the center of future aquaculture

- development. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(2), 482–526.
<https://doi.org/10.1111/JWAS.12959>
- Choudhary, S., Tripathi, S., & Poluri, K. M. (2022). Microalgal-Based Bioenergy: Strategies, Prospects, and Sustainability. *Energy and Fuels*, 36(24), 14584–14612.
https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.2C02922/ASSET/IMAGES/MEDIUM/E2C02922_0006.GIF
- da Silva, D., Sant’Anna, C. L., Tucci, A., & Comas, A. (2013). New planktic species of *Kirchneriella* Schmidle (Chlorophyceae, Selenastraceae) from Brazilian freshwaters. *Revista Brasileira de Botanica*, 36(2), 153–157. <https://doi.org/10.1007/S40415-013-0014-5/TABLES/2>
- De Ley, J., & Vervloet, V. (1961). Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans* III. Some properties and localisation of peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 50(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)91053-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)91053-8)
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katsarov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/BIOM10081153>
- Durán, I., Rubiera, F., & Pevida, C. (2018). Microalgae: Potential precursors of CO₂ adsorbents. *Journal of CO₂ Utilization*, 26, 454–464.
<https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2018.06.001>
- Fu, Y., Wang, Y., Yi, L., Liu, J., Yang, S., Liu, B., Chen, F., & Sun, H. (2023). Lutein production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 376, 128875.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2023.128875>
- Gaballa, A., Cheng, R. A., Trmcic, A., Kovac, J., Kent, D. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2021). Development of a database and standardized approach for rpoB sequence-based

- subtyping and identification of aerobic spore-forming Bacillales. *Journal of Microbiological Methods*, 191, 106350. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106350>
- HOU Zhengjie, S. H. B. S. C. X. C. C. C. Jingsheng. (2021). Advances in research on cyclic lipopeptide biosynthesis. *Synthetic Biology*, 2(4), 577–597. <https://synbioj.cip.com.cn/CN/10.12211/2096-8280.2021-008>
- Ji, X., Jiang, M., Zhang, J., Jiang, X., & Zheng, Z. (2018). The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. *Bioresource Technology*, 247, 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.074>
- Kandathil Radhakrishnan, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/ARE.14357>
- Khoo, K. S., Ahmad, I., Chew, K. W., Iwamoto, K., Bhatnagar, A., & Show, P. L. (2023). Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 96, 101071. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2023.101071>
- Kirchneriella sp. - 2404 - Biodiversidad Virtual / Mundo Microscópico*. (n.d.). Retrieved September 14, 2023, from <https://www.biodiversidadvirtual.org/micro/Kirchneriella-sp.-img2404.html>
- Kiron, V., Hayes, M., & Avni, D. (2022). Inflammatory bowel disease - A peek into the bacterial community shift and algae-based ‘biotic’ approach to combat the disease. *Trends in Food Science & Technology*, 129, 210–220. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.09.012>

- Lépinay, A., Turpin, V., Mondeguer, F., Grandet-Marchant, Q., Capiiaux, H., Baron, R., & Lebeau, T. (2018). First insight on interactions between bacteria and the marine diatom *Haslea ostrearia*: Algal growth and metabolomic fingerprinting. *Algal Research*, *31*, 395–405. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.023>
- Li, J., Weinberger, F., de Nys, R., Thomas, T., & Egan, S. (2023). A pathway to improve seaweed aquaculture through microbiota manipulation. *Trends in Biotechnology*, *41*(4), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.08.003>
- Liu, B., Eltanahy, E. E., Liu, H., Chua, E. T., Thomas-Hall, S. R., Wass, T. J., Pan, K., & Schenk, P. M. (2020). Growth-promoting bacteria double eicosapentaenoic acid yield in microalgae. *Bioresource Technology*, *316*, 123916. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123916>
- Midhun, S. J., Arun, D., & Jyothis, M. (2023). Probiotic application of beneficial bacteria for improved health and disease control. *Recent Advances in Aquaculture Microbial Technology*, 275–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90261-8.00002-X>
- Mishra, B., Tiwari, A., & Mahmoud, A. E. D. (2023). Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *25*(2), 675–687. <https://doi.org/10.1007/S10098-021-02254-1/TABLES/3>
- Miyasaka, H., koga, A., & Maki, T. aki. (2023). Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* *2023 39:6*, *39*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11274-023-03592-6>
- Noreikaitė, E., Balčiūnaitė, G., Karosienė, J., Koreivienė, J., Kasperovičienė, J., & Savickienė, N. (2021). Determination of protein content extracted from lyophilized biomass of *Kirchneriella* sp. Schmidle. *10th International Pharmaceutical Conference „Science and*

Practice 2019 : Abstract Book : November 15, 2019, Kaunas, Lithuania / Organized by Lithuanian University of Health Sciences. Faculty of Pharmacy, 37–37.
<https://www.lsmuni.lt/cris/handle/20.500.12512/99531>

Noreikaitė, E., Balčiūnaitė-Murzienė, G., Koreivienė, J., & Savickienė, N. (2021). *Comparison of protein content extracted from green algae *Kirchneriella* sp. Schmidle lyophilized biomass using different determination methods.*
<https://www.lsmuni.lt/cris/handle/20.500.12512/108405>

Objetivos de Desarrollo Sostenible / Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo. (n.d.). Retrieved September 14, 2023, from <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>

O'Neill, E. A., Fehrenbach, G., Murphy, E., Alencar, S. A., Pogue, R., & Rowan, N. J. (2022). Use of next generation sequencing and bioinformatics for profiling freshwater eukaryotic microalgae in a novel peatland integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) system: Case study from the Republic of Ireland. *Science of The Total Environment*, 851, 158392.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158392>

Oviedo-Olvera, M. V., Feregrino-Pérez, A. A., Nieto-Ramírez, M. I., Tovar-Ramírez, M. M., Aguirre-Becerra, H., & García-Trejo, J. F. (2023). Prebiotic emergent sources for aquaculture: Microalgae and insects. *Aquaculture and Fisheries*.
<https://doi.org/10.1016/J.AAF.2023.06.007>

Palacios, O. A., López, B. R., & de-Bashan, L. E. (2022). Microalga Growth-Promoting Bacteria (MGPB): A formal term proposed for beneficial bacteria involved in microalga–bacterial interactions. *Algal Research*, 61, 102585.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102585>

- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Daniel, R., Liebl, W., & Ehrenreich, A. (2017). Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(21), 7901–7912. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8479-y>
- Reese, K. L., Fisher, C. L., Lane, P. D., Jaryenneh, J. D., Jones, A. D., Frank, M., & Lane, T. W. (2021). Abiotic and biotic damage of microalgae generate different volatile organic compounds (Vocs) for early diagnosis of algal cultures for biofuel production. *Metabolites*, *11*(10), 707. <https://doi.org/10.3390/METABO11100707/S1>
- Rego, D., Redondo, L. M., Geraldés, V., Costa, L., Navalho, J., & Pereira, M. T. (2015). Control of predators in industrial scale microalgae cultures with Pulsed Electric Fields. *Bioelectrochemistry*, *103*, 60–64. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEMA.2014.08.004>
- Sarwer, A., Hamed, S. M., Osman, A. I., Jamil, F., Al-Muhtaseb, A. H., Alhajeri, N. S., & Rooney, D. W. (2022). Algal biomass valorization for biofuel production and carbon sequestration: a review. *Environmental Chemistry Letters* *2022* *20*:5, *20*(5), 2797–2851. <https://doi.org/10.1007/S10311-022-01458-1>
- Sial, A., Zhang, B., Zhang, A., Liu, K. Y., Imtiaz, S. A., & Yashir, N. (2020). Microalgal–Bacterial Synergistic Interactions and Their Potential Influence in Wastewater Treatment: a Review. *BioEnergy Research* *2020* *14*:3, *14*(3), 723–738. <https://doi.org/10.1007/S12155-020-10213-9>
- Taxonomy Browser* :: *AlgaeBase*. (n.d.). Retrieved September 14, 2023, from <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#6955>
- Tham, P. E., Lim, H. R., Khoo, K. S., Chew, K. W., Yap, Y. J., Munawaroh, H. S. H., Ma, Z., Rajendran, S., Gnanasekaran, L., & Show, P. L. (2023). Insights of microalgae-based

- aquaculture feed: A review on circular bioeconomy and perspectives. *Algal Research*, 74, 103186. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103186>
- Verdegem, M., Buschmann, A. H., Latt, U. W., Dalsgaard, A. J. T., & Lovatelli, A. (2023). The contribution of aquaculture systems to global aquaculture production. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(2), 206–250. <https://doi.org/10.1111/JWAS.12963>
- Xu, X., Yu, L., Xu, G., Wang, Q., Wei, S., & Tang, X. (2020). *Bacillus yapensis* sp. nov., a novel piezotolerant bacterium isolated from deep-sea sediment of the Yap Trench, Pacific Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(3), 389–396. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01348-7>
- Yuki Tsukakoshi. (2022). *Method for culturing Bacillus bacteria and method for producing useful substance* (Patent JP7137802B2). <https://patents.google.com/patent/JP7137802B2/en?q=Bacillus+bacteria+culture+medium&oq=Bacillus+bacteria+culture+medium>
- Zhu, Z., Jiang, J., & Fa, Y. (2020). Overcoming the Biological Contamination in Microalgae and Cyanobacteria Mass Cultivations for Photosynthetic Biofuel Production. *Molecules*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225220>

Apéndice

A.1 Primer ensayo

Tabla A.1.1

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis ante la presencia de protozoarios en muestras de aguas estuarinas del Golfo de Guayaquil. Se reporta el número de individuos de protozoarios (promedio \pm desviación estándar) registrados durante los 7 días del primer ensayo para cada uno de los tratamientos: C1, C2, C3, P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA de medidas repetidas y la comparación múltiple de Tukey.

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120h	144 h
C1	12.0 \pm 4.36 ^a	19.0 \pm 9.17 ^a	41.7 \pm 1.53 ^b	54.3 \pm 10.7 ^d	63.3 \pm 10.6 ^d	77.3 \pm 64.0 ^c	91.0 \pm 11.5 ^b
C2	8.67 \pm 4.73 ^a	12.0 \pm 4.36 ^a	16.7 \pm 17.8 ^{ab}	28.7 \pm 0.58 ^c	41.7 \pm 19.1 ^{cd}	61.0 \pm 22.9 ^{bc}	72.3 \pm 92.6 ^{ab}
C3	4.33 \pm 6.66 ^a	6.67 \pm 7.64 ^a	7.00 \pm 4.58 ^a	19.7 \pm 9.29 ^{bc}	24.7 \pm 12.5 ^{bc}	33.0 \pm 14.1 ^{abc}	33.7 \pm 3.79 ^{ab}
P1	12.7 \pm 3.79 ^a	16.3 \pm 8.62 ^a	13.0 \pm 5.00 ^a	10.3 \pm 5.51 ^{ab}	5.00 \pm 1.00 ^{ab}	1.33 \pm 1.53 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P2	9.33 \pm 4.51 ^a	11.0 \pm 2.65 ^a	9.00 \pm 4.58 ^a	8.33 \pm 2.08 ^{ab}	4.00 \pm 1.00 ^{ab}	1.00 \pm 1.73 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P3	3.67 \pm 5.51 ^a	5.33 \pm 9.24 ^a	3.00 \pm 4.36 ^a	2.33 \pm 4.04 ^a	1.67 \pm 1.53 ^a	0.33 \pm 0.58 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY1	12.3 \pm 6.66 ^a	14.0 \pm 1.00 ^a	12.7 \pm 9.29 ^a	8.67 \pm 3.51 ^{ab}	3.00 \pm 1.00 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY2	6.67 \pm 7.64 ^a	8.33 \pm 0.58 ^a	7.67 \pm 2.52 ^a	7.33 \pm 2.52 ^{ab}	2.00 \pm 1.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY3	4.67 \pm 5.69 ^a	7.00 \pm 1.00 ^a	4.67 \pm 4.73 ^a	1.67 \pm 1.15 ^a	1.33 \pm 0.58 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y1	11.3 \pm 5.13 ^a	17.7 \pm 6.35 ^a	15.7 \pm 2.08 ^a	12.7 \pm 4.04 ^{ab}	6.33 \pm 2.08 ^{ab}	2.00 \pm 3.46 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a
Y2	8.00 \pm 5.20 ^a	11.3 \pm 3.06 ^a	11.0 \pm 5.57 ^a	9.00 \pm 4.58 ^{ab}	4.67 \pm 2.08 ^{ab}	0.67 \pm 1.15 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y3	3.00 \pm 4.36 ^a	7.67 \pm 1.53 ^a	7.00 \pm 3.61 ^a	6.00 \pm 4.58 ^{ab}	1.67 \pm 1.53 ^a	0.33 \pm 0.58 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a

Figura A.1.1

Unidades de protozoarios a 3 ppt de salinidad en muestras de agua estuarinas del Golfo de Guayaquil en el transcurso de 144 horas tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el primer ensayo.

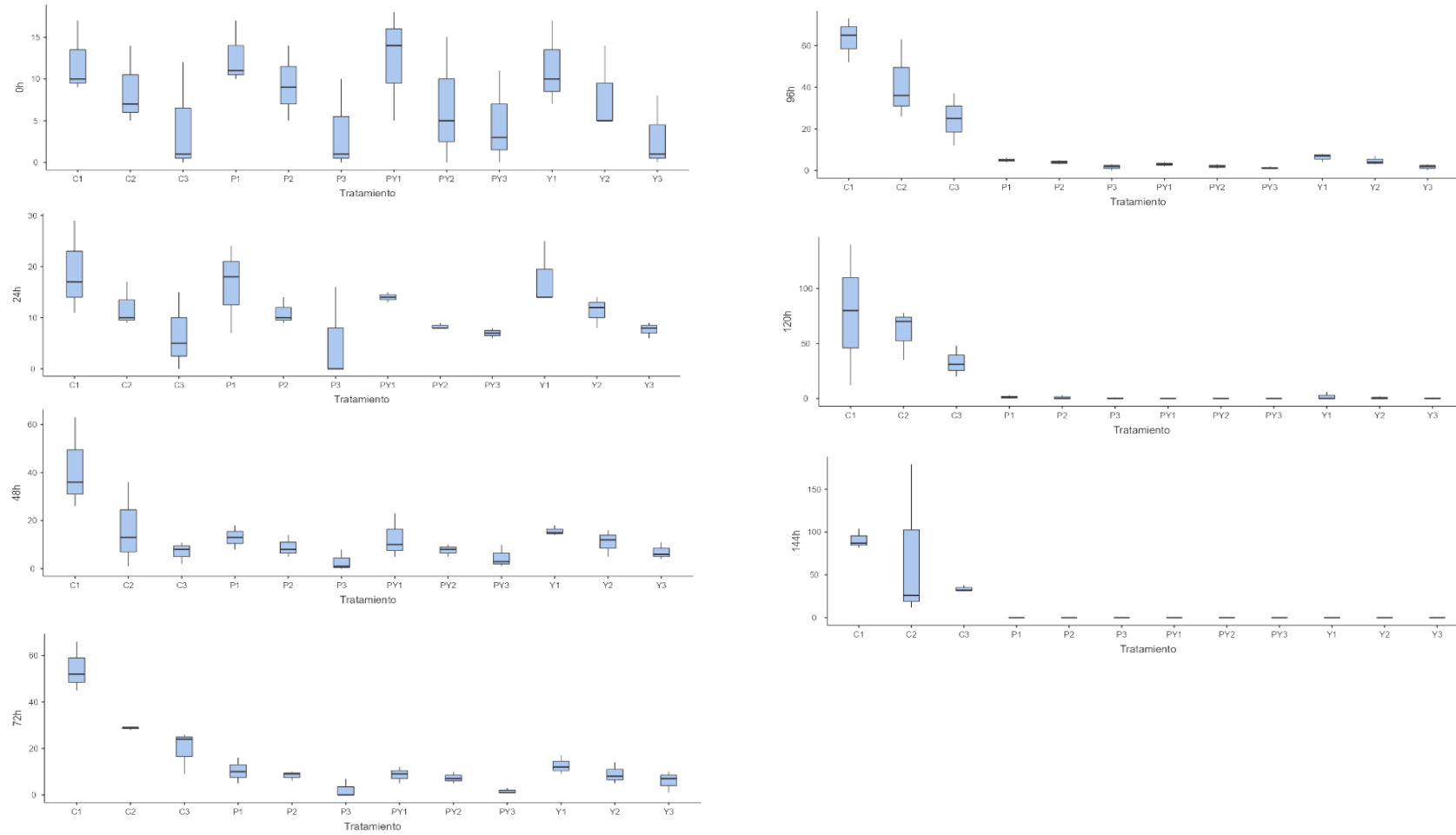


Tabla A.1.2

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al primer ensayo para el análisis de protozoarios presentes en muestras de aguas estuarinas del Golfo de Guayaquil

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	1562	6	260	1.34	0.242
Tiempo (horas) * Tratamiento	31281	66	474	2.44	<.001
Residual	27935	144	194		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	52218	11	4747	25.2	<.001
Residual	4520	24	188		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

A.2 Segundo ensayo

Tabla A.2.1

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis en la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. Se reporta la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. obtenida luego de haber suministrado cada uno de los tratamientos: C1, C2, C3, P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3 (promedio \pm desviación estándar) durante el segundo ensayo a una concentración de 5 ppt de salinidad. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA y la comparación múltiple de Tukey.

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120h	144 h
C1	21667 \pm 2887 ^a	30000 \pm 10000 ^a	85833 \pm 20207 ^{abcd}	105000 \pm 45894 ^{ab}	29167 \pm 12583 ^{ab}	5000 \pm 2500 ^a	1667 \pm 2887 ^a
C2	22500 \pm 6614 ^a	32500 \pm 7500 ^a	126667 \pm 9465 ^{bcd}	150833 \pm 40182 ^b	18333 \pm 6292 ^a	26667 \pm 10104 ^{abc}	1667 \pm 1443 ^a
C3	26667 \pm 12583 ^a	64167 \pm 10104 ^{ab}	132500 \pm 10897 ^{bcd}	163333 \pm 3819 ^b	20833 \pm 6292 ^a	19167 \pm 20817 ^{ab}	833 \pm 1443 ^a
P1	28333 \pm 3819 ^a	65833 \pm 57897 ^{ab}	110833 \pm 26021 ^{bcd}	110000 \pm 13229 ^{ab}	25000 \pm 2500 ^a	19167 \pm 8036 ^{ab}	16667 \pm 8036 ^{ab}
P2	30000 \pm 7500 ^a	85000 \pm 74540 ^{ab}	136667 \pm 13769 ^{cd}	113333 \pm 29616 ^{ab}	47500 \pm 11456 ^{abc}	25833 \pm 15069 ^{abc}	13333 \pm 2887 ^{ab}
P3	30833 \pm 3819 ^a	91667 \pm 26732 ^{abc}	143333 \pm 51255 ^d	131667 \pm 33292 ^{ab}	69167 \pm 8780 ^{bc}	54167 \pm 19419 ^{bc}	36667 \pm 11815 ^b
PY1	40000 \pm 2500 ^a	70000 \pm 31225 ^{ab}	39167 \pm 8036 ^a	37500 \pm 27042 ^a	18333 \pm 8036 ^a	15833 \pm 12583 ^{ab}	22500 \pm 2500 ^{ab}
PY2	30000 \pm 6614 ^a	73333 \pm 24023 ^{ab}	75000 \pm 20463 ^{ab}	72500 \pm 22500 ^{ab}	83333 \pm 5204 ^c	26667 \pm 9465 ^c	27500 \pm 19843 ^b
PY3	37500 \pm 2500 ^a	80833 \pm 10408 ^{ab}	90000 \pm 2500 ^{abcd}	98333 \pm 61050 ^{ab}	156667 \pm 43036 ^d	60000 \pm 11456 ^a	34167 \pm 5204 ^b
Y1	27500 \pm 11456 ^a	143333 \pm 2887 ^{bcd}	83333 \pm 16266 ^{abc}	44167 \pm 34126 ^a	30833 \pm 5204 ^{ab}	13333 \pm 1443 ^a	11667 \pm 2887 ^{ab}
Y2	30000 \pm 10897 ^a	183333 \pm 19419 ^{cd}	98333 \pm 5204 ^{abcd}	68333 \pm 30856 ^{ab}	35833 \pm 5204 ^{ab}	29167 \pm 18930 ^{abc}	18333 \pm 14649 ^{ab}
Y3	25000 \pm 4330 ^a	199167 \pm 17736 ^d	130833 \pm 8036 ^{bcd}	87500 \pm 9014 ^{ab}	41667 \pm 5204 ^{abc}	31667 \pm 10104 ^{abc}	28333 \pm 3819 ^b

Figura A.2.1

Densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. a 5 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis en el segundo ensayo

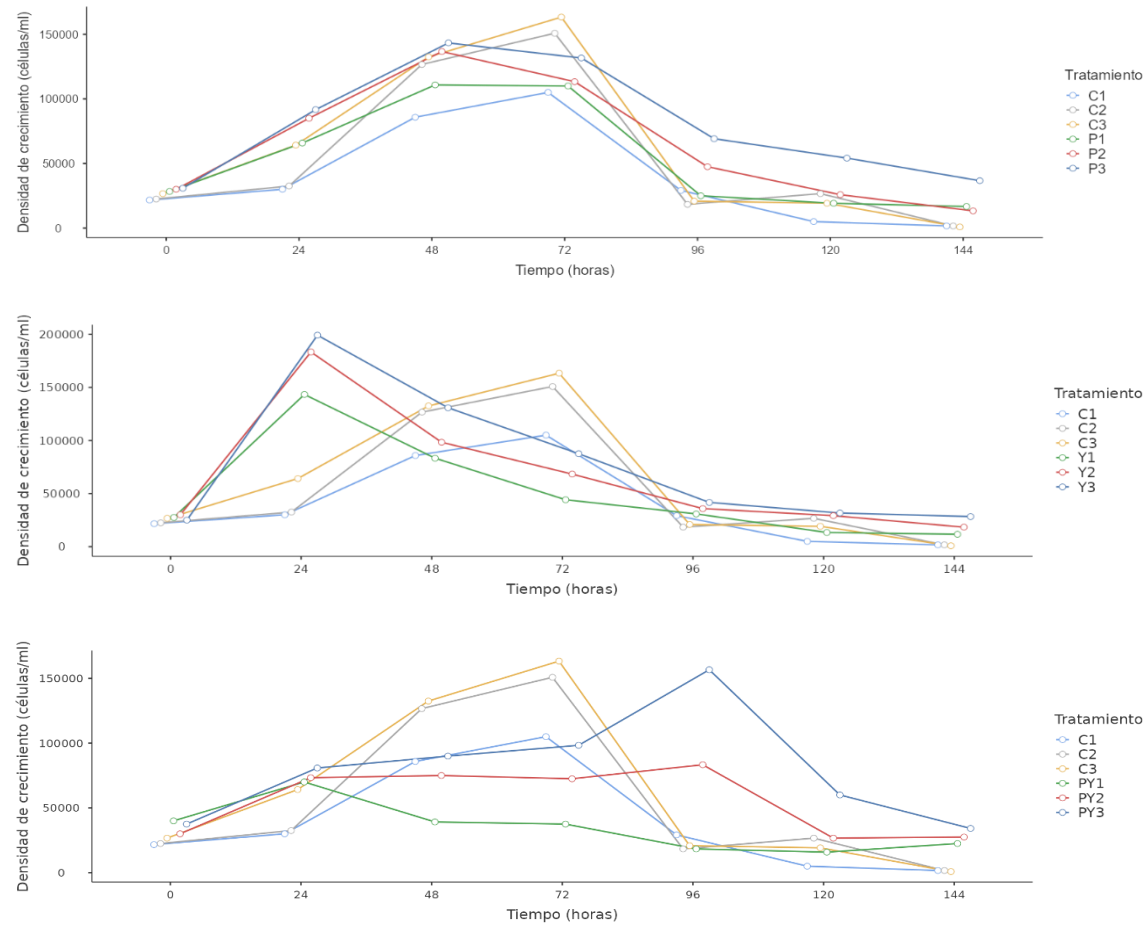


Tabla A.2.2

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al segundo ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. a 5 ppt de salinidad tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	3.06e+11	6	5.11e+10	124.03	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	1.96e+11	66	2.97e0+9	7.22	< .001
Residual	5.93e+10	144	4.12e0+8		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	4.99e+10	11	4.53e+9	8.18	< .001
Residual	1.33e+10	24	5.54e+8		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.2.3

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis en la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. Se reporta la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. obtenida luego de haber suministrado cada uno de los tratamientos: C1, C2, C3, P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3 (promedio \pm desviación estándar) durante el segundo ensayo a una concentración de 9 ppt de salinidad. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA y la comparación múltiple de Tukey.

Tratamiento	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120h	144 h
C1	15000 \pm 2500 ^a	5833 \pm 1443 ^a	9167 \pm 3819 ^{abcde}	17500 \pm 11456 ^{bc}	32500 \pm 10000 ^b	9833 \pm 4193 ^b	2500 \pm 2500 ^a
C2	24167 \pm 3819 ^a	10833 \pm 3819 ^{ab}	13333 \pm 1443 ^{cde}	13333 \pm 5204 ^{abc}	21667 \pm 3819 ^b	10833 \pm 8036 ^b	1667 \pm 1443 ^a
C3	21667 \pm 6292 ^a	5000 \pm 2500 ^a	16667 \pm 3819 ^e	23333 \pm 3819 ^c	22500 \pm 6614 ^b	10000 \pm 5000 ^b	1667 \pm 2887 ^a
P1	30000 \pm 5000 ^a	6667 \pm 1443 ^a	5000 \pm 2500 ^{ab}	1667 \pm 1443 ^a	833 \pm 1443 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P2	25000 \pm 10897 ^a	10000 \pm 2500 ^{ab}	5000 \pm 2500 ^{ab}	1667 \pm 1443 ^a	833 \pm 1443 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
P3	29167 \pm 6292 ^a	10000 \pm 2500 ^{ab}	11667 \pm 2887 ^{bcde}	20833 \pm 10408 ^c	1667 \pm 2887 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY1	25000 \pm 6614 ^a	4167 \pm 1443 ^a	1667 \pm 1443 ^a	1667 \pm 1443 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY2	20000 \pm 6614 ^a	7500 \pm 2500 ^a	6667 \pm 1443 ^{abcd}	1667 \pm 1443 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
PY3	19167 \pm 9465 ^a	5000 \pm 2500 ^a	4167 \pm 1443 ^{ab}	1667 \pm 1443 ^a	5833 \pm 3819 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y1	20833 \pm 8036 ^a	9167 \pm 3819 ^{ab}	16667 \pm 3819 ^e	2500 \pm 2500 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y2	20000 \pm 2500 ^a	8333 \pm 1443 ^a	5833 \pm 1443 ^{abc}	4167 \pm 3819 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
Y3	14167 \pm 5204 ^a	16667 \pm 3819 ^b	14167 \pm 3819 ^{de}	8333 \pm 5204 ^{abc}	833 \pm 1443 ^a	833 \pm 1443 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a

Figura A.2.2

Densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella* sp. a 9 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* en el segundo ensayo

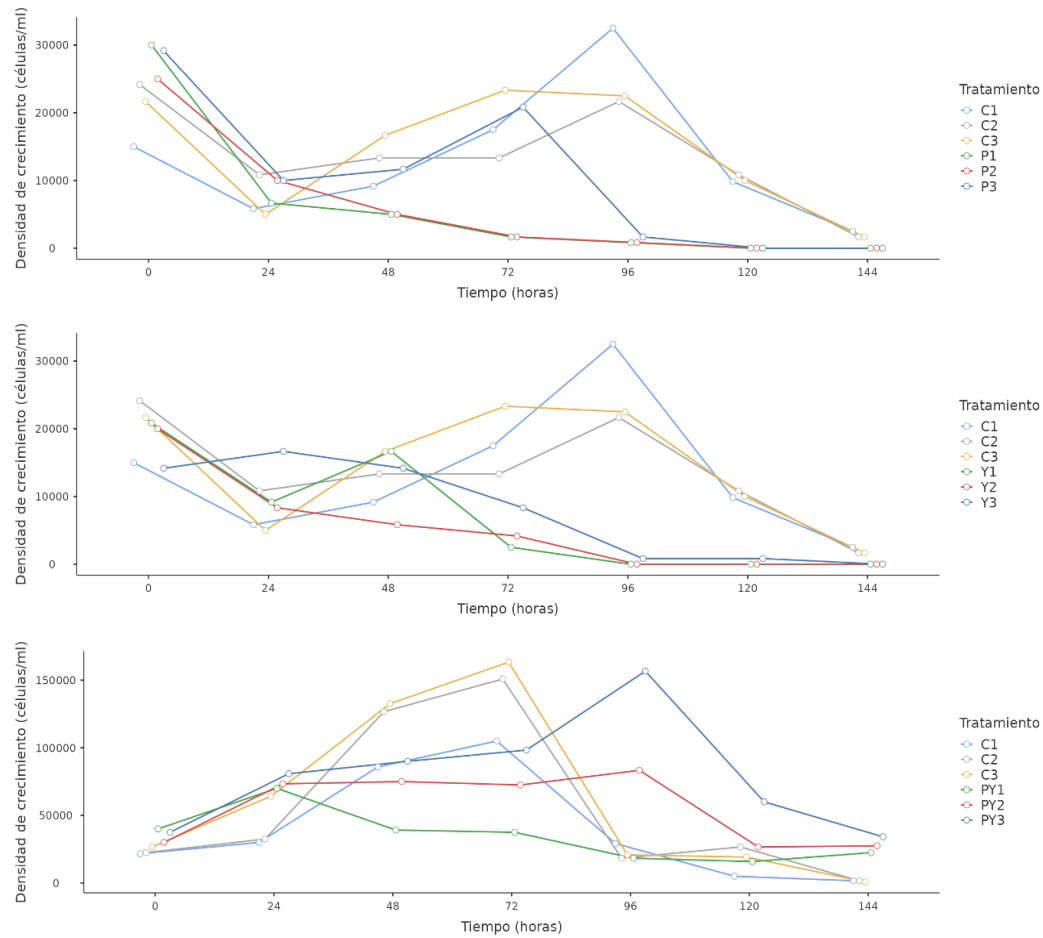


Tabla A.2.4

*ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al segundo ensayo a 9 ppt de salinidad para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis**

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	1.02e+10	6	1.70e+9	108.09	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	6.33e0+9	66	9.59e+7	6.10	< .001
Residual	2.26e0+9	144	1.57e+7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	3.09e+9	11	2.81e+8	15.9	< .001
Residual	4.25e+8	24	1.77e+7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Figura A.2.3

Densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* en el segundo ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yappensis* a 5 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

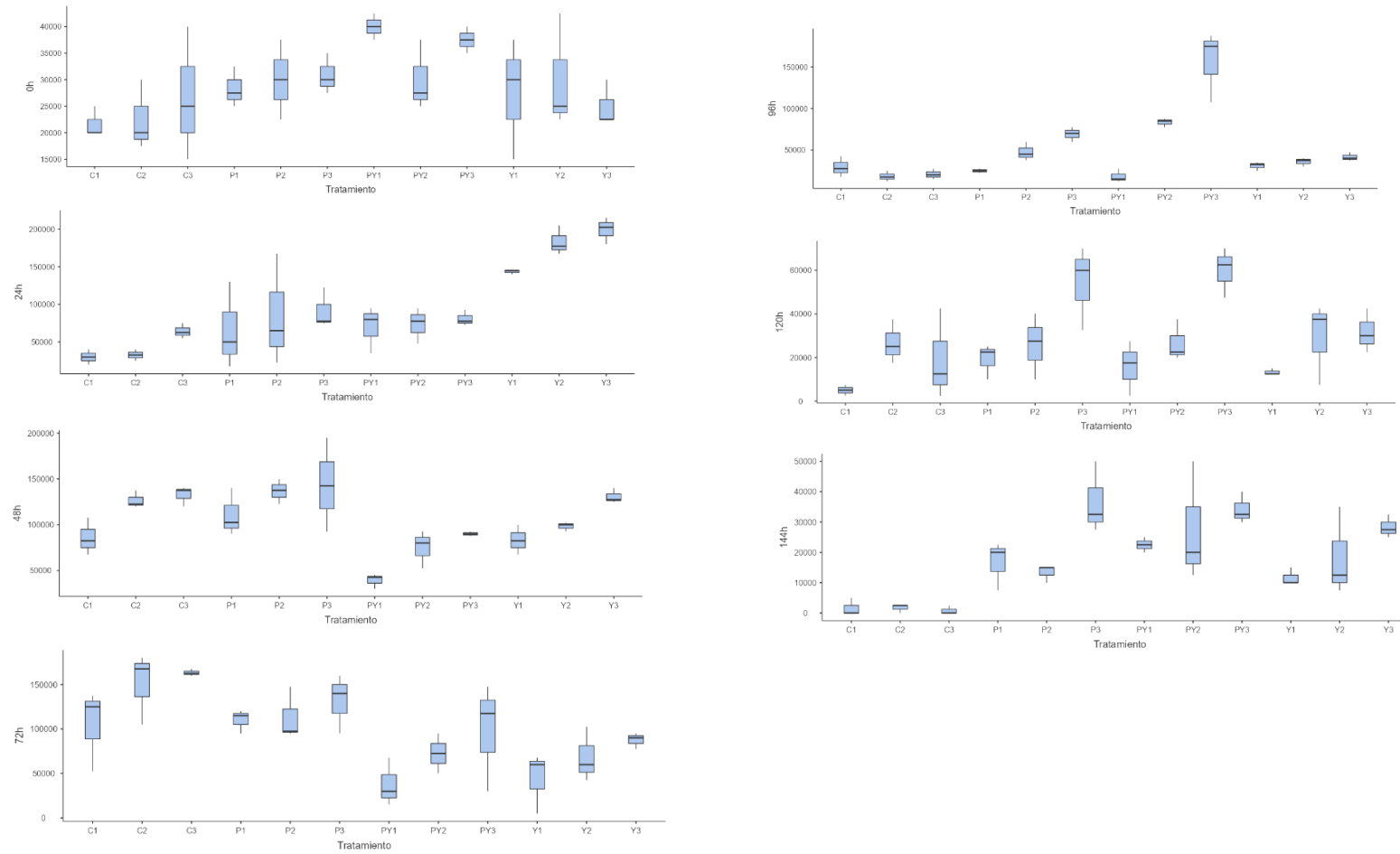


Figura A.2.4 Densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella* sp. en el segundo ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yappensis* a 9 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

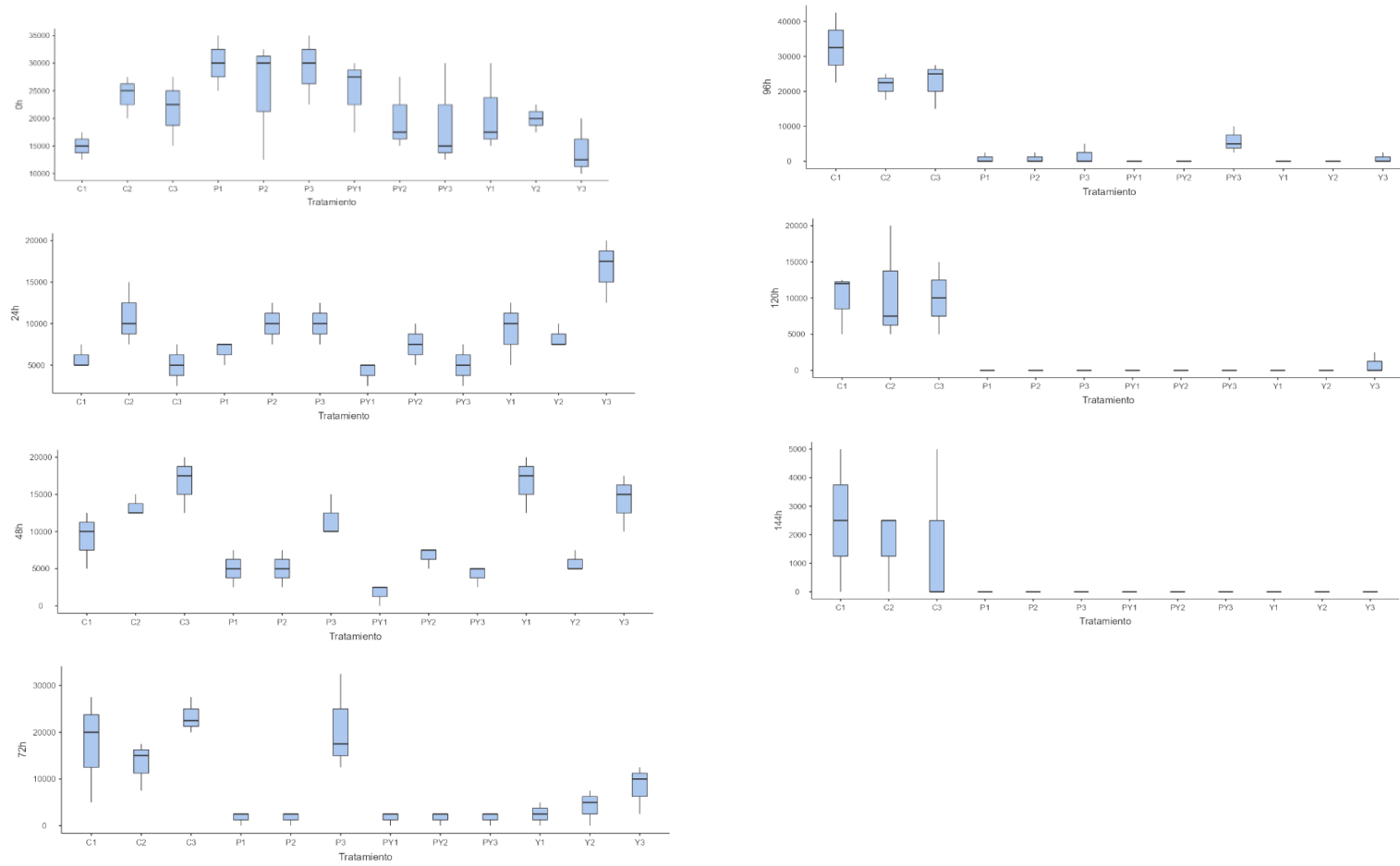


Tabla A.2.5

Se reporta el oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* (promedio \pm desviación estándar) a las 144 horas de haber inoculado los tratamientos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* a una concentración de 5 y 9 ppt de salinidad durante el segundo ensayo. Cada uno de los valores correspondientes a los tratamientos se indican con diferentes letras, los mismos que son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Tratamiento	Salinidad (ppt)	
	5	9
C1	6.11 \pm 0.17 ^d	3.93 \pm 0.12 ^e
C2	5.87 \pm 0.42 ^d	4.24 \pm 0.06 ^f
C3	4.66 \pm 0.31 ^c	5.24 \pm 0.07 ^h
P1	3.27 \pm 0.17 ^b	4.10 \pm 0.07 ^{ef}
P2	3.18 \pm 0.06 ^b	3.17 \pm 0.07 ^d
P3	3.75 \pm 0.10 ^b	4.90 \pm 0.05 ^g
PY1	4.93 \pm 0.30 ^c	2.58 \pm 0.03 ^c
PY2	5.15 \pm 0.11 ^c	3.22 \pm 0.03 ^d
PY3	5.01 \pm 0.05 ^c	3.28 \pm 0.18 ^d
Y1	2.38 \pm 0.03 ^a	1.81 \pm 0.08 ^a
Y2	2.08 \pm 0.05 ^a	2.17 \pm 0.05 ^b
Y3	1.99 \pm 0.04 ^a	3.20 \pm 0.22 ^d

Figura A2.5

Oxígeno disuelto en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. en el segundo ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 5 y 9 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas durante el segundo ensayo.

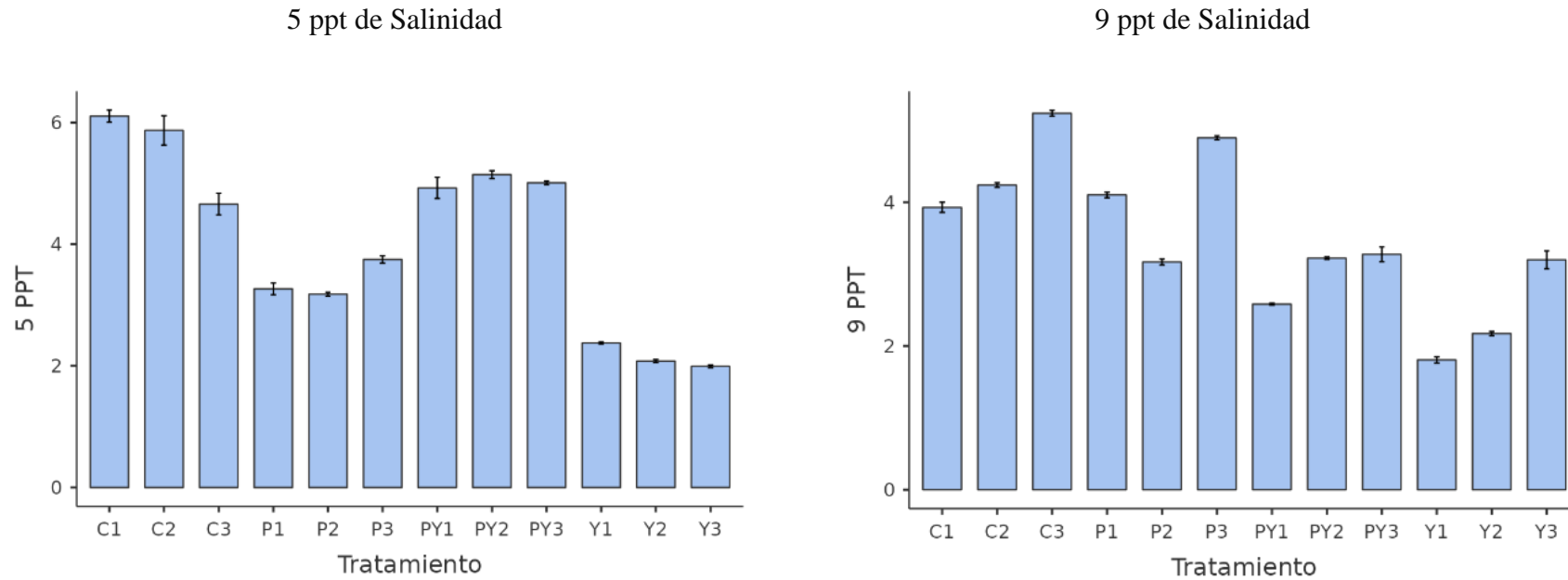


Tabla A.2.6

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al segundo ensayo para el análisis del oxígeno disuelto al final del segundo ensayo en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	5.325	1	5.3247	245	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	30.288	11	2.7534	127	< .001
Residual	0.522	24	0.0217		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	74.868	11	6.8062	260	< .001
Residual	0.628	24	0.0262		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

A.3 Tercer ensayo

Tabla A.3.1

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis en la densidad de crecimiento (células/ml) de la microalga Kirchneriella sp. Se reporta la densidad de crecimiento (células/ml) de la microalga Kirchneriella sp. obtenida luego de haber suministrado cada uno de los tratamientos: C1, C2, C3, P1, P2, P3, PY1, PY2, PY3, Y1, Y2 y Y3 (promedio \pm desviación estándar) a una concentración de 5 y 9 ppt de salinidad durante el tercer ensayo. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA y la comparación múltiple de Tukey.

Salinidad (ppt)	5		9	
	0 h	144 h	0 h	144 h
C1	29167 \pm 6292 ^a	29167 \pm 3819 ^a	16667 \pm 3819 ^a	10000 \pm 6614 ^a
C2	29167 \pm 5204 ^a	28333 \pm 5204 ^a	22500 \pm 6614 ^a	12500 \pm 2500 ^a
C3	40833 \pm 11273 ^a	29167 \pm 6292 ^a	20000 \pm 5000 ^a	20833 \pm 2887 ^a
P1	28333 \pm 5774 ^a	45000 \pm 2500 ^a	20000 \pm 5000 ^a	85000 \pm 7500 ^c
P2	29167 \pm 8036 ^a	76667 \pm 5204 ^a	36667 \pm 6292 ^a	85833 \pm 3819 ^c
P3	45833 \pm 15069 ^a	158333 \pm 172488 ^a	30833 \pm 12829 ^a	96667 \pm 5774 ^c
PY1	24167 \pm 6292 ^a	34167 \pm 10104 ^a	16667 \pm 6292 ^a	46667 \pm 10408 ^b
PY2	25833 \pm 5204 ^a	59167 \pm 3819 ^a	17500 \pm 6614 ^a	55000 \pm 6614 ^b
PY3	24167 \pm 5204 ^a	165833 \pm 30242 ^a	38333 \pm 20207 ^a	83333 \pm 12332 ^c
Y1	26667 \pm 10104 ^a	31667 \pm 13769 ^a	33333 \pm 10104 ^a	57500 \pm 6614 ^b
Y2	27500 \pm 6614 ^a	79167 \pm 12583 ^a	30833 \pm 13769 ^a	83333 \pm 14216 ^c
Y3	43333 \pm 16646 ^a	120000 \pm 81739 ^a	28333 \pm 7638 ^a	86667 \pm 8780 ^c

Figura A3.1

Comparación de la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* en los tratamientos control con aquellos en los que se inoculó los diferentes extractos bacterianos a 5 y 9 ppt de salinidad durante el tercer ensayo

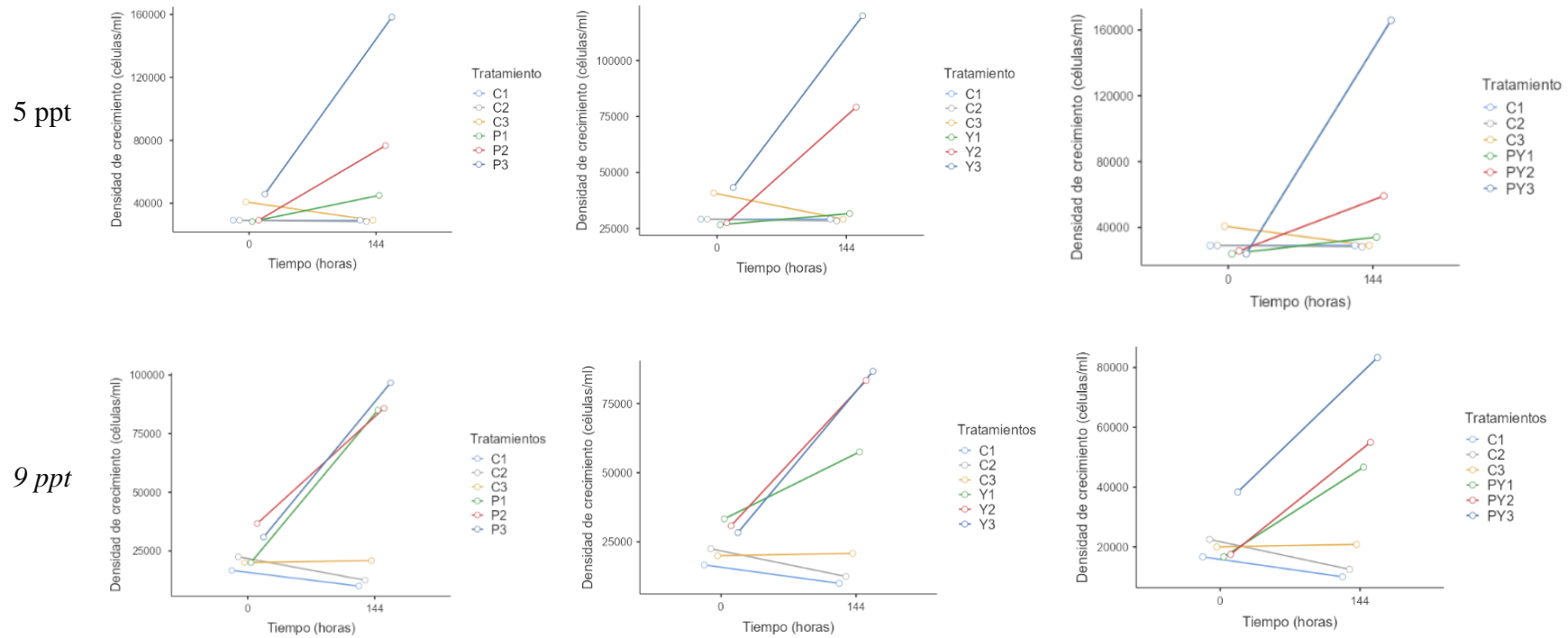


Tabla A.3.2

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al tercer ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 5 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	2.91e+10	1	2.91e+10	15.73	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	3.87e+10	11	3.52e0+9	1.90	0.091
Residual	4.44e+10	24	1.85e0+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	4.77e+10	11	4.34e+9	3.11	0.010
Residual	3.35e+10	24	1.40e+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.3.3

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al tercer ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 9 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	2.12e+10	1	2.12e+10	234.4	<.001
Tiempo (horas) * Tratamientos	1.21e+10	11	1.10e0+9	12.2	<.001
Residual	2.17e0+9	24	9.04e0+7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamientos	2.28e+10	11	2.07e+9	28.9	<.001
Residual	1.72e0+9	24	7.16e+7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Figura A.3.2

Densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella* sp. a 5 ppt de salinidad al inicio y al final del tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yappensis*

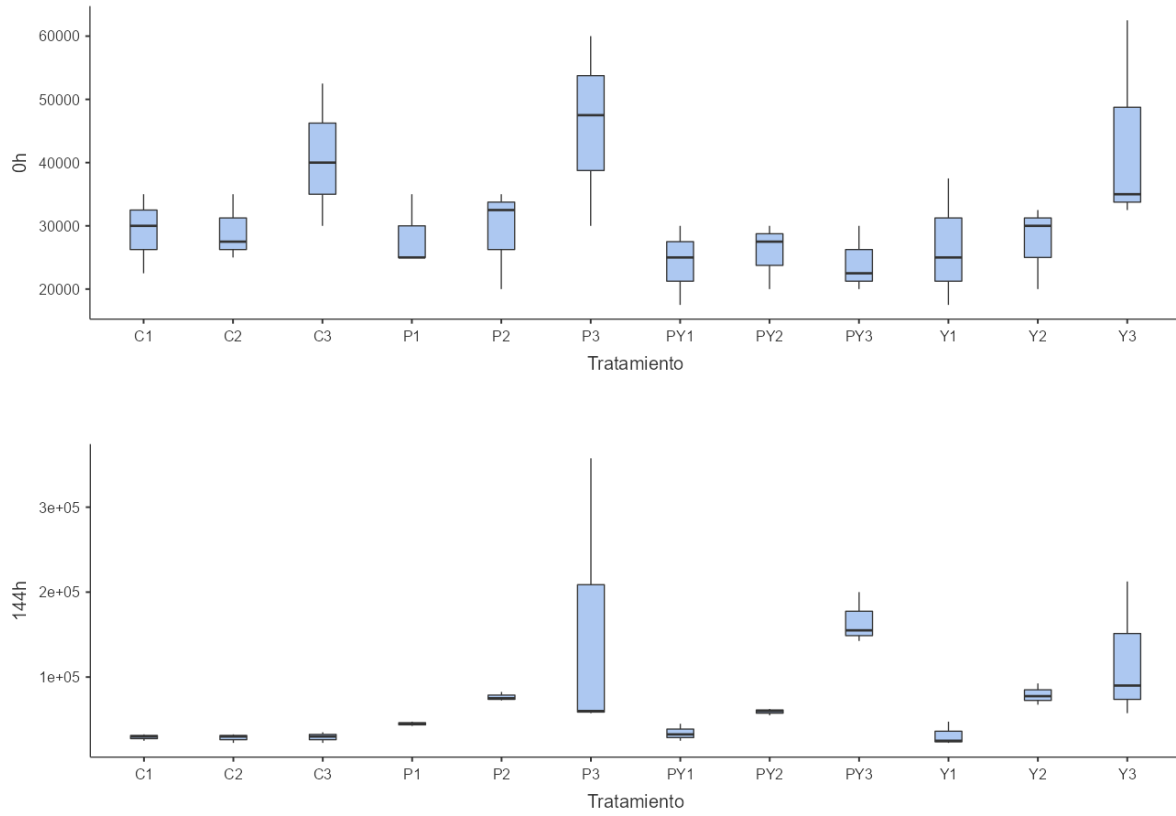


Figura A.3.3

Densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. a 9 ppt de salinidad al inicio y al final del tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

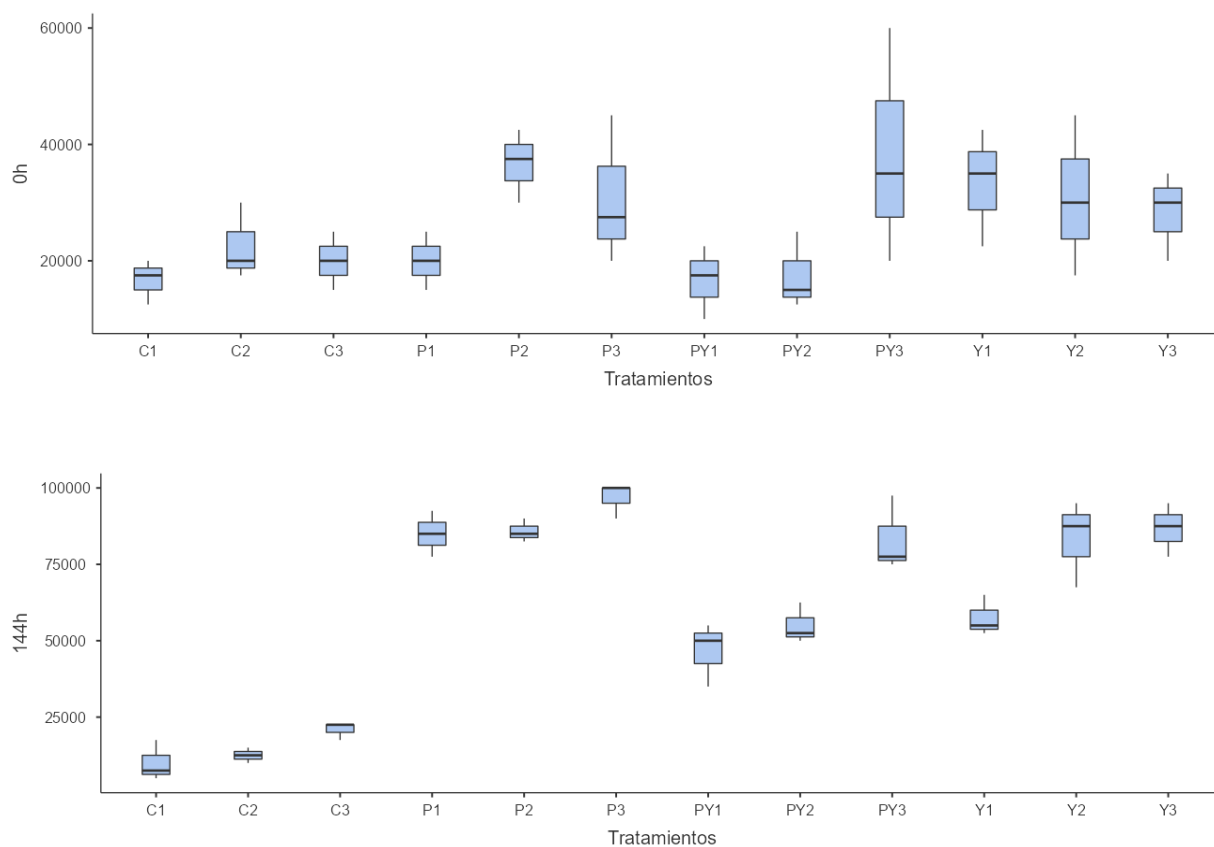


Tabla A.3.4

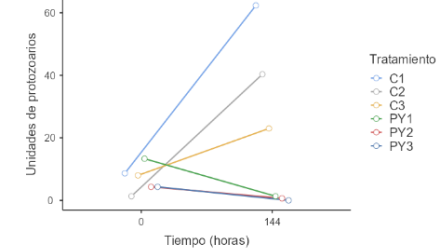
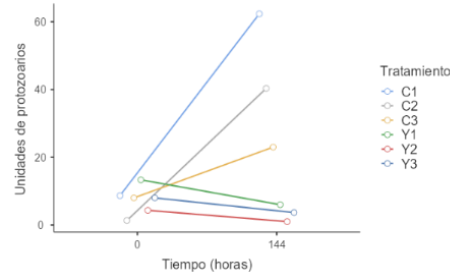
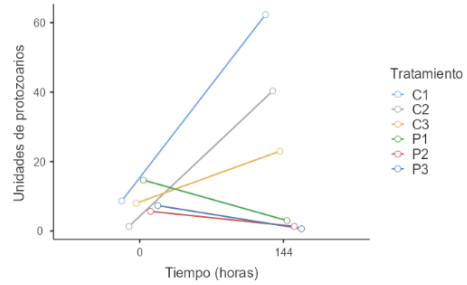
Unidades de protozoarios en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. a 5 y 9 ppt de salinidad al inicio y al final del tercer ensayo tras haber suministrado los diferentes tratamientos con extractos bacterianos de Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Salinidad (ppt)	5		9	
	0 h	144 h	0 h	144 h
C1	62.3±10.6 ^a	8.67±4.73 ^d	10.3±4.93 ^a	52.0±17.8 ^c
C2	40.3±15.9 ^a	1.33±1.53 ^c	8.67±3.06 ^a	33.0±4.36 ^b
C3	23.0±4.58 ^a	8.00±2.00 ^b	3.33±2.52 ^a	25.0±5.57 ^b
P1	3.00±1.00 ^a	14.7±4.16 ^a	11.3±5.86 ^a	4.00±1.00 ^a
P2	1.33±0.577 ^a	5.67±2.52 ^a	4.33±3.21 ^a	1.33±1.53 ^a
P3	0.667±0.577 ^a	7.33±5.69 ^a	2.67±2.08 ^a	0.00±0.00 ^a
PY1	1.33±1.53 ^a	13.3±6.35 ^a	12.0±4.00 ^a	8.33±1.53 ^a
PY2	0.667±0.577 ^a	4.33±2.08 ^a	8.00±5.57 ^a	3.00±1.00 ^a
PY3	0.00±0.00 ^a	4.33±4.93 ^a	5.00±4.58 ^a	1.33±0.577 ^a
Y1	6.00±1.00 ^a	13.3±6.43 ^a	9.67±4.73 ^a	7.67±1.53 ^a
Y2	1.00±1.00 ^a	4.33±1.53 ^a	9.33±6.11 ^a	2.33±2.08 ^a
Y3	3.67±0.577 ^a	8.00±7.55 ^a	6.67±2.52 ^a	1.33±0.577 ^a

Figura A3.4

Comparación de las unidades de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* en los tratamientos control con aquellos en los que se inoculó los diferentes tratamientos con extractos bacterianos a 5 y 9 ppt de salinidad durante el tercer ensayo

5 ppt



9 ppt

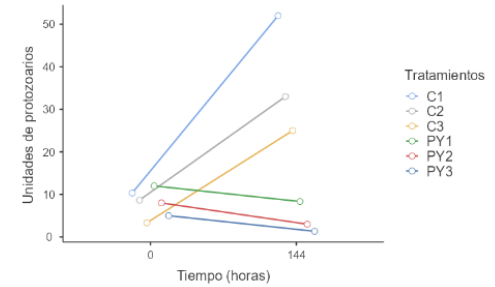
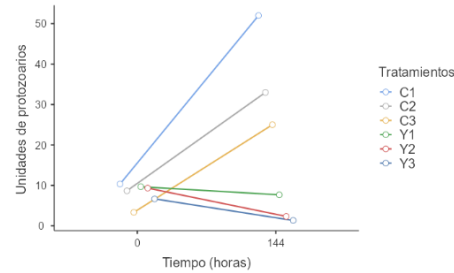
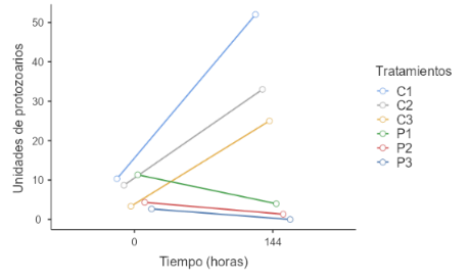


Tabla A.3.5

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al tercer ensayo a 5 ppt de salinidad para el análisis de la proliferación de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	312	1	312.5	11.6	0.002
Tiempo (horas) * Tratamiento	7315	11	665.0	24.7	< .001
Residual	647	24	27.0		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	6439	11	585.4	21.6	< .001
Residual	650	24	27.1		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.3.6

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al tercer ensayo a 9 ppt de salinidad para el análisis de la proliferación de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	288	1	288.0	18.4	<.001
Tiempo (horas) * Tratamientos	4213	11	383.0	24.5	<.001
Residual	376	24	15.7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamientos	5010	11	455.4	13.2	<.001
Residual	830	24	34.6		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Figura A.3.5

Cantidad de individuos (protozoarios en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. a 5 ppt de salinidad al inicio y al final del tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

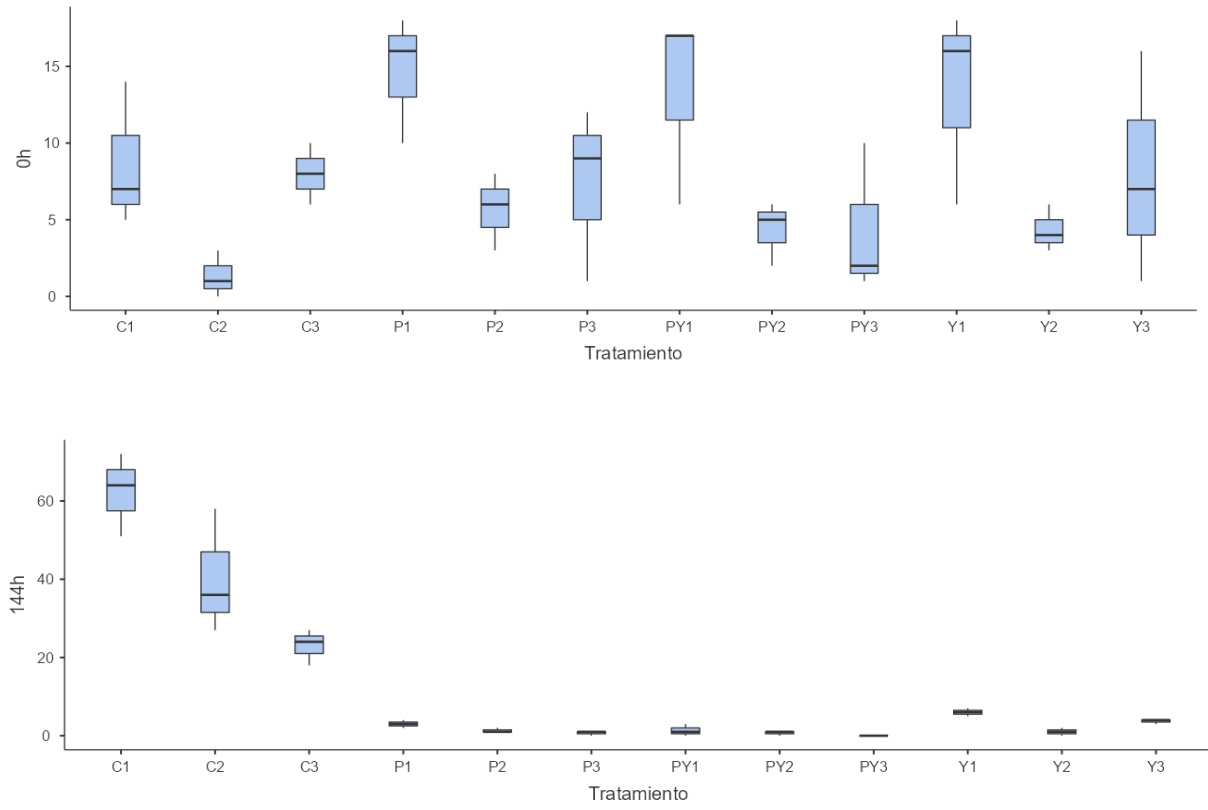


Figura A.3.6

Cantidad de individuos (protozoarios en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. a 9 ppt de salinidad al inicio y al final del tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

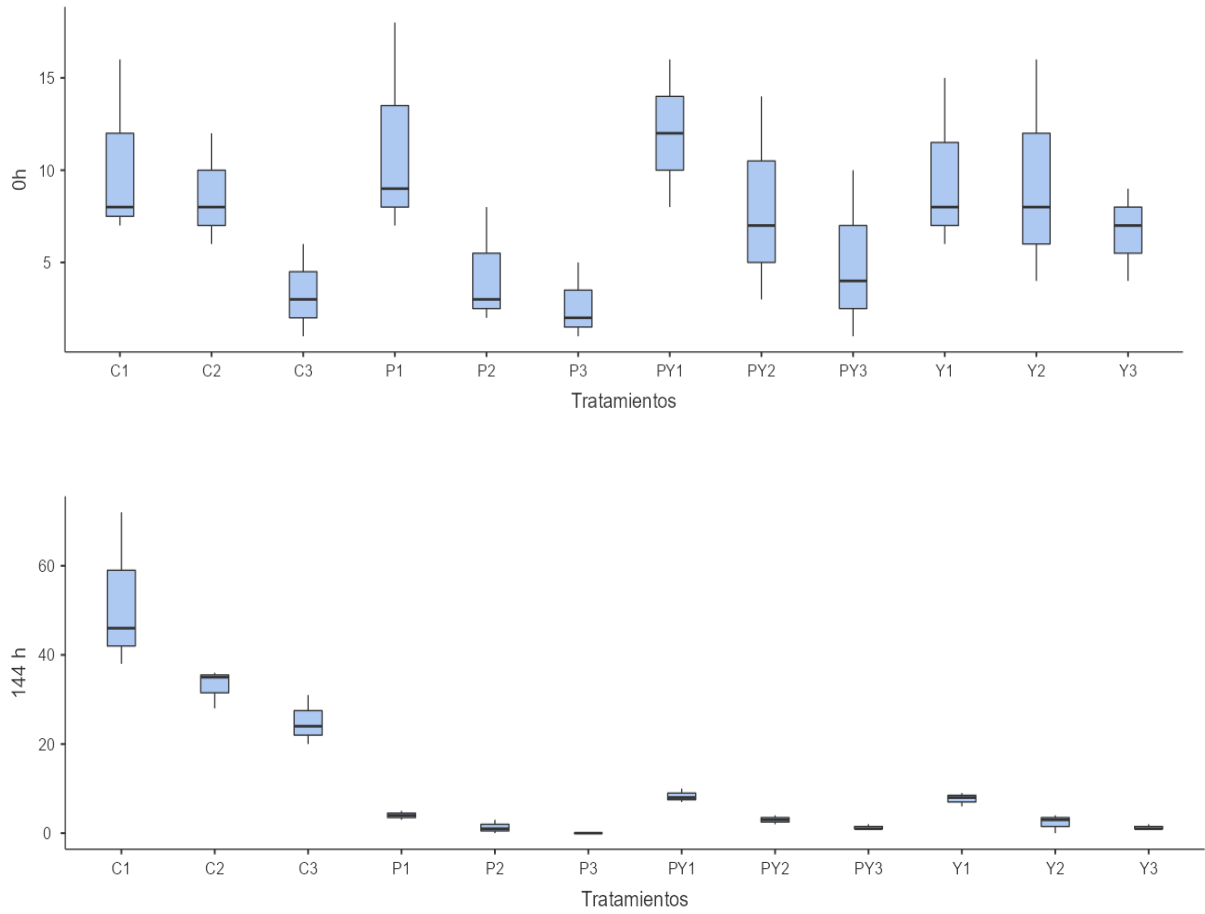


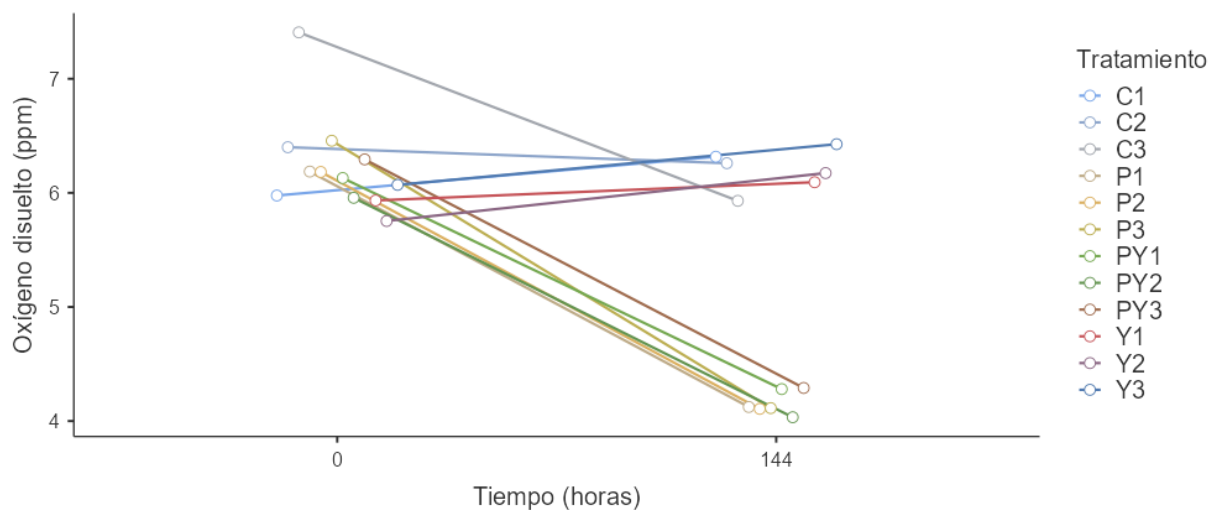
Tabla A.3.7

Se reporta el oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. (promedio \pm desviación estándar) al inicio y al final del tercer ensayo tras de haber inoculado los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a una concentración de 5 y 9 ppt de salinidad. Cada uno de los valores correspondientes a los tratamientos se indican con diferentes letras, los mismos que son significativamente diferentes a $p < 0.05$

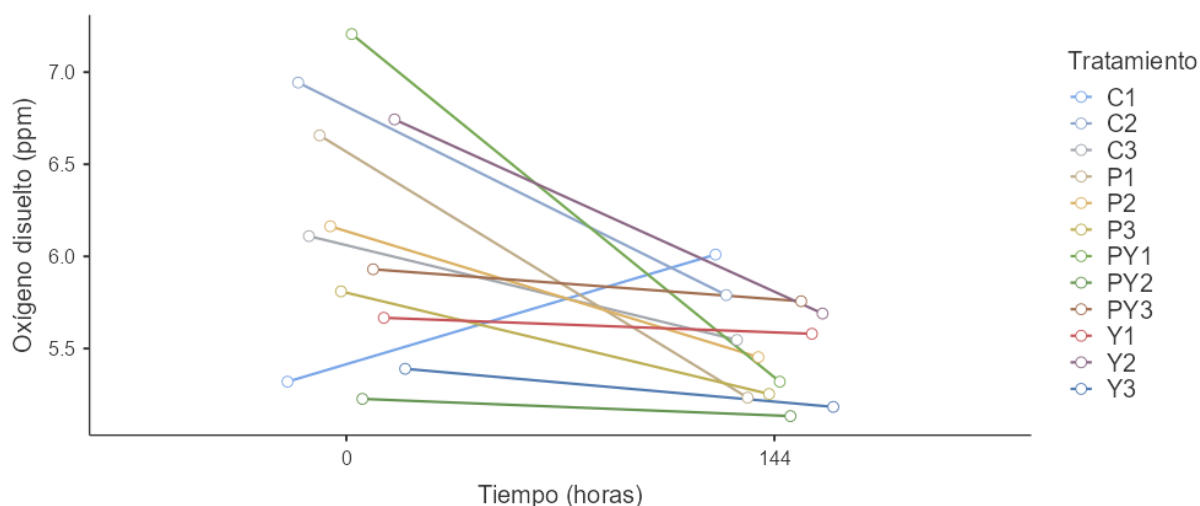
Salinidad (ppt)	5		9	
Tratamiento	0 h	144 h	0 h	144 h
C1	5.32 \pm 0.305 ^{ab}	6.01 \pm 0.128 ^a	5.98 \pm 0.120 ^a	6.32 \pm 0.0751 ^b
C2	6.94 \pm 0.947 ^{cd}	5.79 \pm 0.298 ^a	6.40 \pm 0.921 ^a	6.26 \pm 0.262 ^b
C3	6.11 \pm 0.364 ^{abcd}	5.55 \pm 0.457 ^a	7.41 \pm 0.445 ^b	5.93 \pm 0.137 ^b
P1	6.66 \pm 0.312 ^{abcd}	5.23 \pm 0.225 ^a	6.19 \pm 0.181 ^a	4.12 \pm 0.400 ^a
P2	6.16 \pm 0.266 ^{abcd}	5.45 \pm 0.391 ^a	6.18 \pm 0.236 ^a	4.11 \pm 0.197 ^a
P3	5.81 \pm 0.452 ^{abcd}	5.25 \pm 0.229 ^a	6.46 \pm 0.293 ^{ab}	4.11 \pm 0.360 ^a
PY1	7.21 \pm 0.271 ^d	5.32 \pm 0.160 ^a	6.13 \pm 0.139 ^a	4.28 \pm 0.547 ^a
PY2	5.23 \pm 0.187 ^a	5.13 \pm 0.248 ^a	5.96 \pm 0.112 ^a	4.03 \pm 0.508 ^a
PY3	5.93 \pm 0.760 ^{abcd}	5.76 \pm 0.156 ^a	6.29 \pm 0.159 ^a	4.29 \pm 0.324 ^a
Y1	5.67 \pm 0.715 ^{abc}	5.58 \pm 0.289 ^a	5.93 \pm 0.186 ^a	6.09 \pm 0.294 ^b
Y2	6.74 \pm 0.0987 ^{bcd}	5.69 \pm 0.439 ^a	5.75 \pm 0.103 ^a	6.17 \pm 0.145 ^b
Y3	5.39 \pm 0.370 ^{ab}	5.18 \pm 0.388 ^a	6.07 \pm 0.0889 ^a	6.43 \pm 0.364 ^b

Figura A.3.7

Oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* en el tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* a 5 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

**Figura A.3.8**

Oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* en el tercer ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis* a 9 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

Tabla A.3.8

ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto a 5 ppt de salinidad al final del tercer ensayo en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis*

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	6.51	1	6.510	50.13	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	8.07	11	0.734	5.65	< .001
Residual	3.12	24	0.130		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	9.01	11	0.819	4.12	0.002
Residual	4.77	24	0.199		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.3.9

ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto a 9 ppt de salinidad al final del tercer ensayo en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	19.84	1	19.845	162.9	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	21.92	11	1.992	16.4	< .001
Residual	2.92	24	0.122		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	22.13	11	2.012	20.0	< .001
Residual	2.41	24	0.101		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

A.4 Cuarto ensayo

Tabla A.4.1

Efecto de los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis en la densidad de crecimiento (células/ml) de la microalga Kirchneriella sp durante el cuarto ensayo. Se reporta la densidad de crecimiento (células/ml) de la microalga Kirchneriella sp. obtenida luego de haber suministrado cada uno de los tratamientos: C, P, PY y Y (promedio \pm desviación estándar) a una concentración de 5 y 9 ppt de salinidad. Las letras distintas en cada columna indican significancia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos según el análisis ANOVA y la comparación múltiple de Tukey.

Salinidad (ppt)	5		9	
Tratamiento	0 h	144 h	0 h	144 h
C	50833 \pm 14216 ^a	114167 \pm 59652 ^a	48333 \pm 6292 ^a	126667 \pm 28976 ^a
P	108333 \pm 77312 ^a	163333 \pm 114273 ^a	59167 \pm 18428 ^a	215833 \pm 85525 ^a
PY	45833 \pm 6292 ^a	128333 \pm 26732 ^a	35000 \pm 15000 ^a	157500 \pm 69056 ^a
Y	84167 \pm 80325 ^a	125833 \pm 30856 ^a	51667 \pm 32628 ^a	153333 \pm 80052 ^a

Figura A.4.1

Comparación de la densidad de crecimiento de la microalga *Kirchneriella sp.* en los tratamientos control con aquellos en los que se inoculó los diferentes extractos bacterianos a 5 y 9 ppt de salinidad durante el tercer ensayo

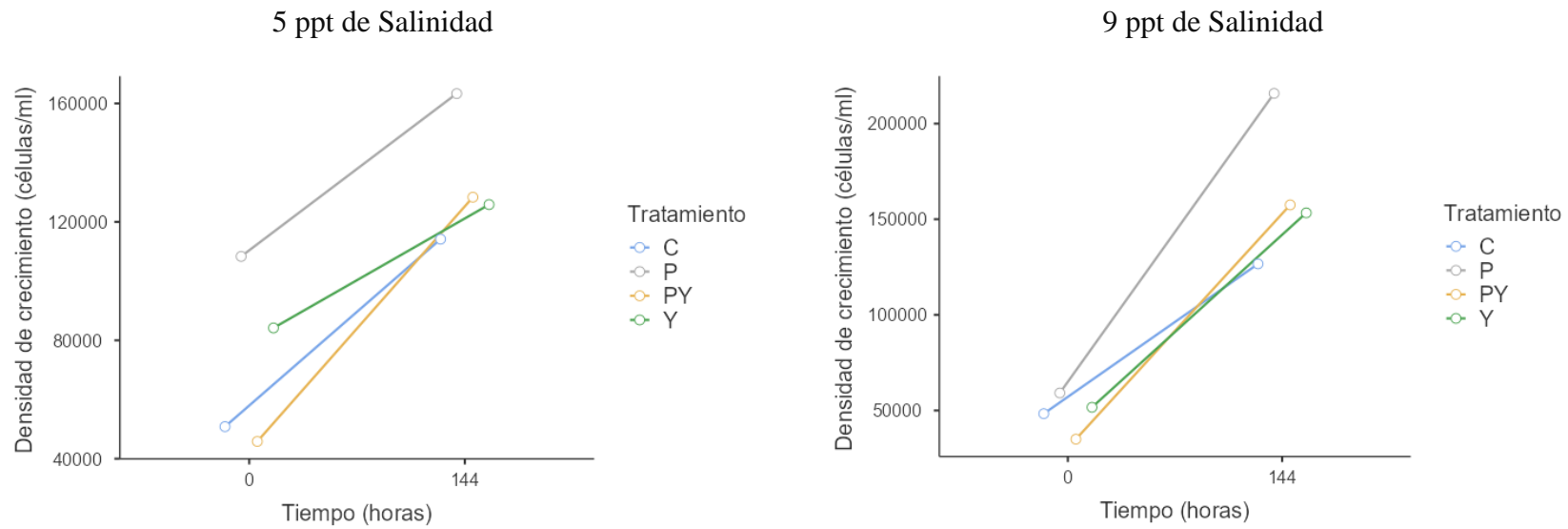


Tabla A.4.2

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al cuarto ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 5 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	2.21e+10	1	2.21e+10	6.497	0.034
Tiempo (horas) * Tratamiento	1.32e0+9	3	4.38e0+8	0.129	0.940
Residual	2.72e+10	8	3.39e0+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	1.05e+10	3	3.51e+9	0.808	0.524
Residual	3.48e+10	8	4.34e+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.4.3

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al cuarto ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 9 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	7.91e+10	1	7.91e+10	40.561	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	4.97e0+9	3	1.66e0+9	0.850	0.504
Residual	1.56e+10	8	1.95e0+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	8.65e0+9	3	2.88e+9	0.874	0.494
Residual	2.64e+10	8	3.30e+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.4.4

Se reporta el oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. (promedio \pm desviación estándar) al inicio y al final del cuarto ensayo tras de haber inoculado los tratamientos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a una concentración de 5 y 9 ppt de salinidad. Cada uno de los valores correspondientes a los tratamientos se indican con diferentes letras, los mismos que son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

Salinidad (ppt)	5		9	
	0 h	144 h	0 h	144 h
C1	5.52 \pm 0.32 ^a	3.78 \pm 0.21 ^a	6.11 \pm 0.46 ^a	4.30 \pm 0.21 ^a
P1	5.70 \pm 0.58 ^a	3.64 \pm 0.09 ^a	5.95 \pm 0.21 ^a	4.32 \pm 0.22 ^a
PY3	5.54 \pm 0.33 ^a	3.16 \pm 0.78 ^a	5.39 \pm 0.48 ^a	4.04 \pm 0.58 ^a
Y1	5.38 \pm 0.32 ^a	4.03 \pm 0.57 ^a	5.69 \pm 0.36 ^a	3.84 \pm 0.61 ^a

Figura A.4.2

Oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. correspondiente al cuarto ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 5 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

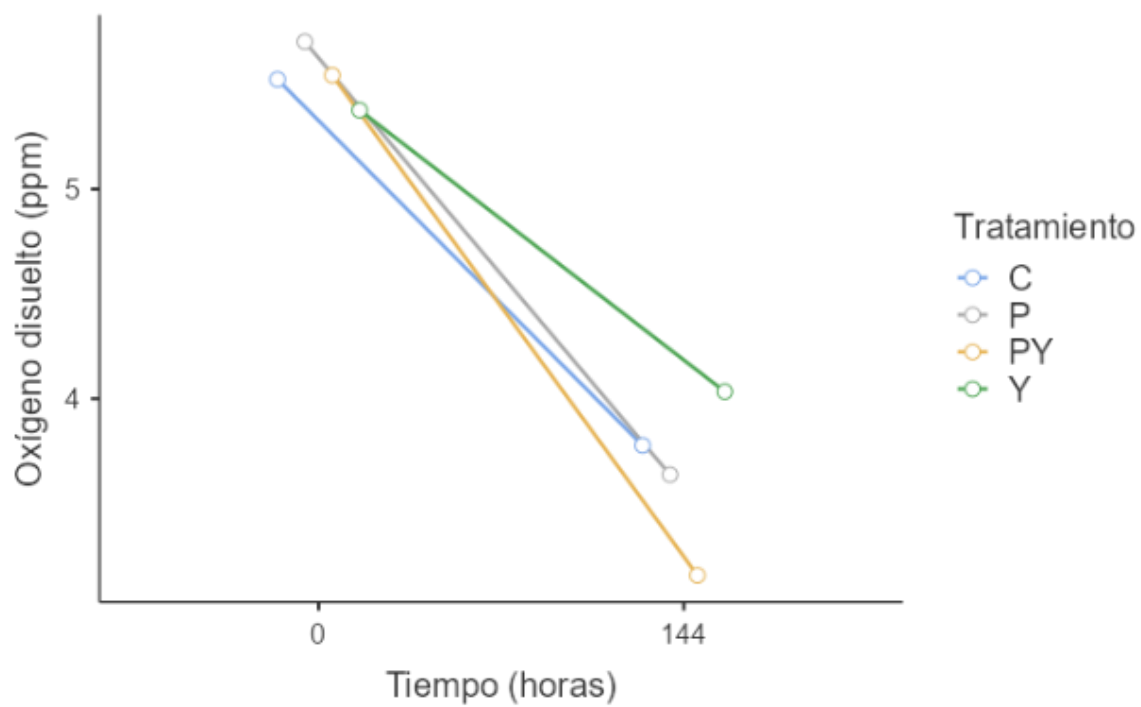


Figura A.4.3

Oxígeno disuelto (ppm) en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. correspondiente al cuarto ensayo tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 9 ppt de salinidad en el transcurso de 144 horas

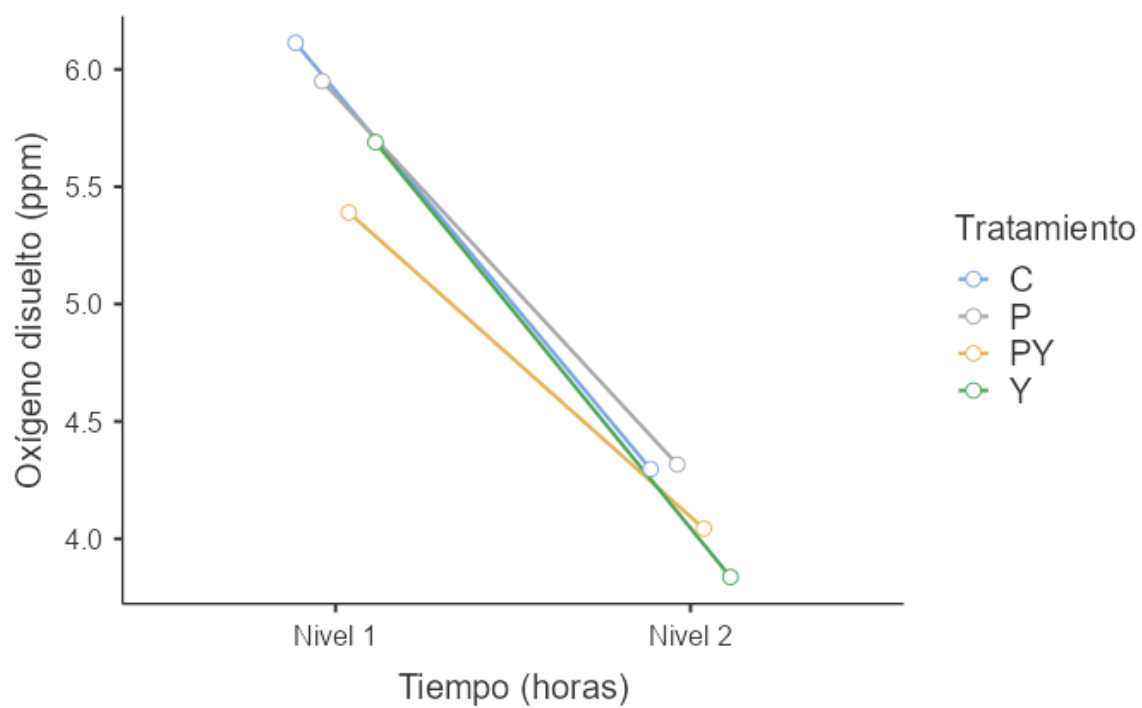


Tabla A.4.5

ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto a 5 ppt de salinidad correspondiente al cuarto ensayo en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	21.338	1	21.338	107.8 2	< .00 1
Tiempo (horas) * Tratamiento	0.896	3	0.299	1.51	0.285
Residual	1.583	8	0.198		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	0.485	3	0.162	0.771	0.54 2
Residual	1.676	8	0.210		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.4.6

ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto a 9 ppt de salinidad correspondiente al cuarto ensayo en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	16.583	1	16.5834	226.77	< .001
Tiempo (horas) *	0.241	3	0.0804	1.10	0.404
Tratamiento					
Residual	0.585	8	0.0731		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	1.13	3	0.376	1.34	0.327
Residual	2.23	8	0.279		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

A.5 Quinto ensayo

Tabla A.5.1

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al quinto ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 5 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	9.14e+10	1	9.14e+10	11.47	0.005
Tiempo (horas) * Tratamiento	3.56e+10	3	1.19e+10	1.49	0.267
Residual	9.56e+10	12	7.96e0+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	4.34e+10	3	1.45e+10	1.37	0.300
Residual	1.27e+11	12	1.06e+10		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.5.2

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al quinto ensayo para el análisis de la densidad de crecimiento de la microalga Kirchneriella sp. tras haber suministrado los extractos bacterianos con Acetobacter peroxydans y Bacillus yapensis a 9 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	3.49e+11	1	3.49e+11	326.0	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	1.93e+11	3	6.44e+10	60.1	< .001
Residual	1.29e+10	12	1.07e0+9		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	2.72e+11	3	9.06e+10	8.54	0.003
Residual	1.27e+11	12	1.06e+10		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.5.3

ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al quinto ensayo para el análisis de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga Kirchneriella sp. a 5 ppt de salinidad

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	162	1	162.0	12.8	0.004
Tiempo (horas) * Tratamiento	623	3	207.6	16.4	< .001
Residual	152	12	12.7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	312	3	104.1	9.74	0.002
Residual	128	12	10.7		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.5.4

*ANOVA de Medidas Repetidas correspondiente al quinto ensayo para el análisis de protozoarios presentes en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* a 9 ppt de salinidad*

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	42.8	1	42.8	3.20	0.099
Tiempo (horas) * Tratamiento	631.3	3	210.4	15.75	< .001
Residual	160.4	12	13.4		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	586.8	3	195.61	28.5	< .001
Residual	82.4	12	6.86		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.5.5

*ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto correspondiente al quinto ensayo a 5 ppt de salinidad en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis**

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo en horas	17.36	1	17.361	85.4	<.001
Tiempo en horas * Tratamiento	16.49	3	5.497	27.0	<.001
Residual	2.44	12	0.203		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	15.51	3	5.171	15.7	<.001
Residual	3.95	12	0.329		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Tabla A.5.6

*ANOVA de Medidas Repetidas para el análisis del oxígeno disuelto a 9 ppt de salinidad correspondiente al quinto ensayo en el cultivo de la microalga *Kirchneriella sp.* tras haber suministrado los extractos bacterianos con *Acetobacter peroxydans* y *Bacillus yapensis**

Efectos Dentro de los Sujetos

Efectos Dentro de los Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tiempo (horas)	33.42	1	33.415	71.89	< .001
Tiempo (horas) * Tratamiento	11.11	3	3.702	7.96	0.003
Residual	5.58	12	0.465		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3

Efectos Entre Sujetos

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
Tratamiento	19.25	3	6.417	48.8	< .001
Residual	1.58	12	0.132		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo 3