ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Efecto de diferentes regímenes de fertilización sobre la relación fitoplancton-bacterioplancton en mesocosmos"

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:

Marita Elizabeth Monserrate Vite

Guayaquil – Ecuador

2003

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:

FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL

COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA

UNIVERSIDAD DE GANTE BÉLGICA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LOVAINA – BÉLGICA

VITA

Marita Elizabeth Monserrate Vite, hija de Manuel Monserrate y Elvira Vite, nació en Guayaquil, Ecuador, el 7 de Marzo de 1971. Sus estudios secundarios los realizó en el Colegio ¨Dolores Sucre¨, logró el grado de bachiller clásico en Ciencias Químicas. Estudió en la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales y obtuvo el título de Bióloga en el año 1996. Trabajó tres años como asistente de producción en cultivos de camarón para el grupo EXPALSA y dos años en la empresa el ROSARIO S.A. En el año 2001 fue aceptada para el Programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, financiada por la Cooperación Técnica Belga.

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Marita Monserrate Vite

TRIBUNAL DE TESIS

Eduardo Cervantes Ing.
Presidente del Tribunal

Laurence Massaut, Ph.D.
Director de Tesis

Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal

Ricardo Cedeño
Miembro del Tribunal

María de Lourdes Cobo, M.Sc.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su amor, dedicación y paciencia.

A mis hermanos, quienes con su apoyo brindado, me enseñaron que no es importante llegar sino mantenerse y cumplir, gracias por creer en mí.

A Laurence Massaut por su orientación esmerada, instrucción y profesional asistencia en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros de generación: Ma Elena, Galo, Robin, Ma. Elena S., William, René, Mervin y Yuri; gracias por su amistad y el placer de haber compartido dos años irrepetibles; aprendí con ustedes que la unión y la constancia son dos pasos que llevan al logro final.

A mis amigos de siempre, las personas que fuera del CENAIM hicieron fuerza para la culminación de este trabajo.

Al personal de los laboratorios de análisis ambiental químico y microbiológico por el entrenamiento recibido.

DEDICATORIA

A los tres seres que han hecho posible la culminación de este esfuerzo.

J. E. J.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análisis de Componente Principal
DIM	Materia inorgánica disuelta (Dissolved Inorganic Matter)
DOM	Materia orgánica disuelta (Dissolved Organic Matter)
org/L	Organismos por litro
org/mL	Organismos por mililitro
PCBs	Policlorobifenil
PIM	Materia inorgánica particulada (Particulate Inorganic Matter)
POM	Materia orgánica particulada (Particulate Organic Matter)
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (Thiosulfate Citrate Bilis Sucrose)
TDS	Total de sólidos disueltos (Total Dissolved Solids)
TIM	Total de materia inorgánica (Total Inorganic Matter)
TOM	Total de materia orgánica (Total Organic Matter)
TS	Sólidos totales (Total Solids)
TSA	Agar tríptico de soya (Tryptic Soy Agar)
TSS	Total de sólidos suspendidos (Total Suspended Solids)
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro

RESUMEN

Se estudió el efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos y orgánicos sobre la relación bacterioplancton – fitoplancton en mesocosmos (24 tanques de una tonelada de capacidad), llenados con agua del canal reservorio de la camaronera COFIMAR (Palmar, Ecuador). Se controló la presencia del zooplancton adulto al principio de cada experimento en la mitad de los tanques, llenándolos con agua filtrada a través de una malla de 30 µm. Durante el primer experimento se adicionaron dos veces a la semana los fertilizantes inorgánicos (urea y súper fosfato triple) en una relación 10N:1P y 5N:1P. En el segundo experimento, se adicionó alimento balanceado (28% de proteína) cada día a razón de 0,8 g y melaza una vez a la semana con dosis de 1 g. Cada experimento tuvo una duración de 30 días con cuatro réplicas por tratamiento. Se tomaron muestras para cuantificar el plancton, las bacterias totales (agar marino) y *Vibrio* spp. (agar TCBS) y estimar las concentraciones de clorofila *a* y los sólidos los días 0, 10, 20 y 30. Además, de cada muestreo se aislaron las cepas bacterianas dominantes para su identificación bioquímica. En el primer experimento, las biomasas del fitoplancton y de las bacterias incrementaron con la adición de fertilizantes inorgánicos sin encontrar diferencia entre los dos niveles de aporte en fósforo. El fitoplancton dominado por *Synechocystis* no fue efectivamente removido por parte de los copépodos que dominaron los conteos de zooplancton. Se encontró una relación estrecha entre los conteos de bacteria y la biomasa del fitoplancton, resaltando el efecto positivo de la fertilización para ambas variables y el aprovechamiento por parte de las bacterias del carbono orgánico derivado del fitoplancton. Se argumenta que el efecto de la fertilización inorgánica fue de tipo "bottom-up" sobre la cadena trófica, favoreciendo los niveles tróficos más bajos. La fertilización orgánica a través de la adición de alimento incrementó la biomasa del

fitoplancton los dos últimos muestreos. Los conteos de tintínnidos y rotíferos fueron más altos que en el primer experimento y la biomasa del zooplancton en general incrementó con la adición de alimento y de melaza. Se observó el efecto pastoreo de los rotíferos sobre el fitoplancton y las bacterias. Se argumenta que el efecto de la fertilización orgánica fue de tipo "top-down" sobre la cadena trófica, favoreciendo los niveles tróficos más altos que a su vez controlaron la dinámica de los niveles inferiores. En ambos experimentos se identificaron especies de *Vibrio* spp. capaces de causar mortalidades en *P. vannamei.* Sin embargo, por la dominación neta de un solo tipo de cianobacteria en ambos experimentos, no fue posible relacionar la ocurrencia de estas especies de *Vibrio* potencialmente patógenas con la aparición o dominancia de un tipo de fitoplancton en particular.

1. INTRODUCCIÓN

Los estanques camaroneros presentan un ambiente dinámico compuesto de interacciones entre camarón, materia orgánica, organismos autotróficos y heterotróficos (Fig. 1). Existe una relación desde una vía autotrófica dominada por el fitoplancton hacia una vía heterotrófica dominada por las bacterias, siendo la materia orgánica el factor intermedio (Brock y Main, 1995). Se ha comprobado que existe una relación estrecha entre la biomasa bacteriana y la presencia de abundante fitoplancton (Cottingham *et al*., 1997; Jürgens y Jeppesen, 2000). Las especies de bacterias predominantes en agua de piscinas camaroneras son de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Sung *et al*., 1999). Estos géneros son considerados oportunistas, que con cambios ambientales pueden producir focos de infección causando enfermedades y mortalidades en los cultivos de camarón (Aguirre y Ascencio, 2000). No se conocen los factores ambientales que causan el incremento en la abundancia de este tipo de bacterias. Sin embargo, bacterias Gram negativas tienen la capacidad de comunicarse utilizando señales químicas y cuando se encuentran en concentraciones altas, inducen la producción de antibióticos y factores de poder infeccioso a plantas o animales (Gram *et al*., 2002). A medida que incrementa la biomasa de los organismos presentes en las piscinas de cultivo, el equilibrio entre los diferentes componentes del ecosistema desaparece y se forman condiciones inestables con tendencias a cambios bruscos que pueden causar impactos sobre la salud y supervivencia del camarón (Aguirre y Ascencio, 2000).

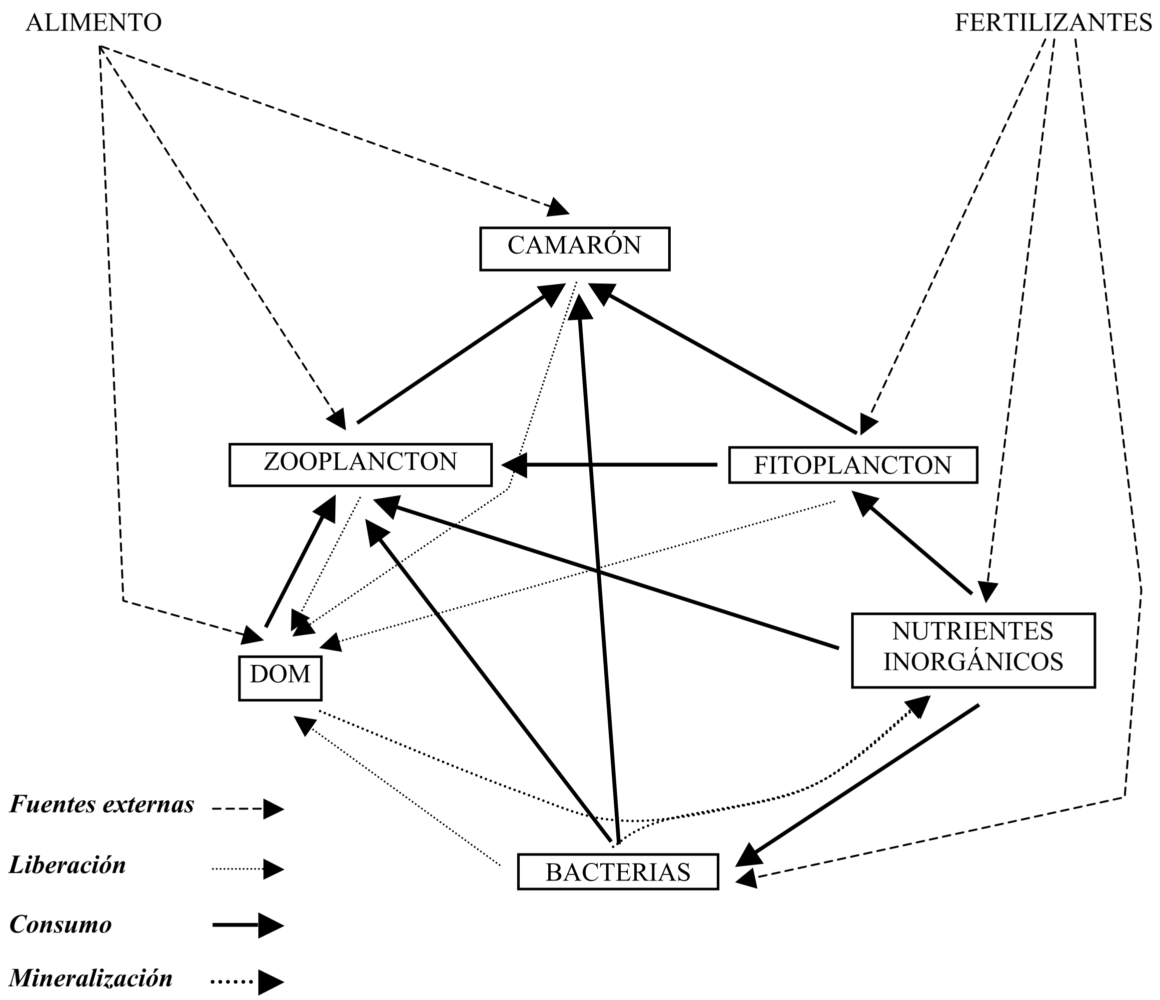

Figura 1: Diagrama de relaciones tróficas en una piscina camaronera.

Mantener una calidad de agua apropiada es esencial para un crecimiento óptimo y buena supervivencia del camarón en cultivo (Phillips *et al.*, 1993). Existen pocas técnicas de manejo para asegurar un desarrollo óptimo del fitoplancton y su consecuente beneficio en mantener una buena calidad de agua. Una técnica consiste en mantener el aporte de nutrientes, principalmente en forma de alimento balanceado, dentro de los niveles adecuados, que permitan al fitoplancton y las bacterias asimilar los desechos producidos por el cultivo. En otras ocasiones, se estimula la presencia de fitoplancton con la adición de compuestos orgánicos o inorgánicos, ricos en nitrógeno y/o fósforo, para establecer niveles de oxígeno disuelto óptimos. La adición de derivados de carbono orgánico, como glucosa y melaza, y el ajuste de la relación C:N, estimula la formación de biomasa bacteriana que ayuda a la remoción de nitrógeno inorgánico acumulado (Avnimelech *et al*., 1992; Avnimelech, 1999). En caso de emergencia se puede recambiar agua en un intento por reemplazar una agua "contaminada" con agua de supuesta mejor calidad; sin embargo la calidad del agua no siempre mejora, particularmente en grandes piscinas de producción (Lazur y Britt, 1997).

En el caso particular de problemas bacterianos, la aplicación de antibióticos o químicos con propiedad bactericida, es la técnica mayormente utilizada. Sin embargo, el uso de estos productos puede conducir al desarrollo de cepas resistentes al fármaco que a través de transferencia a otras bacterias patógenas reduce la efectividad de los antibióticos para combatir enfermedades en el camarón, en animales domésticos y hasta debilitar su uso en la terapéutica humana (Tendencia y de la Peña, 2001). Una alternativa de manejo, sería a través del control del fitoplancton, asegurando condiciones óptimas para el cultivo de camarón y evitando la aparición de condiciones propicias para el desarrollo de bacterias patógenas.

El objetivo de este estudio fue de definir interacciones entre el bacterioplancton y el fitoplancton en sistemas recibiendo diferentes fuentes de nutrientes. Se evaluó distintos regímenes de fertilización inorgánica y orgánica, identificando en ambos casos las especies dominantes de bacterias y fitoplancton. Además se controló la presencia o ausencia del zooplancton adulto al inicio del experimento para poder determinar su efecto regulador. A través de este estudio, se intentó encontrar correlaciones entre algunos parámetros de calidad de agua y la presencia de bacterias potencialmente patógenas, para recomendar técnicas de manejo alternativas y su control en piscinas camaroneras.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ROL DEL FITOPLANCTON EN PISCINAS CAMARONERAS:

2.1.1. Generalidades sobre el fitoplancton:

El fitoplancton, o plantas microscópicas en suspensión en la columna de agua, es el tipo de planta dominante en piscinas de producción acuícola. Los grupos más abundantes en aguas salobres son las diatomeas (Bacillariophyceae), los dinoflagelados (Dinophyceae), las algas azul-verdes (Cianobacteria) y las algas verdes (Chlorophyceae) (Cajas *et al.*, 2000; Yusoff *et al.*, 2002). Su composición y abundancia varían de un cuerpo de agua a otro, con el tiempo y están controladas por factores abióticos como luz, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes y por factores bióticos como presencia y composición del zooplancton (Tilman *et al.*, 1982).

La luz es indispensable para el crecimiento de las algas. A través de la fotosíntesis, el fitoplancton captura la energía solar para reducir el carbono inorgánico en carbono orgánico y producir oxígeno. La intensidad mínima para la realización de la fotosíntesis es de 1% de la luz incidente o equivalente a un mínimo de 25 lux de las radiaciones activas para la fotosíntesis (Boyd y Tucker, 1998). Sin embargo, estudios reportan que los requerimientos de luz son distintos para los diferentes grupos de algas. Una baja intensidad favorece el crecimiento de cianobacterias debido a su mayor habilidad para captar la luz y su punto bajo de compensación de luz (van Liere y Mur, 1980; Tilzer, 1987).

2.1.2. Los nutrientes y su efecto sobre la composición fitoplanctónica:

Los nutrientes esenciales para el fitoplancton además del carbono, hidrógeno y oxígeno, son el nitrógeno y el fósforo. Las concentraciones de nutrientes en el fitoplancton comparadas con concentraciones presentes en aguas salobres, indican que el nitrógeno y el fósforo son los dos nutrientes en cantidad limitante en el agua para soportar un crecimiento óptimo del fitoplancton (Boyd y Tucker, 1998). Si la concentración de uno de estos nutrientes incrementa en el agua, el crecimiento del fitoplancton aumenta (Ley del mínimo de Liebig). Además, Elser *et al.* (1990) concluyeron que la combinación de fósforo y nitrógeno aumenta el crecimiento del fitoplancton de manera más marcada que la adición simple de nitrógeno ó fósforo. A pesar de un sinnúmero de estudios publicados, no existe un consenso sobre las concentraciones mínimas de nitrógeno y fósforo para soportar una población fitoplanctónica en un cuerpo de agua. Concentraciones de fósforo total de 0,01 a 0,10 mg/L y de nitrógeno total de 0,10 a 0,75 mg/L están asociadas con densas poblaciones fitoplanctónicas (Boyd y Tucker, 1998).

La composición del fitoplancton cambia según la concentración de nutrientes y la relación N:P en el agua. En sistemas oligotróficos (pobres en nutrientes) predominan las algas verdes, en condiciones mesotróficas aumenta la presencia de diatomeas y en condiciones eutróficas (o aguas ricas en nutrientes) dominan las cianobacterias (Duarte *et al.*, 1992; Yusoff *et al.*, 2002). Además en aguas eutróficas, la concentración de fitoplancton es alta pero con poco variedad de organismos (Tucker y Lloyd, 1984). En piscinas no fertilizadas las cianobacterias constituyen apenas el 5% del conteo total, mientras que en piscinas fertilizadas o recibiendo altas tasas de alimento artificial, las cianobacterias representan mínimo un 75% de la biomasa fitoplanctónica con una, dos o tres especies dominantes (Paerl y Tucker, 1995). Algunas cianobacterias tienen la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo que les da ventaja sobre otras especies que dependen solamente del nitrógeno combinado presente en la columna de agua (Paerl, 2000). La relación entre la concentración de nitrógeno total y la concentración de fósforo total en el agua puede influir sobre la composición fitoplanctónica (Smith, 1983). El

"Redfield Ratio" nos indica que en teoría, una relación C:N:P de 106:16:1 (en base molar) asegura un crecimiento balanceado del fitoplancton. Daniels y Boyd (1993) señalaron que relaciones altas de N:P en el fertilizante (de 15:1 a 30:1) favorecen el desarrollo de diatomeas en agua salobre y por lo tanto limita el desarrollo de cianobacterias.

2.1.3. Los efectos positivos de la presencia del fitoplancton:

La presencia del fitoplancton en piscinas acuícolas permite durante el día la acumulación de oxígeno disuelto disponible para otros organismos acuáticos, la disminución de dióxido de carbono y el incremento de pH. La magnitud de las fluctuaciones diarias en las concentraciones de estas variables incrementan con poblaciones de fitoplancton más alta (Boyd y Tucker, 1998). La presencia del fitoplancton también influye en la calidad de agua a través de la remoción de nutrientes. En piscinas de producción, las concentraciones de amonio total y fósforo soluble reactivo son más bajas en presencia de una población fitoplanctónica con crecimiento rápido (Burford, 1997). Tucker *et al*. (1984) han demostrado que existe una relación estrecha entre la concentración de amonio total y la presencia de fitoplancton en piscinas de producción de bagre de canal.

El fitoplancton en combinación con las bacterias forman la base de la cadena trófica en los sistemas acuáticos. El alimento natural de los camarones incluye fitoplancton, zooplancton y bentos. Sin embargo, diferentes especies de camarones exhiben distintas preferencias por el alimento natural. *Penaeus vannamei* es considerada una de las especies menos carnívoras, dependiendo más de la productividad natural primaria, a diferencia de *Penaeus stylirostris* o *Penaeus monodon* que tienen preferencias para proteínas animal como el zooplancton (Chong y Sasekumar, 1981). Gamboa (2001) reporta que el contenido estomacal de *P. vannamei* (entre 6 y 8 g) en un sistema semi-intensivo en Ecuador, estaba compuesto al 91% de alimentos naturales, de los cuales el 75% correspondía a material vegetal.

2.1.4. Problemas asociados con el fitoplancton:

Se considera que la mayoría de los problemas de calidad de agua en piscinas camaroneras es el resultado de un inapropiado control y manejo de la comunidad fitoplanctónica (Tucker y Lloyd, 1984). Poblaciones de fitoplancton densas y con poca variedad son muy inestables y pueden tener colapsos repentinos provocando caídas abruptas de oxígeno disuelto y estrés o muerte en los animales en cultivo (Boyd y Tucker, 1998). Se considera que la completa recuperación de un colapso del fitoplancton en piscinas de producción puede tomar hasta siete días (Boyd *et al.*, 1975).

Las cianobacterias generalmente asociadas con condiciones eutróficas presente en piscinas camaroneras, no son una buena fuente de producción primaria y aportan con poco oxígeno disuelto al medio (Paerl y Tucker, 1995). Algunas pueden producir metabolitos olorosos que han sido consideradas como la fuente primaria de sabor choclo o terroso en los camarones (Massaut, 1999). Malos sabores desaparecen cuando el animal no es expuesto por un cierto tiempo al compuesto oloroso, lo que normalmente requiere un recambio de agua fuerte y tiempo extra antes de la cosecha, traduciéndose en un incremento en los costos de producción (Boyd y Tucker, 1998). Muchas poblaciones de fitoplancton dominadas por cianobacterias son completamente inofensivas pero algunas pueden causar episodios tóxicos (Paerl, 2000). Aunque las cianobacterias son muy comunes en piscinas de camarón, son pocos los reportes de efectos tóxicos. Lightner (1978) y Smith (1996) reportan la presencia de toxinas producidas por cianobacterias en concentraciones sub-letales que probablemente causan el debilitamiento del camarón haciéndolo propenso a infecciones bacteriales secundarias.

2.2. ROL DE LAS BACTERIAS EN PISCINAS CAMARONERAS:

2.2.1. Generalidades sobre bacterias presente en piscinas camaroneras:

Las bacterias son un grupo diverso de microorganismos que viven libre, en asociación con partículas o en el sedimento de piscinas camaroneras. La fuente principal de alimento para las bacterias heterotróficas es la materia orgánica presente en las piscinas, mientras que las bacterias autotróficas son capaces de producir energía para su crecimiento a partir de la transformación química de nutrientes inorgánicos. La presencia o ausencia de oxígeno determina el tipo de bacteria presente. Se puede clasificar a las bacterias en organismos aeróbicos obligatorios (no pueden vivir sin oxígeno), anaeróbicos obligatorios (deben vivir sin oxígeno) y anaeróbicos facultativos (independientes de la presencia de oxígeno) (Pelczar *et al*., 1996).

Las bacterias predominantes en agua de piscinas camaroneras son del género *Vibrio* como el *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, y los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Sung *et al*., 1999). Estas bacterias se encuentran en aguas con amplio rangos de salinidad, en el suelo o dentro de la flora intestinal de los camarones. En Ecuador, Bayot *et al*. (2001) reportan concentraciones de bacterias totales en la columna de agua de piscinas con *P. vannamei* de $1x10^4$ a $1x10^6$ UFC/mL y datos no publicados del CENAIM indican concentraciones en condiciones normales de *Vibrio* spp. de $1x10^2$ a $1x10^3$ UFC/mL. Estos valores son más altos que concentraciones reportadas por Sung *et al*. (1999) de $3x10^2$ a $1x10^4$ UFC/mL en bacterias totales para piscinas con *P. monodon*. Normalmente, las concentraciones bacterianas son más altas en los sedimentos debido a un mayor contenido de materia orgánica (Rao y Karunasagar, 2000). Datos no publicados del CENAIM indican concentraciones totales de bacteria de $1x10^3$ a $1x10^8$ UFC/g en sedimentos de piscinas camaroneras. Gomez-Gil *et al.* (1998) estudiaron la composición bacteriana del hepatopáncreas de *P. vannamei* sanos y encontraron concentraciones de *Vibrio* spp. de $4{,}30x10^4$ UFC/g con presencia de *Photobacterium phosphoreum*, V. *alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio tubiashii* y *Vibrio vulnificus*.

2.2.2. Crecimiento bacteriano y oxidación de la materia orgánica:

Las bacterias se reproducen por fisión binaria con la formación de dos células nuevas a partir de la célula original. El tiempo de generación o tiempo para duplicar la población es diferente para cada especie y dentro de la misma especie varia con niveles de temperatura, oxígeno disuelto, pH y nutrientes minerales y con la disponibilidad de substrato. A temperatura sub-óptima, un incremento de 10°C normalmente resulta en una tasa de crecimiento bacteriano doble (Boyd, 2001). Las bacterias crecen mejor a pH de 7 a 8 y la descomposición de la materia orgánica también es más rápida en condición neutral o alcalina moderada, que en condición ácida. Además, substratos con cantidad alta de nitrógeno son descompuestos más rápidamente porque las bacterias requieren de una cantidad alta de nitrógeno, y estos tipos de compuestos usualmente contiene menos componentes estructurales resistentes a la descomposición (Boyd, 2001). Siendo organismos pequeños y de crecimiento rápido, las bacterias son mayormente afectadas por la aplicación de nutrientes llegando a responder en apenas 12 horas a una aplicación de nitrógeno y fósforo (Kerr *et al.*, 1971).

El rol ecológico más importante de las bacterias en piscinas camaroneras es la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes. Estas actividades ocurren tanto en la columna de agua como en el sedimento de la piscina, siendo mayor la descomposición en la interfase agua-suelo (Hargreaves, 1998). Las bacterias adquieren de la materia orgánica, los nutrientes inorgánicos y orgánicos necesarios para su crecimiento y a través de la respiración aeróbica remueven oxígeno disuelto y liberan dióxido de carbono, amonio y otras substancias minerales. La liberación de nutrientes inorgánicos es a su vez aprovechada por parte del fitoplancton. Hargreaves (1998) estimó que el retorno del nitrógeno a través de la descomposición bacteriana, hacia el fitoplancton en piscinas de cultivo del bagre de canal, toma de uno a dos meses. Algunos substratos son descompuestos más rápidamente que otros, pero pocos compuestos orgánicos resisten completamente a la descomposición por parte de las bacterias. El proceso de descomposición de la materia orgánica esta controlado por la relación C:N de los compuestos involucrados; una relación de 5 C:1 N asegura una total descomposición de la materia orgánica (Boyd y Tucker, 1998).

Sin embargo, es difícil evaluar el efecto directo de la presencia de algunas bacterias sobre el reciclaje de nutrientes, lo cual es muy complejo e involucra un sinnúmero de reacciones heterotróficas con producción de metabolitos intermediarios, muchos no identificados. Boyd y Tucker (1998) presentan resultados de adiciones en agua y suelo de concentrados de suspensiones bacteriales en un intento para reducir la materia orgánica y remover amonio, sin tener el efecto esperado. En piscinas camaroneras pueden existir un aumento de los desechos orgánicos provenientes de las excretas de los animales, alimento balanceado no consumido y una sobre utilización de fertilizantes provocando la acumulación de amonio, un metabolito tóxico. Según estudios realizados por Avnimelech *et al.* (1992) y Avnimelech (1999) la adición de derivados de carbono orgánico, como glucosa y melaza, y el ajuste de la relación C:N en el ecosistema acuático, estimulan la formación de biomasa bacteriana y remoción del nitrógeno inorgánico acumulado. Adicionalmente, el resultado de esta producción heterotrófica puede ser utilizada como fuente de proteínas para el camarón en cultivo (McIntosh *et al*., 2000).

2.2.3. Nitrificación:

Durante la nitrificación, bacterias quimioautotróficas oxidan amonio en nitrato, produciendo así la energía requerida para reducir el dióxido de carbono en carbono orgánico. Este proceso es muy parecido a la fotosíntesis, pero no requiere de luz, consume oxígeno y produce hidrógeno que puede ocasionar una acidificación del medio. Bacterias del género *Nitrosomonas* oxidan el amonio en nitrito y bacterias del género *Nitrobacter* oxidan el nitrito en nitrato. Estos dos géneros son comunes en sistemas acuáticos, crecen mejor a temperaturas entre 25 y 35°C y a pH de 7 a 8 (Boyd, 2001). Hargreaves (1998) reporta que la nitrificación en la parte aeróbica de los sedimentos de piscinas acuícolas es mayor que en la columna de agua. En sistemas naturales, la tasa de nitrificación puede ser influenciada por la disponibilidad de carbono orgánico. Strauss y Lamberti (2002) demostraron que la adición de glucosa incrementó el metabolismo de las bacterias heterotróficas que a través de competencia por el amonio, limitaron el desarrollo de las bacterias nitrificantes.

El nitrato producido durante la nitrificación puede ser absorbido por el fitoplancton y las bacterias, y en condiciones anaeróbicas puede entrar en el proceso de denitrificacíon y ser transformado en gas nitrógeno que se difunde del ecosistema. El proceso de denitrificación implica el uso del oxígeno de la molécula de nitrato para la oxidación de materia orgánica por parte de algunas bacterias (Boyd, 2001).

<u>2.2.4. Bacterias patógenas:</u>

Las bacterias de tipo Gram negativas como *Vibrio* spp. y A*eromonas* spp. son consideradas patógenas oportunistas para el camarón (Lightner, 1983). Estas bacterias son parte de la flora autóctona de los organismos marinos y de sus ecosistemas, representando una fuente constante de posible infección para el crustáceo (Aguirre y Ascencio, 2000). La ocurrencia de una enfermedad depende de un cambio en la interacción entre el patógeno, el huésped y el medio ambiente. Existen reportes de diferentes bacterias oportunistas que han causado grandes perdidas en la producción de camarón a través de lesiones de tejidos (necrosis), malformación, crecimiento más lento y metamorfosis retardada en estadios larvarios (Aguirre y Ascencio, 2000).

La principal enfermedad de tipo bacteriano en camarones penaeidos es la vibriosis (Lightner, 1983). Las bacterias del género *Vibrio* son oportunistas, aprovechan los cambios en el medio natural para causar estrés al animal y mortalidad. *V. harveyi*, una especie luminiscente, puede causar altas mortalidades durante la larvicultura y en piscinas de producción de *P. vannamei* (Moriarty, 1998). También, brotes de enfermedades en *P. vannamei* han sido atribuidos a la presencia *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*, *V. vunlnificus* y *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000). La abundancia natural de *Vibrio* spp., su ubicuidad, su tasa de crecimiento alta y su habilidad para adaptarse a cambios en el ecosistema de piscinas camaroneras, incrementan la posibilidad de causar enfermedades (Saulnier *et al.*, 2000).

Trabajos recientes han sido dirigidos en identificar los factores detonantes en la adquisición de la patogenicidad en bacterias. Se sabe que camarones sanos tienen una fauna bacteriana variada en sus tejidos, mientras que en animales enfermos predominan uno o dos especies de *Vibrio* (Gomez-Gil *et al.*, 1998). Las bacterias Gram negativas cuando se encuentran en densidades altas, se comunican entre ellas a través del intercambio de señales químicas, mecanismo conocido como "Quórum Sensing" (Gram *et al.*, 2002). El Quórum Sensing permite la producción de antibióticos, factores de virulencia e infección de organismos eucariotes (De La Cruz, 2001).

2.3. RELACIONES FITOPLANCTON-BACTERIA:

Estudios han comprobado que existe una correlación entre la biomasa bacteriana y la densas poblaciones de fitoplancton (Cottingham *et al.*, 1997; Jürgens y Jeppesen, 2000). En sistemas acuáticos, la producción de materia orgánica disuelta (DOM) por parte del fitoplancton soporta la producción heterotrófica bacteriana (Nagata, 2000; Turley *et al.*, 2000). Existen tres fuentes de DOM: la liberación por parte del fitoplancton, el efecto pastoreo del zooplancton, o la muerte del fitoplancton (Nagata, 2000). En promedio el 50% de la producción primaria en los océanos sirve de substrato para la producción bacteriana (Almeida *et al.*, 2001). Vrede *et al.* (1999) encontraron que en un lago, la poca liberación de carbono orgánico por parte del fitoplancton limitó el crecimiento de las bacterias. Caron *et al.* (2000) confirmaron este efecto limitante para sistemas de agua marina. Sin embargo en sistemas eutróficos, la eficiencia de las bacterias en transformar el DOM disminuye y se puede observar una acumulación de carbono orgánico en el sistema (Turley *et al.*, 2000).

Paerl (2000) menciona que las cianobacterias están asociadas con microorganismos como bacterias heterotróficas, hongos y ciliados que se encuentran en la capa de mucílago o cápsula que protege a la célula. Un ejemplo particular es el establecimiento de bacterias alrededor del heterocisto donde ocurre la fijación de nitrógeno atmosférico, para poder aprovechar de la formación de amonio en esta célula especializada de las cianobacterias (Paerl y Tucker, 1995). Moriarty (1999) menciona que *Vibrio* spp. pueden sobrevivir condiciones adversas adhiriéndose a células de fitoplancton. En piscinas acuícolas, se podría observar un incremento de *Vibrio* spp. patógenos siguiendo un aumento en la población de cianobacterias (Midlen y Redding, 1998).

Las bacterias son mucho más efectivas en absorber nutrientes que el fitoplancton por tener un tiempo de generación más corto (Cottingham *et al*., 1997). Se observa que en sistemas oligotróficos la competencia entre fitoplancton y bacteria es más marcada por ser limitantes en nutrientes, que en los eutróficos. En un sistema oligotrófico las bacterias son limitadas por la disponibilidad de nitrógeno y fósforo, mientras que en sistemas más ricos en nutrientes las bacterias son controladas por la concentración de carbono orgánico o sea la producción primaria (Caron *et al*., 2000).

2.4. TÉCNICAS DE MANEJO PARA EL CONTROL DEL FITOPLANCTON EN PISCINAS CAMARONERAS:

Durante los primeros días del cultivo de camarón se adiciona fertilizantes a los estanques para incrementar la productividad primaria y mejorar el crecimiento del animal (Boyd y Tucker, 1998). Los fertilizantes inorgánicos o compuestos químicos con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, actúan directamente sobre el fitoplancton estimulando su crecimiento. Mientras los fertilizantes orgánicos a base de desechos animal o vegetal, pueden servir de alimento directo para el animal en cultivo, de alimento para el zooplancton que a su vez puede convertirse en presa para el camarón, o pueden ser mineralizados por procesos bacterianos e incrementar las concentraciones de nutrientes inorgánicos favoreciendo el crecimiento del fitoplancton.

Los fertilizantes inorgánicos son los mismos que los usados en agricultura y son compuestos con altas concentraciones de nitrógeno, fósforo, potasio y, en algunos casos, sílice. Los compuestos ricos en nitrógeno mas ampliamente utilizados en acuicultura son la urea, las sales de amonio o sales de nitrato. La forma común de aplicación del fósforo es como fosfato por medio de superfosfato, superfosfato triple o en combinación con nitrógeno como el fertilizante diamonio de fosfato. Raramente se requiere añadir potasio en piscinas camaroneras, por lo que los fertilizantes con potasio no son de uso común (Boyd y Tucker, 1998). Las diatomeas requieren de sílice para formar frústulas alrededor de sus células (Pinckney *et al.*, 2001). Sin embargo, son pocos los casos de escasez de sílice en aguas salobres que requerían de la adición de un compuesto enriquecido con este elemento (Boyd y Tucker, 1998).

La relación N:P considerada en la fertilización no siempre representa la relación teórica del Redfield Ratio (106C:16N:1P) de poblaciones naturales de fitoplancton. Existen dos razones: (1) Las tasas de consumo del nitrógeno y del fósforo añadidos con el fertilizante no son idénticas; el fosfato adicionado a las piscinas es rápidamente retenido por el sedimento y el fitoplancton, mientras el nitrógeno participa en varios procesos biogeoquímicos y tiene la tendencia a ser reciclado en el ecosistema (Boyd y Tucker, 1998); (2) Además de los aportes con el alimento balanceado y los fertilizantes, el nitrógeno puede entrar en ecosistemas de producción a través de la fijación del nitrógeno atmosférico por parte de bacterias y cianobacterias (Paerl y Tucker, 1995). Una relación frecuentemente utilizada en programas de fertilización de piscinas camaroneras es 10N:1P, la cual ha dado buenos resultados para favorecer el crecimiento de fitoplancton en aguas salobres (Boyd y Tucker, 1998). La frecuencia de la aplicación de los fertilizantes ha sido muy variada a través de la historia de la acuicultura y depende principalmente del nivel de alimento artificial utilizado. Se considera que altas dosis de fertilizantes deben manejarse en los primeros días de producción siendo la parte más crítica en la iniciación de la población fitoplanctónica (Boyd y Tucker, 1998).

Los fertilizantes orgánicos provienen de desechos de animales como gallinaza y vacaza, fuentes de carbohidratos y del alimento balanceado mismo. Su efecto sobre el fitoplancton es indirecto, a través de la mineralización de la materia orgánica realizada por organismos heterotróficos y el consecuente incremento de la concentración de nutrientes inorgánicos. Los fertilizantes orgánicos presentan una desventaja debido a su bajo contenido en nitrógeno y fósforo, lo que requiere dosis mucho más altas que para los fertilizantes inorgánicos (Boyd y Tucker, 1998). Además, a favorecer el crecimiento bacteriano, contribuyen en el consumo de oxígeno disuelto lo que podría llegar a niveles de estrés para el camarón. En sistemas comerciales, el uso de alimento balanceado con un alto porcentaje de proteína contribuye en aportar nitrógeno y fósforo al medio. De todo el alimento adicionado solo de 25 a 45% del nitrógeno, 20-30% del fósforo y 10-15% del carbono son convertidos en tejido por el camarón (Briggs y Funge-Smith, 1994; Boyd y Teichert-Coddington, 1995). De la porción no asimilada, una parte es inmovilizada por absorción del suelo y fijación por bacterias, otra es volatilizada y la restante es absorbida por el fitoplancton o descargada en los efluentes (Boyd y Tucker, 1998; Ritvo *et al*., 1998).

Teóricamente, concentraciones excesivas de fitoplancton pueden ser controladas, si las algas son removidas en una tasa que exceda su tasa máxima de crecimiento (Reynolds *et al*., 1982). En la práctica, esto puede significar una remoción de al menos 10% de la biomasa por día, ya sea por vía mecánica, química o biológica (van Liere y Mur, 1980). La técnica mecánica mayormente empleada en piscinas de camarones, es el recambio de un gran volumen de agua fluyendo a través del estanque. Sin embargo, las regulaciones ambientales dirigidas a la reducción de descargas incontroladas de efluentes acuícolas debido a impactos dañinos en aguas receptoras (e.g., cambios en patrones de flujo, aumento en cargas de nutriente y eutrofización) pueden limitar el uso de manejos similares en el futuro, a menos que los efluentes sean tratados antes de que sean descargados (Boyd y Tucker, 1998). El control químico se efectúa a través del uso de algicidas, como el sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$). Los iones cúpricos (Cu^{2+}) inhiben la respiración y la fotosíntesis en las algas, lo que reduce de manera efectiva la población fitoplanctónica (Tucker y Boyd, 1978). Sin embargo, el herbicida no es selectivo y tiene pocos efectos residuales por la cual el fitoplancton regresa rápidamente a los niveles de pre-tratamiento. Los problemas con bajas concentraciones de oxígeno disuelto como consecuencia del tratamiento, también limitan su utilidad en estanques de producción de camarones. El control biológico se hace a través de la depredación por parte de organismos herbívoros, como el zooplancton o peces. Hasta el momento, la tilapia es la única especie escogida para aguas salobres. Estudios en piscinas de producción de bagre demostraron la disminución de la densidad de zooplancton después de la introducción de tilapia, aunque no hubo cambio en la biomasa fitoplanctónica (Torrans y Lowell, 1987). Otro estudio concluyó que el impacto sobre las comunidades de fitoplancton de la introducción de peces planctívoros es variable (Smith, 1985).

2.5. TÉCNICAS DE MANEJO PARA EL CONTROL DE LAS BACTERIAS EN PISCINAS CAMARONERAS:

Cuando se presentan mortalidades por la presencia de bacteria(s) patógena(s), el productor aplica compuestos antimicrobianos como antibióticos, cloro, formalina y amonio cuaternario, en el alimento o en el agua. Además, algunos productores utilizan antibióticos como medida profiláctica sin tener la seguridad que pueda llegar un brote de enfermedad. Como son compuestos antimicrobianos utilizados para excluir bacterias y parásitos, la mayoría de ellos son tóxicos y tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente (Midlen y Redding, 1998; Boyd y Massaut, 1999).

El problema más grave asociado con el uso de antibióticos, es la aparición de cepas resistentes favorecidas por dosis y tiempos de aplicación inadecuados y la poca variedad de antibióticos disponibles. Estas bacterias resistentes podrían intercambiar información genética con otras bacterias y transferir la resistencia al antibiótico empleado (Moriarty, 1998; Gatesoupe, 1999). La aparición de cepas resistentes hace más difícil el control de brotes de enfermedades bacterianas en piscinas camaroneras. También, surge una preocupación por la emergencia de patógenos humanos resistentes a antibióticos como el cloranfenicol de uso común en acuicultura y medicina humana (Midlen y Redding, 1998). Adicionalmente, la aparición de residuos de antibióticos en el camarón inició una crisis al final del 2002 disminuyendo de manera drástica la exportación del camarón hacia Europa.

Permanganato de potasio, formalina, cloro y compuestos de desinfección a base de yodo son de uso común en los laboratorios de larvicultura. Estos compuestos no son utilizados de manera regular en granjas de producción por su poca efectividad en aguas cargadas con materia orgánica. El permanganato de potasio añadido al agua rápidamente oxida la materia orgánica lo que puede afectar directamente al fitoplancton y la concentración de oxígeno disuelto (Boyd y Massaut, 1999). Existe un riesgo leve de formar trihalometanos y PCBs, ambos compuestos potencialmente carcinógenos, al utilizar cloro cuando la carga de materia orgánica esta alta (Tchobanoglous y Burton, 1991).

El uso de bacterias benéficas o probióticos, para desplazar patógenos por competencia o exclusión, presenta una alternativa para el control de enfermedades bacterianas en acuicultura. Un probiótico es una mezcla de células microbianas suministrada a un animal de tal manera que penetra en su tracto digestivo sin morir y con el propósito de mejorar su salud (Gatesoupe, 1999). Moriarty (1998) logró controlar

Vibrio spp. luminiscentes presentes en piscinas de producción de *P. monodon* en Indonesia, aplicando a intervalos de 1 a 3 días durante el cultivo entre 50 y 100 L/ha de una solución de *Bacillus* spp. ($1x10^4$ – $1x10^5$ bacterias por mL de solución). Competencia por exclusión es uno de los procesos ecológicos que puede ser manipulado para cambiar la composición bacteriana de la columna de agua, de los suelos o del tracto digestivo de un animal, introduciendo un cambio en las especies dominantes. Para lograr este objetivo se debe seleccionar la(s) bacteria(s) por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, añadirla(s) al medio a una concentración alta y bajo condiciones óptimas para su crecimiento (Moriarty, 1998). Probióticos fueron identificados en los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, pero algunos de estos géneros también tienen representantes patógenos (Gatesoupe, 1999). Se recomienda monitorear el probiótico para asegurar que no mute o se transforme en un patógeno a lo largo de su uso. Además, Moriarty (1999) recomienda el uso de bacterias Gram positivas como probiótico para evitar la transferencia entre Gram negativas del material genético responsable de la virulencia.

2.6. ROL REGULADOR DEL ZOOPLANCTON:

El zooplancton incluye a los organismos invertebrados de pequeño tamaño que habitan en los ecosistemas acuícolas y que tienen sus movimientos controlados por las corrientes de agua. El zooplancton se alimenta de fitoplancton, bacterias y materia orgánica. Según el tamaño se los clasifica en microzooplancton (<200 µm, representado por rotíferos y nauplios de copépodos) y metazooplancton (>200 µm, representado por copépodos adultos y cladóceros) (Paffenhöfer, 1998). En piscinas camaroneras dominan el género *Brachionus* spp. para los rotíferos y representantes de los grupos Calanoides y Cicloides dentro de los copépodos (Preston *et al*., 2003). Su composición está controlada por factores abióticos como salinidad, temperatura y UV, y factores bióticos como presencia y tipo de fitoplancton y bacterias. En piscinas camaroneras el zooplancton cumple con dos roles ecológicos importantes: (1) influye en la dinámica y estructura del fitoplancton y de las bacterias a través de la depredación; y (2) participa en la transferencia de carbono hacia el camarón sirviéndolo de presa (Coman *et al*., 2003).

El incremento de la productividad primaria normalmente resulta en un incremento en la abundancia de zooplancton (efecto "bottom-up"). Boyd y Tucker (1998) reportan concentraciones más altas de rotíferos y copépodos en piscinas fertilizadas. Además, el zooplancton como predador presenta un impacto de regulación sobre el fitoplancton y las bacterias provocando cambios en sus concentraciones y composiciones (efecto "top-down") (Hulot *et al*., 2001). El efecto "top-down" del zooplancton sobre los niveles tróficos más bajos es directa, por medio de la reducción de la biomasa a través de la depredación. Los ciliados y rotíferos depredan a organismos de pequeño tamaño como las bacterias y pequeños representantes unicelulares del fitoplancton, mientras que los copépodos se alimentan de fitoplancton de mayor tamaño o depredan a otros representantes del zooplancton como los rotíferos y ciliados. Sin embargo, tanto en condiciones oligotróficas como eutróficas no existe un impacto marcado del zooplancton. En los sistemas oligotróficos el zooplancton recicla a la materia orgánica, lo que incrementa de manera indirecta a la producción primaria (Elser *et al*., 1990). En sistemas eutróficos no se evidencia el efecto pastoreo del zooplancton, por la dominancia de las cianobacterias (Cottingham *et al.*, 1997). Las cianobacterias han sido reconocidas como un inadecuado alimento para la mayoría del zooplancton debido a su morfología filamentosa o colonial de gran tamaño y es difícilmente digerida (Haney, 1987; Lampert, 1987). Es también conocido que ciertas toxinas producidas por las cianobacterias reducen su depredación por el zooplancton (Paerl y Tucker, 1995).

Uno de los efectos positivos indirectos del zooplancton sobre el fitoplancton y las bacterias, es por su rol en el reciclaje de la materia orgánica con el consecuente incremento en las concentraciones de nutrientes inorgánicos (N, P y C) que estimula el crecimiento de estos organismos (Havens, 1993; Elser y Goldman, 1990; Hulot *et al*., 2001). También, el zooplancton carnívoro como los copépodos a través de la depredación de los ciliados, elimina la presión sobre el fitoplancton de menor tamaño causando el incremento de sus concentraciones (Cottingham *et al*., 1997). El zooplancton puede además a través de la excreción de materia orgánica disuelta, mejorar el crecimiento de las bacterias (Jürgens y Jeppesen, 2000; Richardot *et al*., 2001).

Se considera al zooplancton un elemento importante de la cadena trófica en los estanques camaroneros por ser fuente directa de alimento para el camarón en cultivo. El zooplancton es considerado altamente energético por su composición en ácidos grasos insaturados y proteínas, representando un atractivo alimento para los crustáceos (Caron *et al*., 2000). Estudios realizados por Preston *et al.* (2003) confirmaron que la concentración de copépodos disminuye a medida que se incrementa los días de ciclo del cultivo de *P. monodon*, sin embargo mencionan que esta disminución podría también resultar de un deterioro en la calidad de agua.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

El estudio se realizó en el set experimental #20 de la Fundación CENAIM-ESPOL (San Pedro de Manglaralto, Provincia del Guayas, Ecuador) compuesto de 24 tanques exteriores rectangulares de fibra de vidrio con capacidad de una tonelada. Cada tanque fue llenado con agua del canal reservorio de la camaronera COFIMAR (Palmar, Provincia del Guayas, Ecuador). Un sistema de aireación con una piedra difusora por tanque suministró aire desde las 1800 hasta la 0600 cada noche, con el objetivo de permitir una mezcla de la columna de agua. La investigación consistió de dos experimentos con duración de 30 días cada uno. El primer experimento se inició el 2 de marzo del 2003 y terminó el 1 de abril del 2003, mientras el segundo experimento se desarrolló entre el 9 de abril del 2003 y el 9 de mayo del 2003.

El primer experimento consistió en la aplicación de fertilizantes inorgánicos empleando urea (45% de N) y superfosfato triple (46% de P_2O_5) con un diseño experimental factorial 3x2. El primer factor fue el efecto de la fertilización con dos niveles y un control. En los tanques correspondientes, se hizo dos aplicaciones semanales de 1,0 mg N/L combinado con 0,1 mg P/L o 0,2 mg P/L, lo cual representaba una relación N:P de 10:1 y 5:1, respectivamente. El segundo factor fue la presencia o ausencia de zooplancton adulto al inicio del experimento. Para los tanques sin zooplancton, se filtró el agua con malla Nytex de 30 µm al llenarlos.

El segundo experimento consistió en la aplicación de fertilizantes orgánicos en forma de alimento balanceado (28% de proteínas) o melaza con un diseño experimental factorial 3x2 como en el primer experimento. El primer factor representó diferentes fuentes de materia orgánica en los sistemas y un control sin recibir nutrientes. En un tratamiento, se aplicó cada día 0,8 g de alimento balanceado, representando un 40% de una dosis equivalente a 20 kg/ha diarios, lo que simuló el aporte a través de alimento no consumido y heces en un sistema tradicional semi-intensivo de cultivo de *P. vannamei*. La melaza se aplicó en una sola dosis semanal de 1,0 g por tanque equivalente a una aplicación de 10 kg/ha. El segundo factor se mantuvo con presencia o ausencia de zooplancton adulto al inicio del experimento.

En ambos experimentos, cada combinación de nutrientes y concentración de zooplancton al inicio tuvo un total de cuatro réplicas. Se realizó una doble aleatorización de los factores, primero asignando aleatoriamente ocho tanques a cada nivel de nutrientes, luego asignado aleatoriamente cuatro tanques recibiendo agua filtrada y cuatro tanques recibiendo agua no filtrada en cada nivel de nutrientes. Una descripción de todos los tratamientos se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1: Descripción de los tratamientos para los dos experimentos.

Régimen de fertilización	Agua filtrada	Agua no filtrada
Experimento 1 – Fertilización Inorgánica		
Sin adición de nutrientes	Control Filtrado	Control No filtrado
10 mg N/L + 0,1 mg P/L	10 N:1 P Filtrado	10 N:1 P No filtrado
10 mg N/l + 0,2 mg P/L	5 N:1 P Filtrado	5 N:1 P No filtrado
Experimento 2 – Fertilización Orgánica		
Sin adición de nutrientes	Control Filtrado	Control No filtrado
Alimento balaceado	Alimento Filtrado	Alimento No filtrado
Melaza	Melaza Filtrado	Melaza No filtrado

En el primer experimento el agua tuvo una salinidad de 34,9 g/L, una dureza total entre 5.740 y 13.510 mg $CaCO_3$/L y una alcalinidad total entre 101 y 124 mg $CaCO_3$/L. Los valores promedio de pH, temperatura del agua y oxígeno disuelto en la mañana (0700) fueron 8,3, 26,6°C y 6,15 mg/L, respectivamente. La intensidad de luz entre las

1000 y 1100 horas, fue superior a los 2.500 lux. Para el segundo experimento, la salinidad y temperatura del agua bajaron a 33,0 g/L y 25,8°C respectivamente y la concentración promedio del oxígeno disuelto en la mañana fue de 6,60 mg/L. Los demás parámetros se mantuvieron iguales que en el primer experimento. En ambos experimentos se recolectaron muestras de agua para cada tanque en los días cero, 10, 20 y 30 para análisis del plancton, microbiológicos y de sólidos.

3.2. DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PLANCTON:

Se tomó 1 L en la parte central del tanque y se filtró de inmediato entre 200 y 500 mL a través de un filtro Whatman GF/C (apertura de poro de 1,2 µm). Luego la concentración de clorofila *a* fue medida por colorimetría después de una extracción con una solución de acetona:metanol (5:1) a temperatura de 65°C y corrección por feofitina con adición de HCl (Pechar, 1987). Adicionalmente, 50 mL del agua no filtrada se preservó con 600 µL de Lugol para determinación y conteo de fitoplancton con la cámara de Sedgewick-Rafter y la ayuda de un microscopio a una magnificación de 200X (APHA *et al*., 1998). Se clasificó el fitoplancton hasta el nivel de género para cianobacterias, mientras las diatomeas fueron agrupadas en Pennales o Centrales y las algas verdes según tamaño (Cocke, 1967; Jiménez, 1983). La cuantificación fue expresada como número de organismos por mililitro (org/mL).

A través de una malla de 40 µm, se concentraron 8 L de agua en un volumen de 25 mL y se preservaron con 25 mL de una solución sucrosa-formalina al 12% para determinación y conteo de zooplancton con la cámara de Sedgewick-Rafter y la ayuda de un microscopio a una magnificación de 100X (APHA *et al*., 1998). Se clasificó el zooplancton hasta el nivel de género para los rotíferos y tintínnidos, mientras que para los copépodos fueron agrupados en adultos o nauplios (Yamaji, 1973; Jiménez, 1983). La cuantificación fue expresada como número de organismos por litro (org/L) después de una corrección por el factor de concentración en la preservación de la muestra inicial.

3.3. DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS:

Se colectaron 250 mL de agua en frascos estériles para cuantificación de bacterias totales (agar marino) y *Vibrio* spp. (agar TCBS). Para la cuantificación de bacterias totales se sembraron dos diluciones (10^1 y 10^2), mientras que para *Vibrio* spp. se sembró la muestra inicial solamente. Las siembras fueron en placas desechables por duplicado. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas en una cámara incubadora. La cuantificación bacteriana se expresó en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro de agua muestreada (UFC/mL).

Una vez terminada la cuantificación, las bacterias más abundantes según su morfología (tamaño y color), fueron seleccionadas considerando una sola dilución en agar marino y una placa en agar TCBS por tanque (en total 8 placas por tratamiento). Estas bacterias fueron aisladas en agar TSA e incubadas a 28°C. Luego de 24 horas cada bacteria recogida fue preservada en una solución de caldo tríptico de soya al 2% NaCl (W/V) y 20% de glicerol (V/V) en tubos Eppendorf de 1,5 mL y congeladas a –80°C hasta su identificación bioquímica.

De las cepas seleccionadas para la identificación se procedió a realizar una resiembra en agar TSA por duplicado y entre 8 y 12 horas se efectuaron las correspondientes 14 pruebas: (1) tipo Gram.; (2) tipo de morfología celular; (3) motilidad; (4) catalasa; (5) oxidasa; (6) caldo nutritivo, (7) metabolismo oxidativo y fermentativo; (8) producción de indol; (9) reacción de Voges-Proskauer; (10) citrato de Simmons; (11) ornitina descarboxilasa; (12) arginina dihidrolasa; (13) lisina hidrocloridasa y (14) fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, manosa, manitol, sucrosa, glucoronato y galactosa) (Solís, 1996). Se realizaron las lecturas cada 24 horas durante tres días consecutivos. La interpretación de las pruebas bioquímicas se realizó de acuerdo al manual de Bergey (Holt *et al*., 2000). Posteriormente, se identificó cada bacteria hasta el nivel de género en base a los datos morfológicos y metabólicos. Con el propósito de obtener una aproximación de especies para las bacterias clasificadas como *Vibrio*, se realizó un análisis de similitud (análisis Cluster) comparando los datos fenotípicos de *Vibrio* spp. descrito por Solís (1996).

3.4. ANÁLISIS DE LOS SÓLIDOS:

Se tomó 400 mL en la parte central del tanque para análisis por gravimetría de los diferentes componentes de la materia orgánica e inorgánica (APHA *et al*., 1998). Los sólidos totales (TS) fueron medidos sobre la muestra original después de 24 horas de secado a 104°C. La muestra fue después llevada a 500°C por 30 minutos para estimar el total de la materia inorgánica (TIM). Se estimó la materia orgánica total (TOM) por diferencia entre estas dos variables (TOM = TS – TIM). De la misma manera, el total de sólidos suspendidos (TSS) fue medido para una muestra de 100 mL de agua recogida sobre filtros Whatman GF/C y mantenida durante 24 horas a 104°C. Después de 30 minutos a 550°C se pesó el filtro para evaluación de la materia inorgánica particulada (PIM). La concentración de la materia orgánica particulada (POM) fue estimada por diferencia entre las dos medidas anteriores (POM = TSS – PIM). Finalmente, se estimó la fracción disuelta de la materia por diferencia entre las medidas representando el total y las medidas de la materia particulada, de la siguiente manera:

Total de sólidos disueltos (TDS) = sólidos totales (TS) – total sólidos suspendidos (TSS)

Materia inorgánica disuelta (DIM) = total de materia inorgánica (TIM) – materia inorgánica particulada (PIM)

Materia orgánica disuelta (DOM) = total de materia orgánica (TOM) – materia orgánica particulada (POM)

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el análisis de varianza (ANOVA, medidas repetidas, modelo Split Plot) se transformaron los datos de clorofila *a* y conteos de fitoplancton, zooplancton y bacterias a logaritmo en base 10 ($\log_{10}$) para cumplir con los pre-requisitos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene). Los datos de materia orgánica no fueron transformados. Para cada experimento, se estableció si existían diferencias significativas entre los seis tratamientos utilizando la prueba de Scheffé para comparación múltiple de las medias (nivel de confianza del 95%). Además, las diferencias en los conteos iniciales de zooplancton para los tratamientos que recibieron agua filtrada comparando con los tratamientos sin agua filtrada, fueron analizadas usando ANOVA de una vía.

Con el objetivo de explorar los datos y disminuir el número de variables en los análisis posteriores, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para cada experimento. Los datos fueron previamente normalizados (variable con media cero y varianza unitaria) para cumplir con los requisitos de la prueba ACP (Pla, 1986). Se obtuvo los componentes o factores que expresaron el mayor porcentaje de variación de los datos aplicando el criterio de Kaiser (selección de los componentes principales significativos si *eigenvalue* > 1). Para la interpretación de las variables originales con cada componente, solo los coeficientes mayores a 0,5 fueron considerados (Subas, 1994).

Finalmente, en base a los resultados de ACP se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando las variables que presentaron una alta correlación con los componentes principales para poder predecir el comportamiento del fitoplancton, de las bacterias y de la materia orgánica. Se comprobó normalidad de los residuales.

Para los análisis de ACP y regresión múltiple, el factor fertilización fue transformado en variables continuas en base a las cantidades de N, P o C aplicadas durante el experimento. Las cantidades de nitrógeno y fósforo adicionadas con los fertilizantes inorgánicos fueron calculadas en base a las dosis utilizadas y expresadas en mg de N o P aplicados por tanque. Se estimó la cantidad de nitrógeno aplicada a través del alimento balanceado en base a su porcentaje de proteínas (28%) y la proporción de nitrógeno en proteínas (16%). Se estimó la cantidad de carbono orgánico aplicado a través de la melaza con una concentración promedio de 39%.

Se utilizó los programas estadísticos Statview 4.5 (1992-1995, Abacus Concepts Inc, California, EE.UU), SuperAnova (1989, Abacus Concepts Inc., California, EE.UU.) y Statistica 4.1 (1994-2000, StatSoft Technical Support, Oklahoma, EE.UU.). Para facilidad en la interpretación, todos los datos son presentados sin transformación como media ± desviación estándar.

4. RESULTADOS

4.1. FERTILIZACIÓN INORGÁNICA:

4.1.1. Comportamiento de las variables (ANOVA medidas repetidas):

En general, la concentración de clorofila *a* incrementó con la adición de nutrientes inorgánicos y alcanzó valores promedios de 44 µg/L (tratamientos 10N:1P) y de 40 µg/L (tratamientos 5N:1P); siendo diferentes a los controles con promedio de 14 µg/L ($p < 0,01$ en ambos casos). Se obtuvo un comportamiento similar en el conteo total de fitoplancton, con valores promedios de $340x10^3$ org/mL (10N:1P) y $358x10^3$ org/mL (5N:1P), significativamente diferentes a los controles ($93x10^3$ org/mL; $p < 0,01$ en ambos casos). Se notó una interacción entre los niveles de nutrientes y la filtración (presencia o ausencia de zooplancton adulto al inicio), llegando a valores más altos de clorofila *a* en los tratamientos filtrado 10N:1P (45 µg/L) y no filtrado 5N:1P (55 µg/L) y conteos de fitoplancton más altos en los tratamientos "Filtrado 10N:1P" y "No filtrado 5N:1P" (Tabla 2). Este incremento fue más marcado en el último muestreo (día 30) donde se alcanzaron valores mayores de clorofila *a* en todos los tratamientos ($p = 0,03$; Fig. 2a).

El fitoplancton fue dominado por la presencia de cianobacterias representando entre 56 y 95% del conteo total. Los conteos más altos de cianobacterias fueron asociados con los tratamientos que recibieron nutrientes ("Filtrado 10N:1P" y "No filtrado 5N:1P"; Tabla 2) y durante los muestreos de los días 10 y 30 ($p = 0,03$; Fig. 2b). Las cianobacterias fueron dominadas por Chroococcales de los géneros *Aphanotece*, *Gleocapsa* y *Synechocystis*, éste último representando de 46 a 84% del conteo total de las cianobacterias. Se observó también presencia de cianobacterias Hormogonales con los géneros *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Spirulina*. Sin embargo, estos géneros nunca superaron

Tabla 2: Promedio de las variables de calidad de agua durante el periodo de estudio (± desviación estándar) en cada tratamiento para el experimento de fertilización inorgánica. Datos en la misma fila con diferentes letras de superíndice son significativamente diferentes (p < 0,05; ANOVA medidas repetidas).

VARIABLE	CONTROL		10N:1P		5N:1P	
	Filtrado	No filtrado	Filtrado	No filtrado	Filtrado	No filtrado
Clorofila *a* (µg/L)	14 ± 7[a]	14 ± 5[a]	45 ± 36[c]	42 ± 44[c]	25 ± 28[ab]	55 ± 54[c]
Fitoplancton (10^3 org/mL)	93 ± 46[a]	92 ± 44[a]	401 ± 342[c]	278 ± 226[b]	261 ± 333[b]	454 ± 514[c]
Cianobacterias	79 ± 50[a]	74 ± 30[a]	336 ± 343[c]	209 ± 187[b]	219 ± 330[ab]	396 ± ∫509[c]
Chroococcales	66± 106[a]	64 ± 28[a]	285 ± 318[a]	181 ± 157[a]	198 ± 324[a]	335 ± 492[a]
Hormogonales	13 ± 11[a]	10 ± 7[a]	51 ± 56[a]	28 ± 38[a]	21 ± 22[a]	61 ± 83[a]
Diatomeas	7 ± 5[a]	7 ± 7[a]	50 ± 41[a]	51 ± 41[a]	33 ± 37[a]	46 ± 30[a]
Pennales	5 ± 4[a]	6 ± 6[a]	41 ± 39[a]	46 ± 61[a]	27 ± 27[a]	44 ± 31[a]
Centrales	2 ± 3[a]	1 ± 2[a]	9 ± 2[c]	5 ± 10[b]	6 ± 7[b]	2 ± 2[a]
Algas verdes	7 ± 6[a]	11 ± 22[a]	15 ± 16[a]	18 ± 21[a]	9 ± 10[a]	12 ± 15[a]
< 10 µm	6 ± 6[a]	10 ± 20[a]	14 ± 18[a]	16 ± 19[a]	8 ± 10[a]	11 ± 13[a]
> 10 µm	1 ± 1[a]	1 ± 1[a]	1 ± 2[a]	2 ± 4[a]	1 ± 1[a]	1 ± 3[a]
Zooplancton (org/L)	273 ± 193[a]	352 ± 353[a]	588 ± 689[a]	516 ± 331[a]	442 ± 510[a]	461 ± 369[a]
Copépodos	193 ± 203[a]	217 ± 286[a]	504 ± 685[a]	389 ± 276[a]	297 ± 487[a]	323 ± 341[a]
Nauplios	97 ± 108[a]	147 ± 262[a]	220 ± 450[a]	222 ± 242[a]	84 ± 241[a]	191 ± 295[a]
Adultos	96 ± 125[a]	69 ± 59[a]	286 ± 497[a]	167 ± 233[a]	213 ± 441[a]	130 ± 157[a]
Rotíferos	63 ± 260[a]	115 ± 90[a]	53 ± 83[a]	89 ± 137[a]	127 ± 233[a]	72 ± 87[a]
Tintínnidos	18 ± 22[a]	21 ± 33[a]	30 ± 30[a]	40 ± 61[a]	23 ± 32[a]	65 ± 96[a]
Bacterias totales (10^3 UFC/mL)	44 ± 8[a]	21 ± 19[a]	104 ± 126[a]	115 ± 193[a]	85 ± 113[a]	113 ± 167[a]
Vibrio spp (10^2 UFC/mL)	10 ± 1[a]	9 ± 8[a]	8 ± 8[a]	10 ± 9[a]	1 ± 1[a]	2 0± 20[a]
TS (mg/L)	39.885 ± 2.420[a]	40.578 ± 3.920[a]	39.884 ± 3.146[a]	39.823 ± 3.308[a]	37.608 ± 2.287[a]	38.482 ± 2.683[a]
TIM	32.522 ± 2.305[a]	32.322 ± 3.135[a]	32.693 ± 3.093[a]	32.833 ± 2.899[a]	30.595 ± 2.257[a]	31.180 ± 1.810[a]
TOM	7.289 ± 1.053[a]	7.562 ± 1.385[a]	7.191 ± 1.166[a]	6.990 ± 1.940[a]	7.085 ± 1.390[a]	7.302 ± 1.488[a]
TDS (mg/L)	39.671 ± 3.527[a]	39.746 ± 3.756[a]	39.748 ± 3.135[a]	39.690 ± 3.290[a]	37.488 ± 2.275[a]	38.354 ± 3.197[a]
DIM	32.419 ± 2.442[a]	31.678 ± 1.798[a]	32.459 ± 3.084[a]	32.740 ± 2.886[a]	30.444 ± 2.295[a]	31.516 ± 2.687[a]
DOM	7.252 ± 1.055[a]	8.068 ± 2.734[a]	7.144 ± 1.170[a]	6.951 ± 1.940[a]	7.050 ± 1.398[a]	7.267 ± 1.490[a]
TSS (mg/L)	124 ± 28[a]	127 ± 29[a]	136 ± 31[a]	134 ± 34[a]	121 ± 27[a]	128 ± 27[a]
PIM	87 ± 25[a]	88 ± 23[a]	88 ± 22[a]	92 ± 24[a]	78 ± 17[a]	87 ± 24[a]
POM	37 ± 23[a]	39 ± 16[a]	48 ± 13[a]	41 ± 12[a]	43 ± 16[a]	41 ± 23[a]

el 30% del conteo de las cianobacterias y no presentaron diferencias con ninguno de los factores (nivel de nutrientes, filtración o tiempo).

Las diatomeas fueron el segundo grupo más representativo del fitoplancton y respondieron favorablemente a la adición de nutrientes ($p < 0,01$; Tabla 2). Sin embargo, sus concentraciones disminuyeron progresivamente hasta el último muestreo ($p = 0,02$; Fig. 2c). Los conteos de diatomeas Pennales fueron más altos para los tratamientos que recibieron nutrientes ($p < 0,01$), mientras que para las diatomeas Centrales fueron para el tratamiento "Filtrado 10N:1P" ($p = 0,04$; Tabla 2). La presencia de algas verdes no fue afectada por la inclusión de nutrientes inorgánicos, pero su concentración varió con el tiempo ($p = 0,03$). Se presentaron los valores más bajos para organismos con tamaño < 10 µm en el último día de muestreo (día 30; $71x10^2$ org/mL; $p < 0,01$); mientras las > 10 µm (principalmente del género *Cosmarium*) incrementaron en el día 20 ($48x10^2$ org/mL; $p = 0,01$) para después regresar el último día de muestreo a sus valores iniciales ($3x10^2$ – $12x10^2$ org/mL).

La filtración del agua al inicio del experimento fue efectiva en remover al zooplancton (59% de remoción). Se encontraron conteos más bajos en los tanques con agua filtrada comparados con los otros tanques para todos los grupos de zooplancton en el día 0 (copépodos, $p < 0,01$; copépodos adultos, $p < 0,01$; nauplios de copépodos, $p < 0,01$; rotíferos, $p = 0,02$; tintínnidos, $p = 0,01$). La tendencia fue hacia un incremento en los conteos totales de zooplancton con la inclusión de nutrientes (552 org/L para 10N:1P; 452 org/L para 5N:1P y 313 org/L para los controles; $p = 0,08$). Para ninguno de los grupos de zooplancton se encontraron diferencias significativas con la interacción entre los niveles de nutrientes y la filtración del agua (Tabla 2). En general, los valores más altos de conteo del zooplancton se encontraron al inicio del experimento, disminuyendo de manera significativa en todos los tratamientos en el día 30 (Fig. 2d; $p < 0,01$).

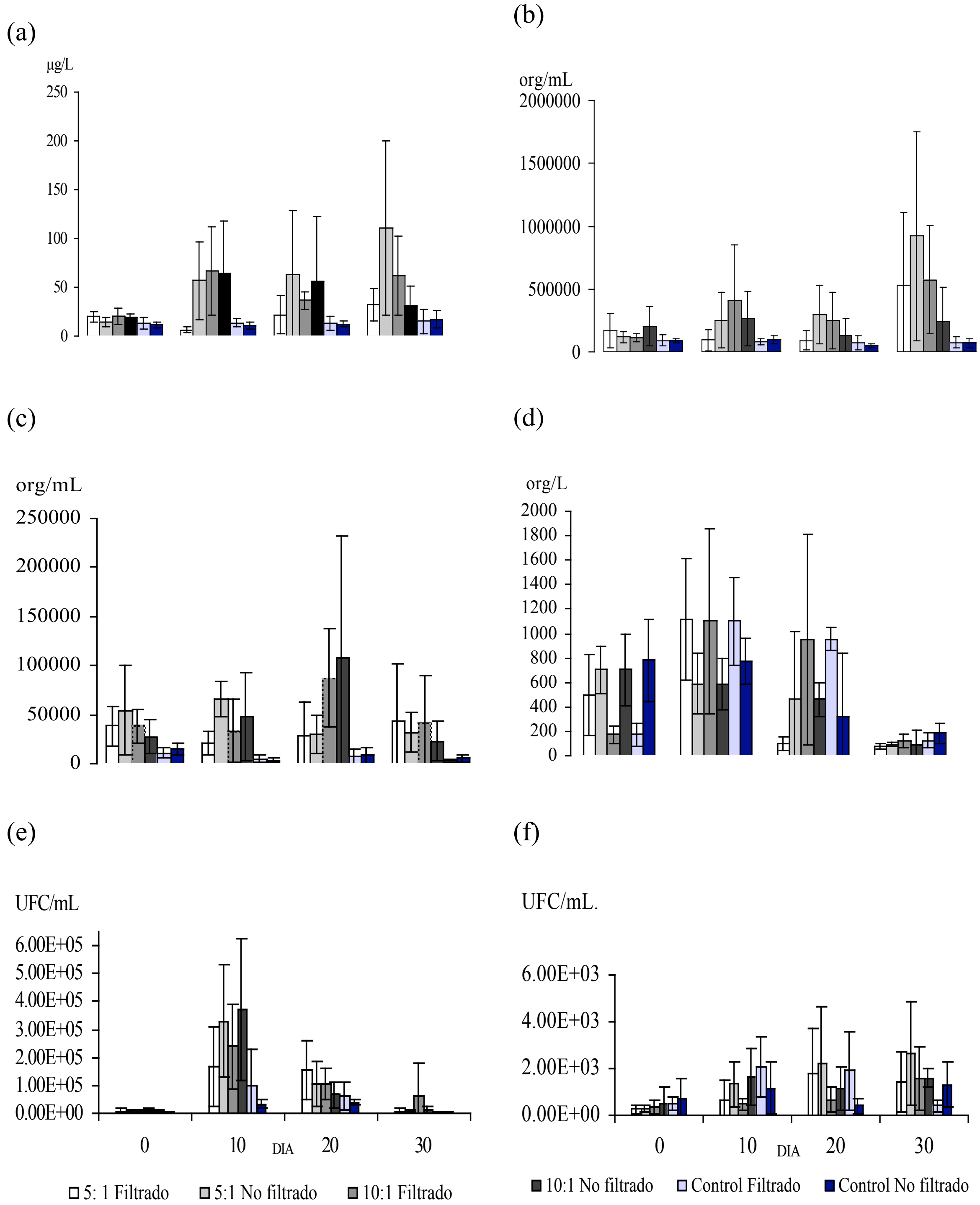

Figura 2: Evolución en el tiempo para cada tratamiento del experimento de fertilización inorgánica de las siguientes variables de calidad de agua: (a) clorofila *a*; (b) conteos de cianobacterias; (c) conteos de diatomeas; (d) conteos totales de zooplancton; (d) bacterias totales; y (e) *Vibrio* spp.

Los copépodos representaron entre 11 y 92% del conteo total del zooplancton. Los conteos de nauplios fueron más altos para los días 10 (307 org/L) y 20 (167 org/L) y llegaron a valores significativamente menores en el último día de muestreo (36 org/L; $p < 0,01$). Los copépodos adultos presentaron los valores más altos en los días 10 (489 org/mL) y 20 (73 org/L) y el valor más bajo al final del experimento (día 30, 30 org/L; $p < 0,01$). Se notó una interacción entre niveles de nutrientes y el tiempo, dando el valor más alto para los conteos de copépodos adultos en los controles y tratamientos 5N:1P en el último día de muestreo ($p = 0,03$). No hubo efecto de la interacción de estos dos factores sobre el conteo de nauplios de copépodos.

Los rotíferos de los géneros *Brachionus* y *Lecane* representaron entre 2 y 63% del conteo total del zooplancton. Su evolución en el tiempo presentó una disminución de la población los días 10 (de 206 a 35 org/L) y 20 (26 org/L), manteniendo su concentración hasta el final del experimento (26 org/L; $p < 0,01$). El último grupo de zooplancton fue representado por los tintínnidos del género *Tintinnopsis*. Sus concentraciones bajaron de manera significativa ($p < 0,01$) en los días 10 (10 org/L) y 20 (6 org/L).

Los conteos totales de bacterias oscilaron entre 33×10^2 y 37×10^4 UFC/mL e incrementaron con la adición de nutrientes. Los promedios para los tratamientos 10N:1P (110×10^3 UFC/mL) y 5N:1P (99×10^3 UFC/mL) fueron significativamente más altos que para los controles con 33×10^3 UFC/mL ($p = 0,01$ y $p = 0,04$, respectivamente). Como se observa en la Fig. 2e, las concentraciones totales de bacterias fueron más altas en los días 10 (207×10^3 UFC/mL) y 20 (90×10^3 UFC/mL), antes que en promedio regresan a los valores iniciales (8×10^3 – 17×10^3 UFC/mL; $p < 0,01$). No se encontró diferencia en promedio entre los tanques recibiendo agua filtrada y no filtrada ($p = 0,94$) o interacción entre los niveles de nutrientes y la filtración (Tabla 2). Los conteos de *Vibrio* spp. representaron en promedio entre 2 y 38% del conteo total de las bacterias. Solo el factor tiempo mostró un efecto sobre la concentración de *Vibrio* spp., obteniendo valores significativamente más altos el último día de muestreo ($14x10^2$ UFC/mL) en comparación con el día 0 ($4x10^2$ UFC/mL; $p < 0,01$; Fig. 2f).

Se aislaron 62 cepas bacterianas, las más representativas según color y tamaño de la colonia y de las cuales nueve resultaron ser Gram positivas. Estas bacterias Gram positivas se encontraron solamente al día 10 y fueron presentes en los siguientes tratamientos: 10N:1P No Filtrado (representando 56% de las bacterias encontradas en agar marino), 10N:1P Filtrado (22%), 5N:1P No Filtrado (11%) y Control No Filtrado (11%). Las 53 otras cepas fueron Gram negativas de los géneros *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* (Tablas 3 y 4). Las siguientes 13 especies de *Vibrio* fueron identificadas: *V. aestuarianus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carcachariae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. nereis*, *V. orientalis*, *V. proteus*, *V. splendidus*, *V. tubiashii* y *V. vulnificus*. *V. anguillarum*, *V. damsela* y *V. splendidus* dominaron en los días 0 y 10, mientras *V. splendidus, V. fluvialis* y *V. proteus* dominaron en los días 20 y 30. *V. harveyi* dominó en una sola ocasión (día 30 en TCBS) donde representó 67% de las bacterias del tratamiento Control Filtrado. Los géneros *Plesiomonas* y *Photobacterium* fueron aislados desde agar marino el día 30 en los tratamientos 5N:1P No Filtrado y 10N:1P Filtrado, respectivamente. *Plesiomonas* spp. logró representar hasta 79% de las bacterias encontradas este día para el tratamiento 10N:1P Filtrado (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentajes de las bacterias más representativas seleccionadas desde agar marino (según color y forma de la colonia) en cada tratamiento y para cada día de muestreo durante el experimento de fertilización inorgánica.

	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
FILTRADO				
Control	N.D.	*V. damsela* (25%)	N.C.	*V. proteus* (15%)
10N:1P	N.D.	N.C.	*V. splendidus* (37%)	*Plesiomonas* (79%)
5N:1P	N.D.	*V. anguillarum* (14%) *V. damsela* (17%)	*V. proteus* (27%)	*V. fluvialis* (58%)
NO FILTRADO				
Control	N.D.	*V. campbellii* (24%)	*V. aestuarianus* (34%)	*V. fluvialis* (23%)
10N:1P	*V. splendidus* (17%) *V. tubiashii* 16%	N.C.	*V. fluvialis* (73%)	*V. proteus* (36%)
5N:1P	N.D.	*V. damsela* (9%)	*V. splendidus* (35%)	*V. fluvialis* (22%) *Photobacterium* (25%)

N.C. = No crecimiento después de la resiembra en agar TSA para identificación bioquímica; N.D. = No dominante

Tabla 4: Porcentajes de las bacterias más representativas seleccionadas desde agar TCBS (según color y forma de la colonia) en cada tratamiento y para cada día de muestreo durante el experimento de fertilización inorgánica.

	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
FILTRADO				
Control	*V. vulnificus* (6%)	*V. damsela* (30%)	*V. aestuarianus* (21%) *V. splendidus* (37%)	*V. harveyi* (67%)
10N:1P	N.C.	*V. anguillarum* (32%) *V. damsela* (68%)	*V. anguillarum* (24%)	*V. fluvialis* (54%) *V. proteus* (12%)
5N:1P	*V. orientalis* (23%) *V. nereis* (18%)	*V. aestuarianus* (16%) *V. anguillarum* (17%)	*V. splendidus* (61%)	*V. anguillarum* (39%) *V. fluvialis* (19%)
NO FILTRADO				
Control	*V. tubiashii* (41%)	*V. damsela* (27%)	*V. anguillarum* (38%)	*V. fluvialis* (34%) *V. proteus* (27%)
10N:1P	*V. carchariae* (23%) *V. tubiashii* (3%)	*V. damsela* (42%)	*V. splendidus* (31%)	*V. fluvialis* (25%) *V. proteus* (13%)
5N:1P	N.C.	*V. anguillarum* (56%)	*V. carchariae* (14%) *V. splendidus* (18%) *V. vulnificus* (47%)	*V. fluvialis* (41%)

N.C. = no crecimiento después de la resiembra en agar TSA para identificación bioquímica.

Los resultados promedio de los análisis de sólidos para cada tratamiento se presentan en la Tabla 2, mientras las evoluciones en el tiempo se encuentran el la Fig. 3. Los sólidos totales (TS) oscilaron entre 32.370 y 48.735 mg/L, con valores más altos en los controles (40.231 mg/L) que para los tratamientos 10N:1P (39.854 mg/L; $p = 0,04$) y 5N:1P (38.045 mg/L; $p = 0,04$). También se observó un incremento en TS con el tiempo con valores más bajos al día 0 comparado con los días 10, 20 y 30 ($p < 0,01$). Los sólidos totales disueltos (TDS) representaron el 99% de los TS, fueron principalmente en forma inorgánica (DIM, entre 65 y 99% de los TDS) e incrementaron con el tiempo llegando a valores más altos en el día 30 ($p < 0,01$ para TDS y $p < 0,01$ para DIM; Fig. 3a y 3b). La porción particulada de los sólidos (TSS, PIM y POM) nunca contribuyó por más de 1% de los TS, la cual tuvo un incremento los días 10 y 30 ($p < 0,01$) para después regresar a valores similares al inicio del experimento (Fig. 3d, 3e y 3f). Las concentraciones de materia inorgánica (TIM, DIM y PIM) fueron más altas en los controles y tratamientos 10N:1P que para los tratamientos 5N:1P ($p < 0,01$ para TIM y DIM y $p = 0,03$ para PIM). La porción orgánica (TOM, DOM y POM) estuvo influenciada por el tiempo ($p < 0,01$) con los valores más altos en los días 10 y 20 y más bajos en los días 0 y 30 para el TOM y DOM, mientras que para POM los valores más altos fueron los días 0 y 30, teniendo el valor más bajo el día 20 (Fig. 3c y 3f).

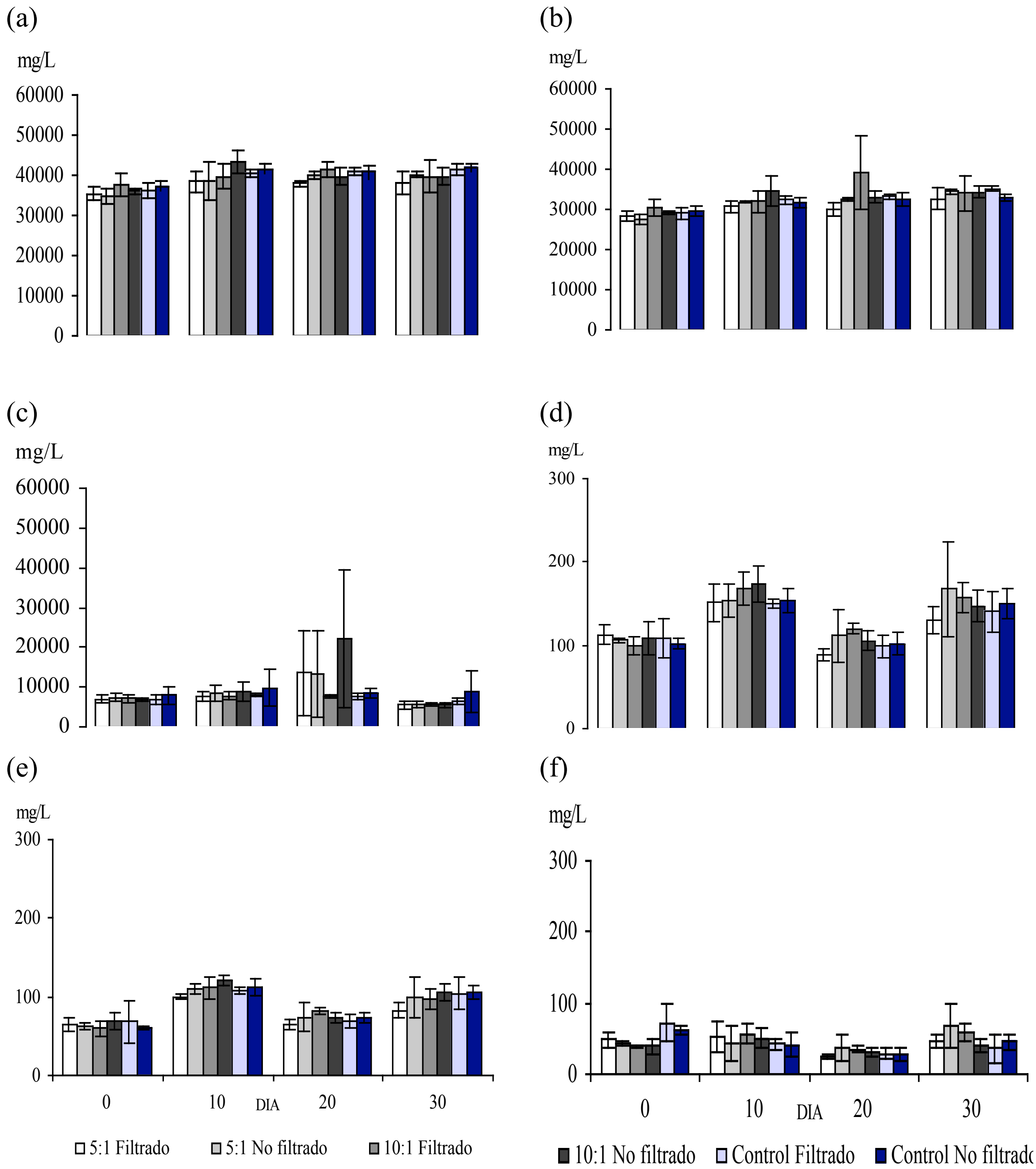

Figura 3: Evolución en el tiempo para cada tratamiento del experimento de fertilización inorgánica de las siguientes variables de calidad de agua expresadas en mg/L: (a) Total de sólidos disueltos (TDS); (b) Materia inorgánica disuelta (DIM); (c) Materia orgánica disuelta (DOM); (d) Total de sólidos suspendidos (TSS); (e) Materia inorgánica particulada (PIM); y (f) Materia orgánica particulada (POM).

4.1.2. Análisis de componente principal:

Todas las variables evaluadas en el experimento de fertilización inorgánica fueron sometidas a un análisis de componentes principales, de las cuales se destacaron cinco componentes que explicaron el 75% de la variación total de los datos (Tabla 5). La Tabla 6 da los coeficientes de correlación entre cada componente principal y las variables de calidad de agua medidas. El primer componente tiene una relación positiva con los sólidos inorgánicos o salinidad (TS, TIM, TDS y DIM) y en menor proporción con PIM y el tiempo. El segundo componente está asociado con la materia orgánica (TOM y DOM), las bacterias y, en menor grado, con el zooplancton. El tercer componente está negativamente relacionado con el fitoplancton (POM, Fitoplancton, TSS y clorofila *a*) y en menor grado con el PIM. El cuarto componente tiene una relación positiva con los nutrientes (fósforo y nitrógeno) y en menor grado con el tiempo y concentraciones de *Vibrio* spp. El último componente está relacionado con la filtración del agua.

Tabla 5: Eingenvalue y varianza explicada con sus respectivos porcentajes de los componentes principales para el experimento de fertilización inorgánica.

Factor	Eigenvalue	Porcentaje explicado	Porcentaje acumulado
1	5,2265	29,0	29,0
2	3,0775	17,1	46,1
3	2,3631	13,1	59,2
4	1,6673	9,3	68,5
5	1,1616	6,4	74,9

Tabla 6: Coeficiente de correlación entre las variables originales y los componentes principales (CP). Los coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Filtración	0,06	0,04	-0,14	0,03	**0,56**
Tiempo (día)	**0,59**	-0,37	0,01	**0,55**	-0,09
Nitrógeno (mg aplicado/tanque)	0,15	-0,06	-0,18	**0,88**	-0,12
Fósforo (mg aplicado/tanque)	0,03	-0,06	-0,14	**0,92**	-0,05
Clorofila *a* (µg/L)	0,04	0,00	**-0,71**	0,45	0,24
Fitoplancton (org/mL)	-0,03	-0,10	**-0,73**	0,40	0,18
Zooplancton (org/L)	-0,15	**0,56**	-0,17	-0,13	-0,15
Bacterias totales (10^3 UFC/mL)	0,08	**0,70**	-0,11	0,29	-0,27
Vibrio spp. (10^2 UFC/mL)	0,23	-0,02	0,09	**0,53**	0,20
TS (mg/L)	**0,89**	0,29	0,02	0,04	0,18
TIM (mg/L)	**0,89**	-0,10	-0,09	0,25	-0,09
TOM (mg/L)	0,02	**0,80**	0,24	-0,15	0,30
TDS (mg/L)	**0,82**	-0,04	0,07	-0,05	0,36
DIM (mg/L)	**0,90**	-0,10	-0,08	0,24	-0,08
DOM (mg/L)	0,11	**0,74**	0,20	-0,20	0,39
TSS (mg/L)	0,43	0,19	**-0,70**	-0,01	-0,34
PIM (mg/L)	**0,57**	0,26	**-0,55**	0,04	-0,30
POM (mg/L)	-0,10	-0,12	**-0,82**	-0,13	0,09

4.1.3. Análisis de regresión múltiple:

En base a los resultados de ACP se seleccionaron las siguientes variables para el análisis de regresión múltiple: tiempo (día), nitrógeno aplicado (mg N), fósforo aplicado (mg P), concentración de clorofila *a* (con transformación logarítmica en base 10), conteo total de zooplancton (con transformación logarítmica en base 10), concentración total de bacterias (con transformación logarítmica en base 10), DIM, DOM, PIM y POM. Se relacionaron estas variables de calidad de agua con la biomasa de fitoplancton, conteos de bacterias totales y *Vibrio* spp. y las concentraciones de TOM, POM y DOM. Las regresiones se presentan en la Tabla 7.

Para todas las variables, las predicciones obtenidas a través de los modelos de regresión múltiple fueron altamente significativas, sin embargo explicaron solamente entre 25 y 69% de la variabilidad en los datos (Tabla 7). La regresión obtenida para el fitoplancton tuvo una relación positiva con el aporte de nutrientes (N y P), la concentración total de bacterias, los conteos de zooplancton, la POM y la DIM; mientras que tuvo una relación inversa con el tiempo, PIM y DOM. Las bacterias totales fueron asociadas positivamente con la concentración de clorofila *a*, conteo de zooplancton, los nutrientes (P y en menor grado N) y la POM, mientras tienen una relación inversa con el tiempo. *Vibrio* spp. presentaron una relación positiva con las concentraciones de P, clorofila *a*, bacterias totales y el tiempo; mientras que para las concentraciones de zooplancton, N y POM la relación fue negativa. La regresión obtenida para el total de materia orgánica tuvo el coeficiente de determinación más alto e indica una relación positiva con las bacterias, el P y el zooplancton y una relación inversa con la clorofila *a*, el N y el tiempo. El modelo para la DOM es muy parecido, sin embargo se logró explicar solamente el 28% de la variabilidad en estos datos. La regresión obtenida para la POM cambia y esta variable está positivamente relacionada con la clorofila *a* y los nutrientes e inversamente relacionada con las bacterias totales, el zooplancton y el tiempo.

Tabla 7: Regresiones múltiples obtenidas por cada variable durante el experimento de fertilización inorgánica y sus respectivos coeficientes de determinación.

Regresión	p	R^2
$y_{(\text{Clorofila } a)}$ = – 0,37 + 0,22 (P) + 0,117 (Bacterias) + 0,043 (N) + 0,032 (Zooplancton) + 0,01 (POM) – 0,002 (Tiempo) – 0,0004 (PIM) – 0,00004 (DIM) + 0,00003 (DOM)	< 0,01	44%
$y_{(\text{Bacterias})}$ = 2,1 + 0,46 (Clorofila *a*) + 0,24 (Zooplancton) – 0,19 (Tiempo) + 0,19 (P) + 0,18 (POM) + 0,12 (N) + 0,009 (PIM) + 0,001 (DIM) + 0,001 (DOM)	< 0,01	40%
$y_{(\mathit{Vibrio}\ \text{spp.})}$ = 1,08 + 0,28 (P) + 0,27 (Clorofila *a*) – 0,19 (Zooplancton) + 0,06 (Bacterias) – 0,01 (N) + 0,004 (Tiempo) – 0,003 (POM) + 0,0006 (PIM) + 0,00004 (DIM) + 0,00003 (DOM)	< 0,01	25%
$y_{(\text{TOM})}$= 1615 + 380 (Bacterias) – 285 (Clorofila *a*) + 206 (P) + 83 (Zooplancton) – 74 (N) – 10,8 (Tiempo) – 1,2 (PIM) + 0,55 (DOM) + 0,13 (DIM) – 0,04 (POM)	< 0,01	69%
$y_{(\text{DOM})}$= 3087 + 1443 (P) – 963 (Clorofila *a*) + 688 (Bacterias) + 547 (Zooplancton) – 346 (N) – 28,4 (Tiempo) + 9,1 (PIM) – 3,2 (POM) + 0,035 (DIM)	< 0,01	28%
$y_{(\text{POM})}$ = 65,1 + 19 (Clorofila *a*) – 9,17 (Bacterias) + 5 (P) – 2,3 (Zooplancton) + 0,78 (N) – 0,6 (Tiempo) + 0,31 (PIM) – 0,0026 (DOM) – 0,0005 (DIM)	< 0,01	44%

4.2. FERTILIZACIÓN ORGÁNICA:

4.2.1. Comportamiento de las variables (ANOVA medidas repetidas):

La concentración de clorofila *a* fue más alta en los tratamientos "No filtrado" (21 µg/L contra 17 µg/L; $p = 0,03$); sin embargo los conteos totales de fitoplancton no presentaron diferencias ($166x10^3$ org/mL contra $192x10^3$ org/mL; $p = 0,93$). Los tanques que recibieron alimento tuvieron en promedio una concentración de clorofila *a* más alta (32 µg/L; $p = 0,03$ con los controles de promedio 14 µg/L y $p = 0,02$ con los tanques de melaza de promedio 12 µg/L). Sin embargo, no se observaron estas diferencias significativas con los conteos totales de fitoplancton ($p = 0,07$) donde los valores promedio fueron: $235x10^3$ org/mL para los tratamientos "Alimento", $158x10^3$ org/mL para "Melaza" y $144x10^3$ org/mL para los controles. El incremento de la concentración de clorofila *a* se inició en el día 20 llegando a una concentración de 22 µg/L y al final del experimento presentó la concentración más alta (40 µg/L; $p < 0,01$; Fig. 4a). Sin embargo el incremento del conteo total de fitoplancton se inició en el día 10 ($180x10^3$ org/mL) llegando a concentraciones más altas los días 20 y 30 ($231x10^3$ y $234x10^3$ org/mL; $p < 0,01$).

Las cianobacterias fueron el grupo más importante del fitoplancton representando entre 76 y 96% del conteo total. Los conteos más altos fueron asociados con la adición de alimento balanceado ($p < 0,01$) y el incremento se notó a partir de los días 20 y 30 (Fig. 4b). No hubo un efecto de la filtración al inicio sobre los conteos de cianobacterias (Tabla 8). Las Chroococcales dominaron las cianobacterias (entre 47 y 86%) y fueron representadas por los géneros *Aphanotece*, *Gleocapsa* y *Synechocystis*. Este último género representó entre 50 y 85% del conteo de las cianobacterias. Las Hormogonales de los géneros *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Spirulina* no llegaron a representar más del 35% de

Tabla 8: Promedio de las variables de calidad de agua durante el periodo de estudio (± desviación estándar) en cada tratamiento para el experimento de fertilización orgánica. Datos en la misma fila con diferentes letras de superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA medidas repetidas).

VARIABLE	CONTROL		MELAZA		ALIMENTO	
	Filtrado	No filtrado	Filtrado	No filtrado	Filtrado	No filtrado
Clorofila *a* (µg/L)	13 ± 10^a	14 ± 13^a	10 ± 6^a	13 ± 8^a	28 ± 29^a	36 ± 41^a
Fitoplancton (10^3 org/mL)	147 ± 109^a	141 ± 8^a	193 ± 267^a	123 ± 80^a	236 ± 185^a	234 ± 157^a
Cianobacterias	135 ± 103^a	131 ± 76^a	176 ± 248^a	115 ± 81^a	221 ± 178^a	212 ± 154^a
Chroococcales	112 ± 91^a	101 ± 74^a	148 ± 223^a	90 ± 57^a	160 ± 148^a	183 ± 148^a
Hormogonales	23 ± 34^a	30 ± 13^a	27 ± 28^a	26 ± 27^a	61 ± 20^a	29 ± 10^a
Diatomeas	10 ± 8^a	9 ± 6^a	10 ± 9^a	6 ± 4^a	10 ± 9^a	17 ± 12^a
Pennales	9 ± 8^a	8 ± 5^a	9 ± 5^a	5 ± 5^a	9 ± 9^a	15 ± 12^a
Centrales	1 ± 2^a	1 ± 1^a	2 ± 2^a	1 ± 1^a	1 ± 2^a	2 ± 1^a
Algas verdes	2 ± 3^a	2 ± 2^a	7 ± 14^a	3 ± 3^a	5 ± 7^a	5 ± 5^a
< 10 µm (10^2 org/mL)	21 ± 3^a	15 ± 1^a	50 ± 7^a	20 ± 2^a	44 ± 6^a	47 ± 5^a
> 10 µm (10^2 org/mL)	2 ± 3^a	2 ± 5^a	20 ± 1^a	10 ± 1^a	1 ± 2^a	3 ± 6^a
Zooplancton (org/L)	675 ± 634^a	823 ± 1.211^a	564 ± 483^a	656 ± 859^a	726 ± 865^a	834 ± 934^a
Copépodos	322 ± 545^a	254 ± 221^a	261 ± 443^a	191 ± 238^a	247 ± 272^a	377 ± 415^a
Nauplios	164 ± 152^a	196 ± 347^a	185 ± 334^a	154 ± 208^a	113 ± 271^a	284 ± 200^a
Adultos	158 ± 275^a	56 ± 54^a	92 ± 128^a	37 ± 40^a	106 ± 135^a	93 ± 82^a
Rotíferos	68 ± 47^a	68 ± 56^a	135 ± 178^a	72 ± 58^a	391 ± 835^a	103 ± 220^a
Tintínnidos	275 ± 500^a	500 ± 1.000^b	170 ± 300^a	395 ± 700^b	79 ± 170^a	355 ± 750^b
Bacterias totales (10^3 UFC/mL)	7 ± 5^a	6 ± 3^a	12 ± 17^a	6 ± 4^a	7 ± 5^a	17 ± 5^b
Vibrio spp (10^2 UFC/mL)	9 ± 12^a	5 ± 5^a	8 ± 13^a	7 ± 5^a	5 ± 5^a	10 ± 12^a
TS (mg/L)	42.914 ± 3.240^a	42.509 ± 3.686^a	45.630 ± 3.406^a	45.180 ± 2.568^a	43.636 ± 4.459^a	42.910 ± 4.061^a
TIM	36.236 ± 1.864^a	35.929 ± 2.855^a	38.211 ± 2.292^a	38.281 ± 1.864^a	37.027 ± 3.798^a	36.557 ± 3.391^a
TOM	6.679 ± 1.385^a	6.580 ± 1.130^a	7.419 ± 1.966^a	6.899 ± 956^a	6.608 ± 1.018^a	6.351 ± 1.207^a
TDS (mg/L)	42.780 ± 3.133^a	42.358 ± 3.681^a	45.478 ± 2.859^a	45.033 ± 2.570^a	43.478 ± 4.441^a	42.754 ± 4.051^a
DIM	36.139 ± 2.316^a	35.820 ± 2.850^a	38.098 ± 2.290^a	38.175 ± 1.867^a	36.914 ± 3.785^a	36.449 ± 3.388^a
DOM	6.775 ± 1.494^a	6.538 ± 1.129^a	7.380 ± 1.969^a	6.858 ± 956^a	6.545 ± 659^a	6.305 ± 1.202^a
TSS (mg/L)	135 ± 18^a	151 ± 24^a	153 ± 37^a	147 ± 21^a	158 ± 30^a	155 ± 35^a
PIM	96 ± 19^a	109 ± 23^a	113 ± 32^a	106 ± 19^a	114 ± 27^a	108 ± 30^a
POM	39 ± 4^a	41 ± 4^a	39 ± 7^a	41 ± 4^a	45 ± 7^a	47 ± 11^a

las cianobacterias y no presentaron diferencias con ningún factor (tipo de fertilización orgánica, filtración o tiempo).

Las diatomeas fueron el segundo grupo en importancia del fitoplancton, sus conteos fueron similares para todos los tratamientos (Tabla 8) y se mantuvieron en el tiempo (Fig. 4c). Sin embargo, las diatomeas Pennales que fueron el grupo más representativo dentro de las diatomeas (entre 50 y 99%), presentaron una disminución progresiva con el tiempo donde se obtuvo los valores más bajos en el día 20 ($p = 0,02$). Esta disminución fue menos marcada para los tratamientos que recibieron alimento y los controles que presentaron para el día 20 valores más altos que para los tanques que recibieron melaza ($p = 0,02$; Tabla 8). El último grupo de fitoplancton en importancia fue representado por las algas verdes y sus conteos variaron con el tiempo. Los conteos totales y los conteos para la categoría < 10 µm presentaron los valores más bajos en los días 0 ($11x10^2$ org/mL) y 20 ($16x10^2$ org/mL) ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observó diferencia para ningún factor en la categoría de las algas verdes > 10 µm (Tabla 8).

Como se observó en el primer experimento, la filtración del agua al inicio fue efectiva en remover al zooplancton (60% de remoción). Se encontraron cuantificaciones más bajas en los tanques con agua filtrada comparados con los otros tanques para todos los grupos de zooplancton en el día 0, a la excepción de los rotíferos (copépodos, $p < 0,01$; copépodos adultos, $p < 0,01$; nauplios de copépodos, $p < 0,01$; tintínnidos, $p < 0,01$). Los rotíferos no fueron excluidos por la filtración al tener concentraciones similares para los tanques con agua filtrada y agua no filtrada (133 y 136 org/L respectivamente, $p = 0,90$). Los conteos totales de zooplancton durante el experimento fueron afectados por la adición de alimento ($p = 0,01$ comparando con melaza y $p = 0,01$ comparando con los controles; Tabla 8). En general, los valores promedio más altos de conteo de zooplancton se encontraron al inicio del experimento, bajando progresivamente a partir del día 10 hasta el día 30 (desde 1.337 hasta 107 org/mL; Fig. 4d).

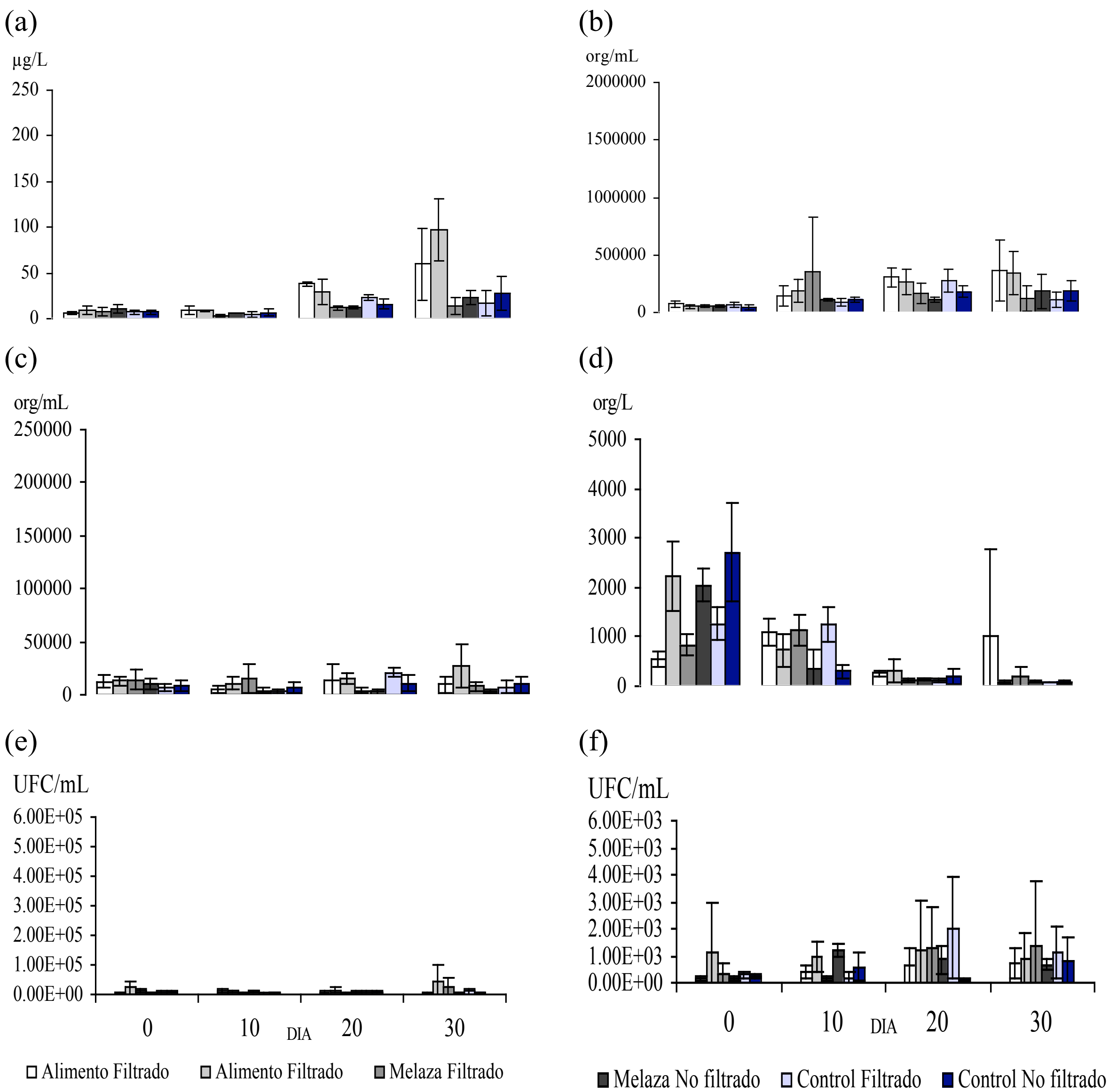

Figura 4: Evolución en el tiempo para cada tratamiento del experimento de fertilización orgánica de las siguientes variables de calidad de agua: (a) clorofila *a*; (b) conteos de cianobacterias; (c) conteos de diatomeas; (d) conteos totales de zooplancton; (d) bacterias totales; y (e) *Vibrio* spp.

Los copépodos junto con los tintínnidos dominaron el zooplancton representando entre 1-96% y 1-97%, respectivamente. Ambos grupos de copépodos (nauplios y adultos) fueron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y se obtuvieron las concentraciones más altas en el día 10 (383 nauplios/L y 248 adultos/L) antes de disminuir en los días 20 y 30 (76 y 46 nauplios/L y 64 y 18 adultos/L, respectivamente). Los tintínnidos tuvieron un efecto de interacción entre el tipo de fertilización y la filtración, donde las concentraciones más altas se observaron en los tratamientos no filtrados (Tabla 8). Este grupo también disminuyo sus conteos con el tiempo ($p < 0,01$); inició con 1.176 org/L y terminó con 4 org/L en el día 30. Los rotíferos de los géneros *Brachionus* y *Lecane* fueron el tercer grupo en importancia para el zooplancton (entre 4 y 58% del conteo total) y su concentración más alta fue asociada con los tratamientos “No filtrado” (Tabla 8; p = 0, 02). La población de rotíferos inició con valores altos (134 y 179 org/L en los días 0 y 10, respectivamente) para disminuir en el día 20 (52 org/L) y después regresar en el día 30 a los conteos iniciales (188 org/L; p = 0,01).

Los conteos totales de bacterias oscilaron entre $3x10^3$ y $43x10^3$ UFC/mL, llegando a valores más bajos que para el experimento de fertilización inorgánica. Los conteos más altos fueron asociados con el tratamiento “Alimento No Filtrado”, seguido por el tratamiento “Melaza Filtrado” (Tabla 8; p = 0,02). No se encontró diferencia en el tiempo (p = 0,19; Fig. 4e). Los conteos de *Vibrio* spp. representaron en promedio entre 4 y 66% del conteo total de las bacterias (más alto que para el primer experimento) y solamente fueron afectados por el factor tiempo. Como se indica en la Fig. 4f, su concentración más alta fue para los días 20 y 30 (12 y $9,4x10^2$ UFC/mL, respectivamente) en comparación con el día 0 ($4x10^2$ UFC/mL; p = 0,03).

Se aislaron 60 cepas de bacterias de las más representativas según color y tamaño de la colonia, de las cuales 2 fueron Gram positivas. Estas bacterias Gram positivas estuvieron presentes en los tratamientos “Control No Filtrado” en el día 0 y “Alimento Filtrado” en el día 20, donde representaron 15 y 32% del total de las bacterias encontradas en agar marino, respectivamente. Las 58 otras cepas fueron Gram negativas de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, y *Plesiomonas* (Tablas 9 y 10). Se identificaron en total 14 especies de *Vibrio*, 10 ya identificadas en el primer experimento y cuatro especies nuevas: *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus*, *V. furnissii* y *V. logei*. *V. orientalis* y *V. tubiashii* dominaron en el día 0, *V. damsela* dominó en el día 10, mientras *V. proteus* dominó en el día 30. *V. alginolyticus* se encontró solamente en el día 30 en el tratamiento "Control Filtrado" donde representó 72% de las colonias encontradas en agar marino pero solamente 32% en agar TCBS. Los géneros *Plesiomonas* y *Photobacterium* fueron aislados el día 10 desde el tratamiento "Control No Filtrado", en agar TCBS y agar marino, respectivamente.

Tabla 9: Porcentajes de las bacterias más representativas seleccionadas desde agar marino (según color y forma de la colonia) en cada tratamiento y para cada día de muestreo durante el experimento de fertilización orgánica.

	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
FILTRADO				
Control	N.D.	N.D.	N.D.	*V. alginolitycus* (72%)
Melaza	N.D.	*V. damsela* (11%)	*V. campbellii* (16%)	*V. proteus* (17%) *V. orientalis* (5%)
Alimento	N.D.	N.D.	*V. tubiashii* (17%)	*V. aestuarianus* (19%)
NO FILTRADO				
Control	N.D.	*V. damsela* (18%) *Photobacterium* (12%)	*V. furnissii* (18%) *V. tubiashii* (20%)	*V. proteus* (29%)
Melaza	N.D.	*V. damsela* (17%)	*V. damsela* (27%)	*V. proteus* (35%)
Alimento	N.D.	N.D.	*V. anguillarum* (22%)	*V. proteus* (43%) *V. tubiashii* (10%)

N.D. = No dominante

Tabla 10: Porcentajes de las bacterias más representativas seleccionadas desde agar TCBS (según color y forma de la colonia) en cada tratamiento y para cada día de muestreo durante el experimento de fertilización orgánica.

	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
FILTRADO				
Control	*V. tubiashii (*34%)	*V. splendidus* (71%)	*V. proteus* (25%) *V. fluvialis* (32%)	*V. proteus* (29%) *V. alginolitycus* (32%)
Melaza	*V. orientalis* (21%) *V. tubiashii* (25%)	*V. orientalis* (37%)	*V. damsela* (19%)	*V. logei* (85%)
Alimento	*V. orientalis* (39%)	*V. tubiashii* (53%)	N.D.	*V. anguillarum* (30%) *V. tubiashii* (16%)
NO FILTRADO				
Control	*V. furnissii* (14%)	*Plesiomonas* (8%)	*V. tubiashi* (36%)	*V. proteus* (56%)
Melaza	*V. orientalis* (17%) *V. tubiashii* (14%)	*V. damsela* (22%) *V. tubiashii* (19%)	*V. splendidus* (16%) *V. furnissii* (42%)	*V. tubiashii* (31%) *V. proteus* (18%)
Alimento	*V. orientalis* (83%)	*V. vulnificus* (37%) *V. diazotrophicus* (6%)	*V. logei* (25%) *V. campbellii* (45%)	*V. tubiashii* (27%) *V. proteus* (29%)

N.D. = No dominante

Las concentraciones promedio de los análisis de sólidos para cada tratamiento se presentan en la Tabla 8 y la evolución de las concentraciones en el tiempo se encuentran en la Fig. 5. La concentración de los sólidos totales (TS) osciló entre 27.211 y 52.923 mg/L, con valores más altos en el tratamiento “Melaza” (45.405 mg/L) que “Alimento” (42.659 mg/L; $p = 0,02$) y los controles (42.712 mg/L; $p = 0,02$). Se observó una disminución significativa el día 10 ($p < 0,01$) para después mantener niveles similares que al inicio. Los sólidos totales disueltos (TDS) representaron el 99,5% de los TS, siendo más altos en el tratamiento “Melaza” (45.255 mg/L) que para los controles (42.569 mg/L; $p = 0,02$) y los tratamientos “Alimento” (42.503 mg/L; $p = 0,02$). Como fue el caso para el primer experimento, los TDS fueron principalmente inorgánicos (DIM representó entre 79 y 89% de TDS) e incrementaron con el tiempo llegando a valores más altos en el día 30 ($p =<0,01$ para el TDS y $p = 0,01$ para DIM; Fig 5a y 5b). La materia particulada (TSS, PIM y POM) no sobrepasó del 0,5% de los TS. Los TSS y el PIM presentaron concentraciones más altas el día 20 ($p < 0,01$ para TSS y PIM; Fig 5d y 5e). La POM solo tuvo diferencias entre los tratamientos no filtrados (43 mg/L; $p = 0,01$; Tabla 8) y filtrados (40 mg/L). Las concentraciones de materia inorgánica como el TIM y el DIM fueron más altas en los tratamientos recibiendo melaza ($p = 0,02$ para TIM y DIM) que los controles y los tratamientos con adición de alimento. El factor tiempo influenció la porción orgánica (TOM y DOM) donde llegó a valores más altos los días 20 y 30 ($p < 0,01$; Fig 5c).

4.2.2. Análisis de componente principal:

Como en el primer experimento todas las variables fueron sometidas a un análisis de componente principal, de las cuales se destacaron seis componentes que explicaron el 84% de la variación total de los datos (Tabla 11). La Tabla 12 da los coeficientes de correlación entre cada componente principal y las variables de calidad de agua medidas. El primer componente presentó una correlación positiva con los sólidos inorgánicos o salinidad (TS, TIM, TDS y DIM) y en menor proporción con la materia orgánica (TOM y DOM). El segundo componente estuvo inversamente relacionado con el fitoplancton (clorofila *a*, POM y conteo de fitoplancton) y la cantidad aplicada de C. El tercer componente tuvo una relación positiva con las variables tiempo, cantidad suministrada de N y materia orgánica (TOM y DOM), y una relación negativa con el zooplancton. El cuarto componente estuvo fuertemente relacionado con TSS y PIM. El quinto componente presentó una correlación positiva con las bacterias (bacterias totales y *Vibrio* spp.). El último componente estuvo correlacionado positivamente con la filtración.

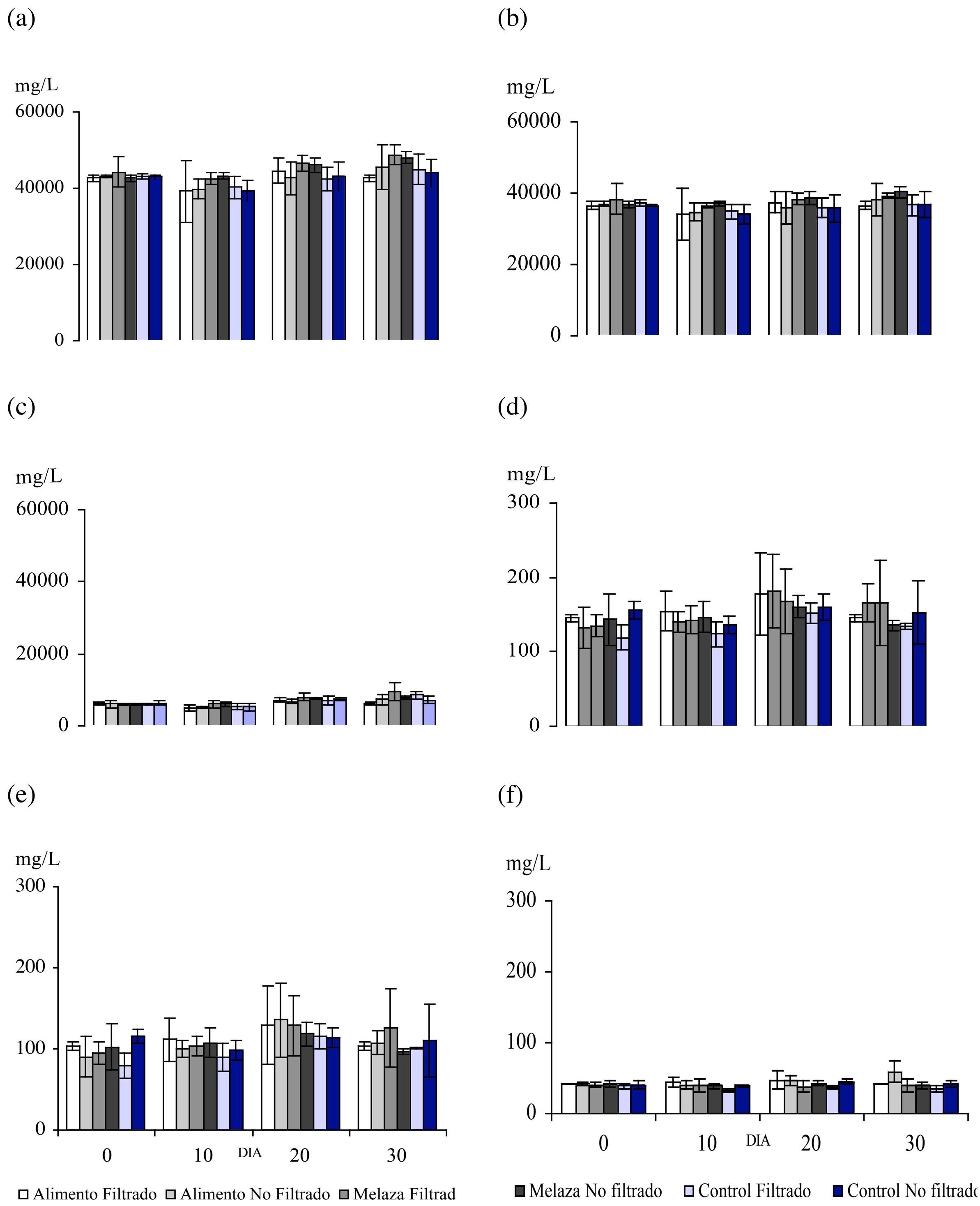

Figura 5: Evolución en el tiempo para cada tratamiento del experimento de fertilización orgánica de las siguientes variables de calidad de agua expresadas en mg/L: (a) Totales de sólidos disueltos (TDS); (b) Materia inorgánica disuelta (DIM); (c) Materia orgánica disuelta (DOM); (d) Total de sólidos suspendidos (TSS); (e) Materia inorgánica particulada (PIM); y (f) Materia orgánica particulada (POM).

Tabla 11: Eingenvalue y varianza explicada con sus respectivos porcentajes de los componentes principales para el experimento de fertilización orgánica.

Factor	Eigenvalue	Porcentaje explicado	Porcentaje acumulado
1	5,9128	32,8	32,8
2	3,0038	16,7	49,5
3	2,0031	11,3	60,8
4	1,5931	8,9	69,7
5	1,5100	8,4	78,1
6	1,0520	5,9	84,0

Tabla 12: Coeficiente de correlación entre las variables originales y los componentes principales (CP). Los coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Filtración	-0,03	-0,04	-0,01	0,02	0,05	**0,91**
Tiempo (día)	0,20	-0,37	**0,81**	0,09	0,04	-0,06
Nitrógeno (mg aplicado/tanque)	0,30	0,37	**0,63**	0,05	-0,01	0,18
Carbono (mg aplicado/tanque)	0,06	**-0,85**	-0,02	0,11	0,04	-0,12
Clorofila *a* (µg/L)	0,09	**-0,88**	0,22	0,04	0,03	0,04
Fitoplancton (org/mL)	-0,21	**-0,60**	0,40	-0,12	-0,11	0,03
Zooplancton (org/L)	0,02	0,17	**-0,77**	-0,06	-0,06	-0,01
Bacterias totales (10^3 UFC/mL)	0,07	-0,01	-0,07	0,02	**0,92**	0,02
Vibrio spp. (10^2 UFC/mL)	0,04	-0,02	0,23	-0,01	**0,84**	0,02
TS (mg/L)	**0,96**	-0,02	0,21	0,09	0,08	-0,05
TIM (mg/L)	**0,97**	-0,02	0,01	0,06	0,02	0,04
TOM (mg/L)	**0,60**	-0,03	**0,58**	0,14	0,21	-0,22
TDS (mg/L)	**0,96**	-0,06	0,16	0,13	-0,01	-0,01
DIM (mg/L)	**0,97**	-0,02	0,01	0,06	0,01	0,04
DOM (mg/L)	**0,52**	-0,02	**0,60**	0,15	0,27	-0,30
TSS (mg/L)	0,14	-0,21	0,08	**0,96**	0,01	0,04
PIM (mg/L)	0,13	-0,03	0,13	**0,96**	0,01	-0,03
POM (mg/L)	0,13	**-0,71**	-0,10	0,38	0,02	0,28

4.2.3. Análisis de regresión múltiple:

En base a los resultados de ACP se mantuvo las siguientes variables para el análisis de regresión múltiple: tiempo (día), alimento aplicado (en base a la concentración de nitrógeno o mg N aplicado), melaza aplicada (en base a la concentración de carbono o mg C aplicado), concentración de clorofila *a* (con transformación logarítmica en base 10), conteo total de zooplancton (con transformación logarítmica en base 10), concentración total de bacterias (con transformación logarítmica en base 10), DIM, DOM, PIM y POM. Se relacionó éstas variables de calidad de agua con la biomasa de fitoplancton, los conteos de bacterias totales y *Vibrio* spp. y las concentraciones de TOM, POM y DOM. Las regresiones se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13: Regresiones múltiples obtenidas por cada variable y sus respectivos coeficientes de determinación.

Regresión	P	R^2
$y_{(Fitoplancton)}$= 0,91 – 0,105 (Zooplancton) – 0,07 (C) – 0,051 (Bacterias) + 0,024 (POM) + 0,014 (Tiempo) + 0,002 (N) – 0,001 (PIM) – 0,000011 (DIM) + 0,000002 (DOM)	< 0,01	69%
$y_{(Bacterias)}$ = 3,2 – 0,13 (Clorofila *a*) – 0,12 (Zooplancton) – 0,071 (C) + 0,16 (POM) – 0,15 (Tiempo) + 0,00043 (PIM) + 0,000075 (DOM) + 0,000032 (N) + 0,000002 (DIM)	**0,06**	16%
$y_{(\mathit{Vibrios}\ spp.)}$ = 1,89 – 2,4 (Zooplancton) + 1,5 (C) + 0,45 (Clorofila *a*) + 0,36 (Bacterias) – 0,005 (DOM) – 0,004 (Tiempo) – 0,002 (PIM) – 0,016 (POM) + 0,0007 (N) + 0,0005 (DIM)	< 0,01	26%
$y_{(TOM)}$= – 518 – 195,9 (Bacteria) – 165 (Zooplancton) – 98 (Clorofila *a*) – 11,4 (C) + 6,3 (POM) + 0,9 (DOM) + 0,7 (Tiempo) – 0,6 (N) – 0,35 (PIM) + 0,05(DIM)	< 0,01	94%
$y_{(DOM)}$= – 255 + 489 (Bacteria) + 215 (C) + 68 (Tiempo) – 45 (Zooplancton) + 32 (Clorofila *a*) – 25,4 (POM) + 5,8 (PIM) – 1,7 (N) + 0,12 (DIM)	< 0,01	50%
$y_{(POM)}$ = – 0,35 + 13 (Clorofila *a*) + 3,48 (Bacterias) + 1 (C) – 0,64 (Zooplancton) – 0,21 (Tiempo) + 0,071 (PIM) + 0,035 (N) – 0,00083 (DOM) + 0,00041 (DIM)	< 0,01	57%

Las predicciones obtenidas a través de los modelos de regresión múltiple fueron altamente significativas, a la excepción del modelo obtenido para las bacterias totales (p = 0,06). El porcentaje de explicación de la variabilidad de los datos osciló entre 26 y 94%. La biomasa de fitoplancton presentó una relación negativa con los conteos de zooplancton y bacterias y el aporte de carbono orgánico y una relación positiva con POM, el tiempo y el aporte de nitrógeno a través del alimento balanceado. La regresión obtenida para las bacterias totales no fue significativa y explicó solamente 16% de la variabilidad en los datos. Sin embargo, la ecuación indica una relación inversa entre los conteos totales de bacterias, la clorofila a, el zooplancton, el aporte de carbono en forma de melaza y el tiempo y una relación positiva con POM, PIM, DOM, DIM y la adición de alimento. *Vibrio* spp. presentaron una relación positiva con el aporte de carbono, la clorofila *a* y las bacterias totales, mientras que para el zooplancton, DOM, tiempo, PIM y POM la relación fue negativa. La regresión obtenida para la materia orgánica total tuvo el coeficiente de determinación más alto e indica una asociación negativa con las bacterias, el zooplancton, la clorofila *a* y el carbono y una relación positiva con POM, DOM y el tiempo. Los dos siguientes modelos (DOM y POM) fueron muy parecidos y ambos indicaron una relación positiva con las bacterias, el carbono adicionado, la clorofila *a*, PIM y DIM y una relación inversa con el zooplancton. Sin embargo, la DOM fue además positivamente relacionada con el tiempo e inversamente relacionada con la cantidad de nitrógeno adicionado. Se observó el inverso para la POM; relación positiva con el N adicionado y relación negativa con el tiempo.

4.3. COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS REGÍMENES DE FERTILIZACIÓN:

Se compararon a través de ANOVA (medidas repetidas, modelo Split Plot) los resultados obtenidos en los dos experimentos (Tabla 14). No se observó diferencia significativa para las concentraciones promedio de clorofila *a* ($p = 0,06$), sin embargo los resultados indican concentraciones ligeramente más altas para los tratamientos recibiendo fertilizantes inorgánicos y alimento balanceado. Estas diferencias fueron significativas para los conteos total de fitoplancton ($p = 0,04$), de cianobacteria ($p = 0,04$) y de las cianobacterias Chroococcales ($p = 0,04$), que fue el grupo más representativo de fitoplancton en ambos experimentos. Las diatomeas totales y las diatomeas Pennales presentaron en promedio conteos más altos en los dos tratamientos recibiendo nutrientes inorgánicos ($p < 0,01$ para 10N:1P y $p = 0,03$ para 5N:1P). Sin embargo, no se observó diferencia entre los regímenes de fertilización para las diatomeas Centrales (p = 0,59). Los conteos de algas verdes fueron más altos para el tratamiento 10N:1P de fertilización inorgánica e indicando valores altos, pero no significativamente diferentes, en los tratamientos “5N:1P”, “Control Inorgánico” y “Alimento”. Se encontraron conteos más altos de algas verdes > 10 µm en el experimento de fertilización inorgánica donde hubo conteos altos de *Cosmarium* spp.

En general, los conteos promedio de zooplancton total y copépodos no presentaron diferencias significativas entre los dos regímenes de fertilización. Sin embargo, los conteos de tintínnidos fueron más altos en el experimento de fertilización orgánica (p = 0,03) y los rotíferos tuvieron concentraciones promedio más altas en los tratamientos “Melaza” y “Alimento” (p = 0,04).

Las concentraciones totales de bacterias fueron más altas en los dos tratamientos recibiendo fertilizantes inorgánicos (p = 0,01). En cambio, no se presentó diferencia para los conteos de *Vibrio* spp. (p = 0,26). Un 60% de los *Vibrio* spp. encontrados fueron similares en ambos experimentos. *V. carcahariae* (día 0 tratamiento “10N:1P No Filtrado” y día 20 tratamiento “5N:1P No Filtrado”), *V. harveyi* (día 30 tratamiento “Control Filtrado”) y *V. nereis* (día 0 tratamiento “5N:1P Filtrado”) predominaron solamente en el experimento de fertilización inorgánica. Mientras *V. alginolyticus* (día 30 tratamiento “Control Filtrado”), *V. diazotrophicus* (día 10 tratamiento “Alimento No Filtrado”), *V. furnissii* (día 0 tratamiento “Control No Filtrado” y día 20 tratamientos “Control No Filtrado” y “Melaza No Filtrado”) y *V. logei* (día 20 tratamiento “Alimento No Filtrado” y día 30 tratamiento “Melaza Filtrado”) se encontraron solamente en el experimento de fertilización orgánica.

Tabla 14: Promedio de las variables de calidad de agua durante el periodo de estudio (± desviación estándar) en cada tratamiento para los experimentos de fertilización inorgánica y orgánica. Datos en la misma fila con diferentes letras de superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA medidas repetidas).

VARIABLE	CONTROL		INORGÁNICO		ORGÁNICO	
	Inorgánico	Orgánico	10N:1P	5N:1P	MELAZA	ALIMENTO
Clorofila *a* (µg/L)	14 ± 6^{a}	14 ± 12^{a}	44 ± 39^{a}	40 ± 45^{a}	12 ± 7^{a}	32 ± 35^{a}
Fitoplancton (10^3 org/mL)	92 ± 45^{a}	144 ± 93^{a}	339 ± 292^{b}	358 ± 324^{b}	157 ± 197^{a}	235 ± 168^{b}
Cianobacterias	77 ± 35^{a}	132 ± 89^{a}	273 ± 280^{b}	310 ± 432^{b}	145 ± 184^{a}	217 ± 164^{b}
Chroococcales	65 ± 32^{a}	107 ± 82^{a}	233 ± 252^{b}	268 ± 415^{b}	119 ± 163^{a}	195 ± 146^{b}
Hormogonales	12 ± 9^{a}	25 ± 26^{a}	40 ± 49^{a}	42 ± 63^{a}	26 ± 27^{a}	22 ± 16^{a}
Diatomeas	7 ± 6^{a}	10 ± 7^{ab}	51 ± 56^{c}	39 ± 31^{c}	8 ± 7^{a}	13 ± 11^{ab}
Pennales	6 ± 5^{a}	9 ± 7^{a}	44 ± 50^{b}	34 ± 29^{b}	7 ± 7^{a}	12 ± 10^{ab}
Centrales	1 ± 3^{a}	1 ± 1^{a}	7 ± 10^{a}	5 ± 4^{a}	1 ± 2^{a}	1 ± 2^{a}
Algas verdes	8 ± 16^{bc}	2 ± 2^{a}	16 ± 17^{c}	11 ± 12^{abc}	4 ± 10^{ab}	5 ± 6^{abc}
< 10 µm (10^2 org/mL)	77 ± 149^{b}	18 ± 20^{a}	150 ± 178^{ab}	98 ± 113^{ab}	31 ± 55^{ab}	45 ± 54^{ab}
> 10 µm (10^2 org/mL)	28 ± 113^{c}	2 ± 4^{ab}	8 ± 33^{c}	9 ± 20^{bc}	7 ± 22^{ab}	1 ± 5^{a}
Zooplancton (org/L)	312 ± 283^{a}	744 ± 954^{a}	545 ± 533^{a}	452 ± 439^{a}	621 ± 687^{a}	767 ± 888^{a}
Copépodos	203 ± 244^{a}	288 ± 411^{a}	439 ± 516^{a}	310 ± 414^{a}	235 ± 352^{a}	303 ± 356^{a}
Nauplios	122 ± 199^{a}	181 ± 180^{a}	221 ± 355^{a}	138 ± 270^{a}	170 ± 275^{a}	198 ± 278^{a}
Adultos	81 ± 97^{a}	107 ± 202^{a}	218 ± 388^{a}	171 ± 328^{a}	65 ± 97^{a}	105 ± 110^{a}
Rotíferos	89 ± 190^{a}	68 ± 51^{a}	71 ± 110^{a}	99 ± 170^{ab}	104 ± 130^{b}	247 ± 618^{b}
Tintínnidos	20 ± 28^{a}	388 ± 796^{b}	35 ± 48^{a}	44 ± 75^{a}	282 ± 553^{b}	217 ± 559^{b}
Bacterias totales (10^3 UFC/mL)	32 ± 55^{ab}	7 ± 4^{a}	110 ± 160^{c}	99 ± 140^{c}	9 ± 12^{ab}	12 ± 11^{ab}
Vibrio spp (10^2 UFC/mL)	1 ± 1^{a}	6 ± 10^{a}	10 ± 9^{a}	14 ± 17^{a}	9 ± 1^{a}	8 ± 2^{a}
TS (mg/L)	40.232 ± 3.200^{a}	42.711 ± 3.400^{c}	39.853 ± 3.100^{a}	38.045 ± 2.500^{a}	45.405 ± 2.800^{d}	43.273 ± 3.400^{bc}
TIM	32.422 ± 2000^{b}	36.082 ± 2.563^{c}	32.763 ± 2.900^{ab}	30.888 ± 2.700^{a}	38.246 ± 2.056^{d}	36.792 ± 3.545^{c}
TOM	7.426 ± 1.218^{a}	6.630 ± 1.244^{a}	7.091 ± 1.578^{a}	7.194 ± 1.420^{a}	7.159 ± 1.543^{a}	6.480 ± 1.102^{a}
TDS (mg/L)	40.100 ± 3.200^{b}	42.570 ± 3.367^{b}	39.719 ± 3.600^{a}	37.921 ± 3.367^{c}	45.255 ± 2.674^{d}	43.116 ± 4.189^{c}
DIM	32.000 ± 2.100^{a}	35.979 ± 2.560^{a}	32.600 ± 2.500^{a}	30.980 ± 2.500^{a}	38.136 ± 2.056^{b}	36.682 ± 3.537^{b}
DOM	8.100 ± 2.080^{a}	6.657 ± 1.308^{a}	7.048 ± 1.580^{a}	7.158 ± 1.420^{a}	7.119 ± 1.545^{a}	6.425 ± 956^{a}
TSS (mg/L)	125 ± 28^{a}	143 ± 22^{bc}	134 ± 31^{ab}	125 ± 26^{a}	150 ± 30^{bc}	155 ± 32^{c}
PIM	81 ± 24^{a}	102 ± 22^{ab}	90 ± 22^{ab}	83 ± 21^{a}	110 ± 26^{ab}	111 ± 28^{b}
POM	44 ± 19^{a}	40 ± 5^{a}	44 ± 13^{a}	42 ± 20^{a}	40 ± 7^{a}	46 ± 9^{a}

Las concentraciones de sólidos totales, totales de sólidos disueltos y totales de sólidos suspendidos fueron, en promedio, más altas para el experimento de fertilización orgánica ($p < 0{,}01$ para TS y TDS y $p = 0{,}02$ para TSS). En ambos experimentos la materia inorgánica disuelta (DIM) predominó los análisis y la materia particulada (TSS, PIM y POM) nunca representó más del 1% de los sólidos totales. No hubo diferencias significativas entre los regímenes de fertilización para la porción orgánica (POM, DOM y TOM) de los sólidos ($p = 0{,}25$ para TOM, $p = 0{,}30$ para DOM y $p = 0{,}33$ para POM).

5. DISCUSIÓN

5.1. FERTILIZACIÓN INORGÁNICA:

A través del ACP se explicó 75% de la variabilidad total de los datos y se encontraron relaciones positivas entre los componentes principales y las siguientes variables (en orden de importancia): los sólidos inorgánicos o salinidad, el tiempo, la materia orgánica, las bacterias totales, el zooplancton, el aporte en nutrientes, *Vibrio* spp. y la filtración (Tablas 5 y 6). Además, el tercer componente principal que explicó 13% de la variabilidad de los datos por si sólo, fue inversamente relacionado con el fitoplancton.

La salinidad en un sistema acuático influye sobre el tipo de organismos presentes, los cuales se caracterizan por sus niveles de tolerancia a concentraciones indicadas de iones disueltos. Ese efecto se evidenció en el tipo de organismos encontrados durante el experimento; las especies de fitoplancton, zooplancton y bacterias encontradas son comunes de ambientes marinos. Los niveles de salinidad promedio subieron con el tiempo en todos los tratamientos. Se registró una tasa de evaporación diaria en el orden de 0,38 cm que pudo haber sido generada por los días soleados y la aireación utilizada. Los valores de salinidad más bajos se encontraron en los tanques que recibieron N y P. En sistemas acuícolas, un gran porcentaje de los fosfatos adicionados reaccionan con el ion calcio y forman moléculas de fosfato de calcio muy insolubles que precipitan en la columna de agua (Boyd, 2001). Esta reacción química explicaría las concentraciones más bajas de TDS en los tratamientos recibiendo fósforo dos veces a la semana. Sin embargo, no se observó una salinidad significativamente más baja en el tratamiento 5N:1P (37.921 mg/L) comparado con el tratamiento recibiendo la mitad de fósforo (10N:1P; 39.719 mg/L).

El análisis de regresión múltiple indicó que la concentración del fitoplancton fue positivamente relacionada con el incremento en nutrientes (N y P), los conteos de bacterias totales, el zooplancton y la POM (Tabla 7). En general, las concentraciones del fitoplancton aumentaron con la adición de nutrientes inorgánicos, sin obtener diferencia entre los dos niveles de fósforo. Varios estudios indican que el fósforo y nitrógeno son los dos nutrientes limitantes en el agua para el crecimiento del fitoplancton (Elser *et al*., 1990; Watson y McCauley, 1992; Boyd y Tucker, 1998); otros apuntan al nitrógeno como principal limitante en aguas oceánicas (Hargreaves, 1998). No se ha llegado a determinar si la solo utilización de un nutriente es suficiente para aumentar el crecimiento del fitoplancton, o si la combinación da una mayor repuesta. Elser *et al*. (1990) revisaron trabajos publicados sobre el efecto de fertilización, mencionan un incremento mayor de fitoplancton cuando utilizaron una combinación de nitrógeno y fósforo (18N:1P) comparando con la adición única de nitrógeno o fósforo. En nuestro caso, ambos tratamientos de fertilización dieron una concentración similar de clorofila *a* (44 μg/L de promedio para 10N:1P y 40 μg/L de promedio para 5N:1P), mucho mayor a los tanques controles (14 μg/L). Boyd y Tucker (1998) reportan para piscinas acuícolas fertilizadas, concentraciones promedio de clorofila *a* de 55 μg/L.

Las cianobacterias y diatomeas son algas comunes de la costa ecuatoriana (De la Cuadra *et al*., 1998). En este experimento, las cianobacterias representaron el 90% del fitoplancton en promedio e incrementaron sus concentraciones con la fertilización. Este incremento en biomasa se notó también para las diatomeas, sin embargo, las algas verdes no respondieron a la adición de nutrientes en el medio. Las cianobacterias aprovechan más rápido del nitrógeno adicionado (Tilman *et al*., 1986) y normalmente dominan en condiciones eutróficas donde la diversidad del fitoplancton es baja (Paerl y Tucker, 1995). En cambio, las diatomeas aprovechan mejor del fósforo y tienden a dominar en ambientes mesotróficos (Tilman *et al.*, 1986). Las algas verdes son rápidamente desplazadas por las cianobacterias y diatomeas al existir una acumulación de nutrientes en el medio (Duarte *et al.*, 1992).

El fitoplancton sirve de alimento al zooplancton herbívoro y normalmente, cuando se incrementa la presencia de zooplancton, se reduce la concentración de fitoplancton. Sin embargo, algunos trabajos cuestionan la efectividad del zooplancton en controlar el fitoplancton en condiciones eutróficas (Elser *et al.*, 1990; Cottinghan *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 2001). Se sabe que los copépodos adultos se alimentan principalmente de ciliados y fitoplancton de tamaño grande (Jürgens y Jeppesen, 2000; Sommer *et al.*, 2001). En este experimento, el fitoplancton fue dominado por la presencia de cianobacterias coloniales (*Aphanotece*) y unicelulares (*Gleocapsa* y *Synechocystis*) de menor tamaño. No se espera un efecto directo de depredación por parte de los copépodos sobre ese tipo de fitoplancton (Sommer *et al.*, 2001), pero más bien un efecto positivo indirecto a través del incremento en nutrientes inorgánicos por reciclaje de sus presas y depredación sobre los ciliados (Cottingham *et al.*, 1997; Jürgens y Jeppesen, 2000). Además, no se observó que el incremento en fitoplancton resultó en un incremento en zooplancton. Ravera y Scotto (1999) mencionan que la presencia de zooplancton no está siempre estrictamente relacionada a la del fitoplancton.

Los resultados del análisis de regresión múltiple indicaron que los conteos totales de bacterias fueron positivamente relacionados con la concentración de clorofila *a*, los conteos de zooplancton, los nutrientes (P y en menor grado N) y la POM, mientras exhibieron una relación inversa con el tiempo. La correlación positiva encontrada entre los conteos totales de bacterias y el fitoplancton se explica por la dependencia de las bacterias por el carbono orgánico derivado del fitoplancton en el sistema experimental (Nagata, 2000; Richardot *et al.*, 2001). Esta relación se encontró también con la POM, que en piscinas acuícolas es principalmente en forma de fitoplancton (Hargreaves y Tucker, 1996). Sin embargo, la correlación puede también indicar una relación indirecta por efecto de dependencia de las dos variables para un factor común, como la concentración de un nutriente limitante o el efecto de depredación por parte del zooplancton (Vrede *et al.*, 1999).

Durante los primeros 10 días del experimento, ambas variables (fitoplancton y bacterias totales) incrementaron su biomasa en repuesta a la adición de nutrientes. Normalmente, las bacterias responden más rápidamente que el fitoplancton a una aplicación de nutrientes inorgánicos por ser más eficientes en absorberlos y tener un crecimiento más rápido (Kerr *et al.*, 1971; Caron *et al.*, 2000). Las bacterias son competidores más efectivos para el P y podrían reducir o retardar su disponibilidad para el fitoplancton (Cottingham *et al.*, 1997). Los incrementos de bacterias fueron registrados en los días 10 y 20, mientras las concentraciones más altas de fitoplancton se registraron en el último día del experimento (día 30).

En este experimento, el incremento durante los primeros 10 días de las bacterias podría también resultar de la disminución en rotíferos durante el mismo periodo. El cambio de una población zooplanctónica dominada por rotíferos al inicio del experimento por una dominación de los copépodos en los días 10 y 20, redujo la depredación por parte del zooplancton permitiendo un incremento en los conteos de bacterias. Además, la depredación de la población de rotíferos por parte de los copépodos carnívoros causó el incremento de la DOM en el día 10 (Fig. 3c), que sirvió de base para el crecimiento de las bacterias (Turley *et al.*, 2000; Richardot *et al.*, 2001).

Las concentraciones de *Vibrio* spp. encontradas fueron determinadas por la adición de P y la concentración de clorofila *a* (análisis de regresión múltiple, Tabla 7). Sin embargo, no se observó diferencia significativa en sus conteos entre tratamientos.

Las concentraciones más altas fueron obtenidas en el último día de muestreo coincidiendo con los valores más altos de clorofila *a*. Los cambios observados en la población de *Vibrio* spp. son el resultado de la acumulación de materia orgánica y nutrientes en el medio. Lavilla-Pitogo *et al.* (1998) consideran que la fertilización promueve el crecimiento bacteriano y favorece a *Vibrio* spp. de tipo luminiscente, cuya dominancia empezó en el experimento a partir del día 20. Al realizar la identificación bacteriana de las cepas dominantes se obtuvo un 82% de *Vibrio* spp. sin diferencias marcadas entre los tratamientos. Lightner (1983) y Moriarty (1998) mencionan que *Vibrio* y *Pseudomonas* son los dos géneros más comunes en los ecosistemas marinos y usualmente constituyen parte de la microbiota natural de los crustáceos. Chen *et al.* (1992) encontraron 84% de *Vibrio* spp. en el agua de piscinas de producción de *P. monodon* en Tailandia. Las especies dominantes fueron *V. damsela, V. fluvialis, V. proteus* y *V. splendidus*. Gomez-Gil *et al.* (1998) reportan las mismas especies aisladas a partir del hepatopáncreas de *P. vannamei* sanos. Tres de las especies identificadas en el experimento han sido previamente asociadas con eventos de mortalidades en cultivos de *P. vannamei* (Moriarty, 1998; Saulnier *et al.,* 2000): *V. damsela* que dominó en todos los tratamientos el día 10; *V. harveyi* que se encontró el último día en el Control Filtrado; y *V. vulnificus* que se presentó en el día 0 en el Control Filtrado y el día 20 en el tratamiento 5N:1P No Filtrado. Por la dominación neta de *Synechocystis* durante todo el experimento, no fue posible relacionar la aparición de estas especies de *Vibrio* potencialmente patógenos con la aparición o dominancia de un tipo de fitoplancton en particular.

5.2. FERTILIZACIÓN ORGÁNICA:

A través del ACP se explicó 84% de la variabilidad total de los datos y se encontraron relaciones positivas entre los seis componentes principales y las siguientes variables (en orden de importancia): los sólidos inorgánicos o salinidad, la materia orgánica, el tiempo, el alimento aplicado, las bacterias y la filtración (Tablas 11 y 12). Además, el segundo componente principal que explicó 17% de la variabilidad de los datos por si sólo, fue inversamente relacionado con el fitoplancton y la aplicación de melaza. El tercer componente tuvo una relación inversa con el zooplancton. Se observaron las salinidades más altas en el tratamiento con adición de melaza y, en general, no hubo incremento con el tiempo. Los valores de salinidad más altos encontrados en los tanques que recibieron melaza podrían explicarse por las concentraciones altas de sílice normalmente encontradas en este tipo de material orgánico (Boyd y Tucker, 1998).

El análisis de regresión múltiple para el fitoplancton fue muy diferente que el encontrado en el experimento de fertilización inorgánica. Para la adición de fertilizantes orgánicos, la biomasa del fitoplancton fue inversamente relacionada con los conteos de zooplancton, las bacterias y la melaza, y positivamente relacionada con POM, el tiempo y el alimento balanceado (Tabla 13). En este segundo experimento, la aplicación de alimento balanceado fue efectiva en promover el crecimiento del fitoplancton, en particular de las cianobacterias. Sin embargo los conteos de diatomeas y algas verdes fueron similares en todos los tratamientos. Esta observación fue reforzada al comparar los dos experimentos, por el hecho que las diatomeas presentaron en promedio conteos más altos en los tratamientos recibiendo nutrientes inorgánicos del primer experimento.

En sistemas de cultivo, el uso de alimento balanceado contribuye en aportar nitrógeno y fósforo al medio (Boyd y Tucker, 1998; Burford *et al*., 2003). De todo el alimento adicionado solo de 25 a 45% del nitrógeno, 20-30% del fósforo y 10-15% del carbono son incorporados por parte del camarón (Briggs y Funge-Smith, 1994; Boyd y Teichert-Coddington, 1995). De la porción no asimilada, una parte es inmovilizada por absorción del suelo y fijación por bacterias, otra es volatilizada y la restante es absorbida por el fitoplancton o descargada en los efluentes (Boyd y Tucker, 1998; Ritvo *et al*., 1998). Saldias (2001) estima que entre 51 y 61% del fósforo y 0-35% del nitrógeno entrantes en piscinas de producción de *P. vannamei* en Ecuador son asimilados dentro de la piscina. Hargreaves (1998) afirma que el alimento constituye más del 90% del aporte en nitrógeno para sistemas de cultivo semi-intensivos. Las cianobacterias, al ser mejor competidoras para el nitrógeno (Tilman *et al*., 1986), aprovecharon mejor de la adición del alimento balanceado.

Sin embargo, el incremento en la biomasa del fitoplancton se notó solamente para los dos últimos días de muestreo. Antes de poder aprovechar de los nutrientes contenidos en el alimento o la materia orgánica excretada por el zooplancton, el fitoplancton debe esperar que el proceso de mineralización por parte de las bacterias sea completado (Boyd y Tucker, 1998). Durante este segundo experimento, no se encontró una relación positiva entre las biomasas del fitoplancton y de las bacterias totales, como fue el caso en el primer experimento. El fitoplancton solo incrementó sus concentraciones con la adición del alimento balanceado; mientras las bacterias, además del alimento balanceado, aprovecharon también de la adición de melaza (Caron *et al*., 2000). Se observaron concentraciones más altas de bacterias en los tratamientos “Alimento No Filtrado” y “Melaza Filtrado” (Tabla 8). Como se indicó con la ecuación obtenida en el análisis de regresión múltiple, el fitoplancton no supo aprovechar de la fuente de carbono orgánico (melaza).

Si bien es cierto que la ecuación de regresión múltiple obtenida para las bacterias no fue significativa y explicó solamente 16% de la variabilidad en los datos, se encontró una correlación inversa con los conteos de zooplancton. Esta disminución se atribuye al efecto pastoreo producido por el zooplancton, principalmente por parte de los rotíferos y tintínnidos. Los rotíferos no fueron efectivamente removido por la filtración del agua antes de iniciar el experimento, lo que explicaría su efecto más pronunciado en este segundo experimento sobre los niveles de bacterias encontrados. El efecto pastoreo se notó también sobre el fitoplancton (relación inversa obtenida con el análisis de regresión múltiple), lo que permitió la liberación de nutrientes. Este incremento en materia orgánica fue directamente aprovechado por las bacterias (Richardort *et al*., 2001).

De igual manera que en el primer experimento, *Vibrio* spp. no presentaron concentraciones diferentes entre tratamientos y solamente se notó un efecto del tiempo, con conteos más altos para todos los tratamientos en el día 30. El 95% de las bacterias dominantes identificadas fueron *Vibrio* spp. comunes en estos sistemas marinos (Lightner, 1983; Chen *et al*., 1992; Gomez-Gil *et al*., 1998; Moriarty, 1998). *V. orientalis* y *V. tubiashii* dominaron en el día 0, *V. damsela* dominó en el día 10, mientras *V. proteus* dominó en los días 20 y 30. La no observación de un patrón de evolución en el tiempo común entre todos los tratamientos, podría reflejar los diferentes niveles tróficos correspondientes a cada tratamiento. Además la dominancia fue menor que para el experimento de fertilización inorgánica y se observaron la presencia de más especies por muestreo. Tres de las especies identificadas en el experimento han sido previamente asociadas con eventos de mortalidades en cultivos de *P. vannamei* (Moriarty, 1998; Saulnier *et al*., 2000): *V. alginolyticus* que dominó en el día 30 en el tratamiento "Control Filtrado"; *V. damsela* que dominó en todos los tratamientos en el día 10 (como fue el caso en el primer experimento); y *V. vulnificus* que fue presente únicamente en el día 10 en el tratamiento "Alimento No filtrado".

Al comparar los dos experimentos de fertilización, se encontraron conteos de tintínnidos más altos en el segundo experimento y concentraciones promedio de rotíferos más altas en los tratamientos "Melaza" y "Alimento". Boyd y Tucker (1998) indican que la aplicación de productos de naturaleza orgánica son eficientes en incrementar al zooplancton y a los organismos bénticos. Rubright *et al.* (1981) encontraron una relación directa entre la cantidad de alimento suministrado y el crecimiento del zooplancton en piscinas de camarón de sistemas semi-intensivos. Este incremento en rotíferos y tintínnidos permitió un mayor efecto de pastoreo sobre las bacterias y el fitoplancton durante el experimento de fertilización orgánica. Se notó el control que ejerció el zooplancton sobre las bacterias, reduciendo de manera significativa sus concentraciones en el segundo experimento. Sin embargo, el control no fue suficiente para afectar la concentración del fitoplancton en general, pero si causó disminución en los conteos de cianobacterias. Además, la concentración de clorofila *a* fue más alta en los tratamientos "No Filtrado" para el segundo experimento.

6. CONCLUSIÓN

En el experimento de fertilización inorgánica, las biomasas del fitoplancton y de las bacterias incrementaron con la adición de fertilizantes sin encontrar diferencia entre los dos niveles de aporte en fósforo. El fitoplancton dominado por *Synechocystis* spp. no fue efectivamente removido por parte de los copépodos que dominaron los conteos de zooplancton. Se encontró una relación estrecha entre los conteos de bacteria y la biomasa del fitoplancton, resaltando el efecto positivo de la fertilización para ambas variables y el aprovechamiento por parte de las bacterias del carbono orgánico derivado del fitoplancton. Se evidencia que el efecto de la fertilización inorgánica fue de tipo "bottom-up" sobre la cadena trófica, favoreciendo los niveles tróficos más bajos (fitoplancton y bacteria) y con poca repercusión en los niveles más altos (zooplancton carnívoro).

La fertilización orgánica a través de la adición de alimento incrementó la biomasa del fitoplancton al final del experimento, evidenciando la necesidad de la mineralización de esta fuente de nutrientes antes de ser aprovechado por el fitoplancton. La repuesta de las bacterias fue más rápida y se notó un incremento en el segundo muestreo. Los conteos de tintínnidos y rotíferos fueron más altos que en el primer experimento y la biomasa del zooplancton en general incrementó con la adición del alimento y de la melaza. Se observó el efecto pastoreo de los rotíferos sobre el fitoplancton y las bacterias. El efecto de la fertilización orgánica fue de tipo "top-down" sobre la cadena trófica, favoreciendo el zooplancton que a su vez controló la dinámica del fitoplancton y de las bacterias.

En ambos experimentos, las bacterias dominantes fueron del género *Vibrio* presentando un incremento en sus conteos como resultado de la acumulación de materia orgánica en el sistema. Se identificaron 17 especies de *Vibrio*, todas comunes del ambiente marino y de la microbiota natural de *P. vannamei*. Sin embargo, cuatro especies son frecuentemente identificadas como patógenos (*V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. harveyi* y *V. vulnificus*).

El mesocosmo es una herramienta útil para investigar las interacciones existentes en los ecosistemas acuáticos permitiendo mantener un control sobre las condiciones experimentales. El estudio presentado pretende identificar las relaciones entre bacterioplancton y fitoplancton bajo diferentes regímenes de fertilización para encontrar técnicas de manejo en el control de problemas bacterianos en piscinas camaroneras. Es importante resaltar que los experimentos no consideraron a dos componentes importantes de una piscina camaronera, que son el camarón y el suelo. Es evidente que las relaciones presentadas cambiarán con el efecto de depredación del camarón y la presencia de sedimentos con concentraciones altas de materia orgánica, nutrientes y bacterias.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Guzmán, G., y F. Ascencio Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Research Development in Microbiology 4:333-348.

Almeida, M.A., M.A. Cunha, y F. Alcantara. 2001. Factors influencing bacterial production in a shallow estuarine system. Microbial Ecology 42:416-426.

American Public Health Association (APHA), American Water Work Association, y Water Environment Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. APHA, Washington D.C., EE.UU.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176:227-235.

Avnimelech, Y., S. Diab, y M. Kochva. 1992. Control and utilization of inorganic nitrogen in intensive fish culture ponds. Aquaculture and Fisheries Management 23:421-430.

Bayot, B., R. Cedeño, I. Betancourt, F. Panchana, M. Peeters, y F. Echeverria. 2001. Monitoreo epidemiológico en tres piscinas afectadas por el WSSV. El Mundo Acuícola 7(1):46-50.

Boyd, C.E. 2001. Water Quality a Primer. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holanda.

Boyd, C.E., y D. Teichert-Coddington. 1995. Dry matter, ash and elemental composition of pond culture *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the World Aquaculture Society 26:88-92.

Boyd, C.E., y C.S. Tucker. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holanda.

Boyd, C.E., y L. Massaut. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering 20:113-132.

Boyd, C.E., E.E. Prather, y R.W. Parks. 1975. Sudden mortality of a massive phytoplankton bloom. Weed Science 23:61-67.

Briggs, M., y S. Funge-Smith. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. Aquaculture and Fisheries Management 25:789-811.

Brock, J.A., y K.L. Main. 1995. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei.* The Oceanic Institute, Hawaii, EE.UU.

Burford, M. 1997. Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. Aquaculture Research 28:351-360.

Burford, M.A., P.J. Thompson, R.P. McIntosh, R.H. Bauman, y D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture 219:393-411.

Cajas de, L., M. Prado, D. Coello, y J. Cajas. 2000. Fitoplancton y mesozooplancton en piscinas camaroneras en la costa ecuatoriana durante el evento del síndrome de la mancha blanca. Páginas 61-85 *En* F.I. Ormaza (editor), Boletín Especial, Situación de la Problemática por la Presencia del Virus "Mancha Blanca (WSSV)" en el Cultivo del Camarón en el Litoral Ecuatoriano Durante 1999. Instituto Nacional de Pesca, Guayaquil, Ecuador.

Caron, D.A., E.L. Lim, R.W. Sanders, M.R. Dennett, y U.G. Berninger. 2000. Responses of bacterioplankton and phytoplankton to organic carbon and inorganic nutrient additions in contrasting oceanic ecosystems. Aquatic Microbial Ecology 22:175-184.

Chen, S.N., S.L. Huang, y G.H. Kuo. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infection in cultured giant tigre prawn, *Penaeus monodon*, in Taiwan. Páginas 196-205, *En* W. Flux y K.L. Main (editores), Diseases of Cultured *Penaeus* Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Hawaii, EE.UU.

Chong, V.C., y A. Sasekumar. 1981. Food and feeding habits of the white prawn *Penaeus merguiensis*. Marine Ecology Progress Series 5:185-191.

Cocke, E. 1967. The Myxophyceae of North Carolina. Edwards Brothers, Inc., Michigan, EE.UU.

Coman, F.E., R.M. Connolly, y N.P. Preston. 2003. Zooplankton and epibentic fauna in shrimp ponds: factors influencing assemblage dynamics. Aquaculture Research 34:359-371.

Cottingham, K., S.E. Knight, S.R. Carpenter, J.J. Cole, M.L. Pace, y A.E. Wagner. 1997. Response of phytoplankton and bacteria to nutrients and zooplankton: a mesocosm experiment. Journal of Plankton Research 19(8):995-1010.

Daniels, H., y C.E. Boyd. 1993. Nitrogen, phosphorus and silica fertilization of brackish water ponds. Journal of Aquaculture in the Tropics 8:103-110.

De La Cruz, J.A. 2001. Quorum quenching by *Bacillus cereus* UW85. University of Wisconsin, Wisconsin, EE.UU.

De la Cuadra, T., P. Macías, D. Coello, M. Luzuriaga, J. Lindao, y W. Pesantes. 1998. Condiciones físicas, químicas y biológicas asociadas con el evento Enos durante Febrero de 1998. Boletín Científico y Técnico del Instituto Nacional de Pesca, Ecuador 16(2):1-30.

Duarte, C., S. Agusti, y D.E. Canfield. 1992. Patterns in phytoplankton community structure in Florida lakes. Limnology and Oceanography 37(1):155-161.

Elser, J.J., y C.R. Goldman. 1990. Experimental separation of the direct and indirect effects of herbivorous zooplankton on phytoplankton in a subalpine lake. Verh Internat Verein Limnol 24:493-498.

Elser, J.J., E.R. Marzolf, y C.R. Goldman. 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47:1468-1477.

Gamboa, J. 2001. Estudio de la actividad de las enzimas digestivas del *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y preferencia alimenticia. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180:147-165.

Gomez-Gill, B., L. Tron-Mayén, A. Roque, J.F. Turnbull, V Inglis, y A.L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163:1-9.

Gram, L., H.-P. Grossart, A. Schlingloff, y T. Kiørboe. 2002. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacte*r strains isolated from marine snow. Applied and Environmental Microbiology Aug. 2002:4111-4116.

Haney, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21:467-475.

Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture 166:181-212.

Hargreaves, J.A., y C.S. Tucker. 1996. Evidence for control of water quality in channel catfish *Ictalurus punctatus* ponds by phytoplankton biomass and sediment oxygenation. Journal of the World Aquaculture Society 27(1):21-29.

Havens, K.E. 1993. An experimental analysis of macrozooplankton, microzooplankton and phytoplankton interactions in a temperate eutrophic lake. Archives of Hydrobiology 127(1):9-20.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, y S.T. Williams. 2000. Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, EE.UU.

Hulot, F.D., P.J. Morin, y M. Loreau. 2001. Interactions between algae and the microbial loop in experimental microcosms. Oikos 95(2):231-238.

Jiménez, R. 1983. Diatomeas y Silicoflagelados del Fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Acta Oceanográfica del Pacífico, INOCAR, 2(2), Guayaquil, Ecuador.

Jürgens, K., y E. Jeppesen. 2000. The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. Journal of Plankton Research 22:1047-1070.

Kerr, P.C., D.L. Brockway, D.F. Paris, y J.T. Barnett. 1971. The interrelation of carbon and phosphorus in regulating heterotrophic and autotrophic populations in an aquatic ecosystem, Shriner´s pond. 41-61.

Lampert, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21:483-490.

Lavilla-Pitogo, E., M. Leaño, y M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment. Aquaculture 164:337-349.

Lazur, A.M., y D.C. Britt. 1997. Pond recirculating production systems. SRAC Publication No. 455.

Lightner, D.V. 1978. Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. Journal of Invertebrate Pathology 32:139-150.

Lightner, D.V. 1983. Diseases of cultured Penaeid shrimp. Páginas 289-320, *En* J.P. McVey (editor), CRC Handbook of Mariculture, Volume 1. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Florida, EE.UU.

Massaut, L. 1999. Manejo de sabores/olores no deseados ("off-flavor") en cultivos de camarón en Ecuador. El Mundo Acuícola 5(2):21-26.

McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz, y A. Horowitz. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquacultural Engineering 21:215-227.

Midlen, A., y T.A. Redding. 1998. Environmental Management for Aquaculture. Aquaculture Series 2, Kluwer Academic Publishers, Dordrecth, Holanda.

Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibri*o species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164:351-358.

Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial Biosystems: New Frontiers; Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Nagata, T. 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. Páginas 121-152 *En* D.L. Kirchman (editor), Microbial Ecology of the Oceans. John Wiley & Sons, Inc., New York, EE.UU.

Paerl, H.W. 2000. Marine Plankton. Páginas 121-148 *En* B. Whitton y P. Malcolms (editores), The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holanda.

Paerl, H.W., y C.S. Tucker. 1995. Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. Journal of the World Aquaculture Society 26(2):109-131.

Paffenhöfer, G.-A. 1998. Heterotrophic protozoa and small metazoa: feeding rates and prey-consumer interactions. Journal of Plankton Research 20(1):121-133.

Pechar, L. 1987. Use of an acetone:methanol mixture for the extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll-a in phytoplankton. Archiv für Hydrobiologie Supplement 78:99-117.

Pelczar, M., R. Reid, y E.C.S. Chan. 1996. Microbiología, Cuarta Edición. McGraw-Hill Book Co., EE.UU.

Phillips, M.J., C.K. Lin, y M.C.M. Beveridge. 1993. Shrimp culture and the environment – lessons from the world's most rapidly expanding warmwater aquaculture sector. Paginas 1-19 *En* R.S.V. Pullin, H. Rosenthal, y J.L Maclean (editores), Environment and Aquaculture in Developing Countries. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manilla, Filipinas.

Pinckney, J.L., H.W. Paerl, P. Tester, y T.L. Richardson. 2001. The role of nutrient loading and eutrophication in estuarine ecology. Environmental Health Perspectives 109(5):699-706.

Pla, L. 1986. Análisis Multivariado: Métodos de Componentes Principales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, D.C., EE.UU.

Preston, N.P., F.E. Coman, y V.M. Fry. 2003. Shrimp pond zooplankton dynamics and the efficiency of sampling effort. Aquaculture Research 34:373-381.

Rao, P.S.S., y I. Karunasagar. 2000. Incidence of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in tropical shrimp culture ponds. Aquaculture International 8:463-472.

Ravera, O., y S. Scotto. 1999. A sampler-incubator for studying zooplankton grazing and phytoplankton production. Journal Limnology 58(1):49-57.

Reynolds, C.S., J.M. Thompson, A.J.D. Ferguson, S.W. Wiseman. 1982. Loss processes in the population dynamics of phytoplankton maintained in closed systems. Journal of Plankton Research 4:561-600.

Richardot, M., D. Devoras, A. Thouvenot, D. Sargos, J.L. Berthon, y J. Devaux. 2001. Influence of cladoceran grazing activity on dissolved organic matter, enzymatic hydrolysis and bacterial growth. Journal of Plankton Research 23:1249-1261.

Ritvo, G., J. Dixon, A. Lawrence, T. Samocha, W. Niell, y M. Speed. 1998. Accumulation of chemical elements in Texas shrimp ponds solids. Journal of the World Aquaculture Society 29(4):422-431.

Rubright, J.S., J.L. Harrell, H.W. Holcomb, y J.C. Parker. 1981. Responses of plankton and benthic communities to fertilizer and feed applications in shrimp mariculture ponds. Journal of the World Mariculture Society 12(1):281-299.

Saldias, C.A. 2001. Efluentes y balance de nutrientes en piscinas camaroneras con diferentes prácticas de manejo. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, y D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191:133-144.

Smith, H.V. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science 221:669-671.

Smith, D.W. 1985. Biological control of excessive phytoplankton growth and the enhancement of aquacultural production. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42:1940-1945.

Smith, P.T. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). Toxicon 24(4): 857-869.

Solís, P.A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Sommer, U., F. Sommer, B. Santer, C. Jamieson, M. Boersma, C. Becker, y T. Hansen. 2001. Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. Ecology Letters 4:545-550.

Strauss, E.A., y G.A. Lamberti. 2002. Effect of dissolved organic carbon quality on microbial decomposition and nitrification rates in stream sediments. Freshwater Biology 47:65-74.

Subas, S. 1994. Applied Multivariate Techniques. Johniley and Sons Inc., New York, EE.UU.

Sung, H.H., H.C. Li, F.M. Tsai, Y.Y. Ting, y W.L. Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 236:261-271.

Tchobanoglous, G., y F.L. Burton. 1991. Wastewater Engineering. Treatment, Disposal and Reuse. Third Edition. Metcalf & Eddy, Inc., McGraw-Hill, Inc., New York, EE.UU.

Tendencia, E.A., y L.D. de la Peña. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195:193-204.

Tilman, D., S.S. Kilham, y P. Kilham. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. Annual Review in Ecological Systems 13:349-372.

Tilman, D., R. Kiesling, R. Sterner, S. Kilham, y F.A. Jonson. 1986. Green, bluegreen, and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorous, silicon and nitrogen. Archive of Hydrobiology 106(4):473-485.

Tilzer, M.M. 1987. Light-dependence of photosynthesis and growth in Cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21:401-412.

Torrans, L., y F. Lowell. 1987. Effects of blue tilapia/channel catfish polyculture on production, food conversion, water quality and channel catfish off-flavor. Proceedings of the Arkansas Academy of Science 41:82-86.

Tucker, C.S., y C.E. Boyd. 1978. Consequences of periodic applications of copper sulfate and simazine for phytoplankton control in catfish ponds. Transactions of the American Fisheries Society 107:316-320.

Tucker, C.S., y S.W. Lloyd. 1984. Phytoplankton communities in channel catfish ponds. Hydrobiologia 112:137-141.

Tucker, C.S., S.W. Lloyd, y R.L. Busch. 1984. Relationships between phytoplankton periodicity and the concentrations of total and unionized ammonia in channel catfish ponds. Hydrobiologia 111:75–79.

Turley, C.M., M. Bianchi, U. Christaki, P. Conan, J.R.W. Harris, S. Psarra, G. Ruddy, E.D. Stutt, A. Tselepides, y F. Van Wambeke. 2000. Relationship between primary producers and bacteria in a oligotrophic sea–the Mediterranean and biogeochemical implications. Marine Ecology Progress Series 193:11-18.

van Liere, L., y L.R. Mur. 1980. Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. Developments in Hydrobiology 2:67-77.

Vrede, K., T. Vrede, A. Isaksson, y A. Karlsson. 1999. Effects of nutrients (phosphorous, nitrogen, carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton – a seasonal study. Limnology and Oceanography 44(7):1616-1624.

Watson, S., y E. McCauley. 1992. Sigmoid relationships between phosphorus, algal biomass, and algal community structure. Journal of Fisheries and Aquatic Science 49: 2605-2610.

Watts, M.C., y G.R. Bigg. 2001. Modeling and the monitoring of mesocosm experiments: two case studies. Journal of Plankton Research 23(10):1081-1093.

Yamaji, I. 1973. Illustrations of the Marine Plankton of Japan. Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japón.

Yusoff, F.M., M.S. Zubaidah, H.B. Matias, y T.S. Kwan. 2002. Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. Aquaculture Research 33:269-278.