

R. 2987



30

72

02 JUN. 1997.

Manuel Antonio González del Valle

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS

ASOCIADAS A CULTIVOS DE MICROALGAS MARINAS. PRODUCCIÓN DE

COMPUESTOS DE POTENCIAL INTERÉS

MANUEL ANTONIO GONZÁLEZ DEL VALLE

SEVILLA, 1997

TD-382

Doy mi autorización a la Secretaría del Departamento de Fisiología y Biología Animal para que mi Tesis Doctoral titulada "CARACTERIZACIÓN Y CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS ASOCIADAS A CULT." sea consultada según la/s modalidad/es que indico:

- Consulta en Secretaría
- Préstamo
- Reproducción Parcial
- Reproducción Total
- Ningún tipo de consulta sin autorización expresa

¿Que tipo de usuarios?

- Doctores
- Doctorandos
- Estudiantes
- Cualquier Otro

OBSERVACIONES: _____

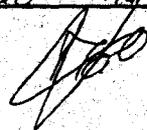
_____.

Sevilla, 2 de Julio de 1997

GONZALEZ DEL VALLE, MANUEL ANTONIO

Fdo.: Manuel Antonio Gonzalez del Valle

Marcar con una "X" las modalidades a que accede.



Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and strokes, positioned above the printed name.

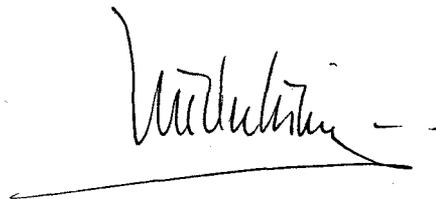
Manuel Antonio González del Valle

D. Luis M^a Lubián Chaichío, Colaborador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Profesor Asociado del Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología de la facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Cádiz, como Director,

HACE CONSTAR:

Que esta memoria, titulada “Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés”, presentada por D. Manuel Antonio González del Valle, resume su trabajo de tesis y, considerando que reúne todos los requisitos legales, autoriza su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 26 de Mayo de 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Lubián Chaichío', with a long horizontal line underneath it.

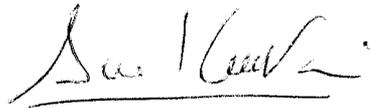
Dr. D. Luis M^a Lubián Chaichío

Dña. María Elvira Ocete Rubio, Profesora Titular de Universidad y Directora del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA que la Tesis Doctoral “Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés”, adscrita al programa de Doctorado “Biología Molecular y Celular”, ha sido realizada por D. Manuel Antonio González del Valle bajo la dirección del Dr. Luis M^a Lubián Chaichío y actuando como Tutora la Dra. M.A.A. Ilundain Larrañeta, Catedrática de Fisiología del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla, bajo la supervisión del citado Departamento y cumpliendo los requisitos legales vigentes.



Fdo. Dña. María Elvira Ocete Rubio
Directora del Departamento



Fdo. Dña. M.A.A. Ilundain Larrañeta
Tutora de la Tesis



Esta tesis Doctoral, “Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés” se realizó gracias a la beca de proyecto, enmarcada en el proyecto de colaboración entre La Junta de Andalucía y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas “Obtención y desarrollo de un banco de cepas y cultivos inóculo de microalgas marinas”. La labor experimental se realizó en el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC).

Parte de los resultados de esta Tesis se han presentado en los siguientes congresos:

VII Seminario de Química Marina, Cádiz 1994:

“Acumulación de carotenoides por bacterias marinas asociadas a cultivos de microalgas”

1º Simposio sobre a margem continental Ibérica Atlántica. Lisboa 1994.

“A preliminary study about the population growth of microalgae in monospecific culture and their related bacteria”

XV Congreso nacional de Microbiología , Madrid 1995.

“Interacciones entre un cultivo monoespecifico de microalgas y su población bacteriana asociada.”

Además, con los resultados se han realizado las siguientes publicaciones:

Gonzalez-delValle, M.A., Moreno-Garrido, I., Montero, O., and Lubián, L.M. 1994. A preliminary study about the population growth of microalgae in monoespecific culture and their related bacteria. Revista de Geociências, Museu Nacional de História Natural. Universidade de Lisboa. pp: 51-55

Gonzalez-delValle, M.A., Montero, O., Moreno-Garrido, I., y Lubián, L.M^a. Acumulación de pigmentos por bacterias marinas asociadas a cultivos de microalgas. Actas del VII congreso de Química Marina. (En prensa)

Ante todo quiero agradecer a Luis M^a Lubián Chaichío la oportunidad que me brindó al ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral. Él es el principal responsable de este trabajo (lo siento Luis, no quería ser un acusica). Sin su ayuda, consejos e incommensurable paciencia nada de lo escrito se podría haber llevado a cabo.

Al Dr. Antonio Palomares, por su ayuda y Fé en un inútil como yo, y al Dr. Manuel Mejías por ponerme en contacto con Luis Lubián.

A D. JoseLuis Ríos, del Instituto de la Grasa por ser el artífice del espectro de masas más bonito jamás visto. Y a los Servicios Centrales de la Facultad de Química de Sevilla por regalarme un FAB.

A todo el personal de mi laboratorio y del resto del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, por su cariño y apoyo:

Olimpio, ejemplo de paciencia, de maestría y tolerancia, estoy en deuda con él tanto en lo científico como en lo humano, ya que es el responsable de mis conocimientitos de química y de otras muchas cosas que no puedo expresar con palabras (el sabe que soy un desastre escribiendo). Solo le puedo decir GRACIAS.

Nachete, compañero de cuarto, jefe y olores, que con paciencia me ha hecho tomar gustito por las lechugas que no se comen.

Las niñas; Juanita Mari (la mejor vecina), Emma, Ana, Verónica (La Vero, aunque le pese), Isa (también vecina de enfrente y niña aunque diga que no), Gemma y Africa (en hora buena por su maternidad), que han dado alegría y muy buenos consejos a aqueste que escribe.

A la Dra. Sarasquete (la gallega), vecina y maestra, por su ayuda en lo científico y lo personal.

A los Drs. Abelardo Gómez Parra y Julián Blasco, por sus consejos, apoyo y buen humor.

A Angel y Edu, por ser ejemplos de becario y profesor, y, sobre todo, por dejarnos sus mesas libres a Nacho y a mí (que conste que el cariño no es interesado).

A D. Manuel Arjonilla, Mari Carmen Oneto, Ruchi e Isabel, por aguantarme y además ayudarme.

Como a ellos, a los miembros de la planta de abajo, Drs. Emilio Pascual y Antonio Rodríguez, Inma, Nacho II, Drs. Manuel Yúfera, Lina, Alberto Arias y Pilar Drake, Mariana y Nino (por ocuparse de mis melocotoneros).

Y por supuesto, a ese llamado personal de apoyo, al menos en lo moral, Rafi, Maria, José María Espigares, Ramon, Joaquín, José Luis (y por supuesto a su minibar), Enrique Wulf (lo mejor en bibliotecario) , Jesús Correa, Antonia, Antonio “el marinero” (por enseñarme muchas cosas que de otro modo jamás habría conocido) y Florencio (sobre todo por mandarme a casa cuando era tarde).

A mis padres, que me han dado todo lo que tengo, me han soportado y encima dicen que niño más guapo y bueno (solo unos padres son capaces de mentir así), gracias por educarme, quererme y mimarme. Por añadidura a mi Broderito, buena gente cuando duerme, le quiero mucho.

Y por último a “mi Ana”, que me ha dado mucho, tanto, que a ver como se explica. Creo que no hay modo; pero entre todo lo que me ha dado, quiero destacar el mejor regalo de cumpleaños que se pueda recibir, mi hija. A ellas les dedico esta tesis con todo el amor.

A mis dos Anas

Capítulo 1, Introducción

1.1.- ANTECEDENTES GENERALES	2
1.1.1.- Identificación de cepas bacterianas de entornos salinos	5
1.1.2.- Interacción microalga-bacteria	8
1.1.3.- Producción de compuestos de posible interés biotecnológico	10
Pigmentos bacterianos	11
Compuestos con propiedades tensioactivas	11
1.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	12
1.2.1.- Identificación de cepas de bacterias asociadas a cultivos de microalgas marinas.	12
1.2.2.- Interacción microalga-bacterias	13
1.2.3.- Estudio de compuestos bacterianos de posible interés biotecnológico	13
Estudio de la composición pigmentaria de <i>Alteromonas</i> sp. aislada a partir de distintos cultivos de microalgas	13
Estudio de un agente tensioactivo purificado a partir de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , aislada a partir cultivos de microalgas marinas	14

Capítulo 2, Material y métodos

2.1.- PROCEDENCIA Y DESCRIPCIÓN DE LAS MICROALGAS ESTUDIADAS	16
2.1.1.- Procedencia de las microalgas	16
2.1.2.- Descripción de las microalgas estudiadas	16
<i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butcher	16
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	18
<i>Porphyridium cruentum</i> (S.F.Gray) Näg	19
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen) Takano	20
<i>Nannochloropsis gaditana</i> Lubian	21
<i>Rhodomonas salina</i> (Wislouch) Hill & Wetherbee	22

2.2.- CULTIVO DE MICROALGAS	23
2.1.1.- Condiciones de cultivo y medida del crecimiento	23
2.2.2.- Cálculo de los parámetros de crecimiento: tasa exponencial y rendimiento del cultivo	25
2.2.3.- Consumo de nutrientes	26
2.2.4.- Tratamientos antibióticos	26
2.3.- PROCEDIMIENTO DE CULTIVO BACTERIANO	27
2.3.1.- Medios de cultivo	27
2.3.2.- Condiciones de cultivo y medida del crecimiento	29
2.3.3.- Volúmen y biomasa celular	30
2.4.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE MICROALGAS	30
2.4.1.- Aislamiento y obtención de cultivos puros	30
2.4.2.- Caracterización de las cepas bacterianas	31
2.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	32
2.6.- ANÁLISIS DE PIGMENTOS EN <i>Alteromonas</i> sp., AISLADA DE CULTIVOS DE MICROALGAS	33
2.6.1.- Extracción con distintos disolventes	33
2.6.2.- Separación de pigmentos	34
2.6.2.1.- Cromatografía en capa fina (TLC)	34
2.6.1.2.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	34
2.6.3.- Identificación de pigmentos	35
2.6.3.1.- Reacciones químicas	35
Saponificación de extracto crudo	35
Reducción con borohidruro	36
Tratamiento ácido suave	36
Tratamiento ácido fuerte	36
2.6.3.2.- Espectrofotometría Vis-UV	37
2.6.3.3.- Espectroscopía de Infrarrojo	37

2.6.3.4.-	Resonancia magnética nuclear (RMN)	37
2.6.3.5.-	Espectrometría de masas	38
2.6.4.-	Producción de pigmentos	38
2.6.4.1.-	Procedimiento y medios de cultivo	38
2.6.4.2.-	Cuantificación de pigmentos	39
2.7.-	ESTUDIO DEL TENSIOACTIVO PRODUCIDO POR <i>Psuedomonas aeruginosa</i> (TCOR3) AISLADA DE CULTIVOS DE MICROALGAS	40
2.7.1.-	Extracción y caracterización del tensioactivo	40
2.7.2.-	Producción del agente tensioactivo	41
2.7.2.1.-	Procedimiento y medios de cultivo	41
2.7.2.2.-	Cuantificación del compuesto tensioactivo	41

Capítulo 3, Resultados

3.1.-	IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS PRESENTES EN LOS CULTIVOS DE MICROALGAS	43
3.1.1.-	Caracterización de las bacterias aisladas a partir de los cultivos de microalgas	43
3.1.2.-	Comparación de las distintas cepas y formación de “clusters”	50
3.2.-	INTERACCIÓN MICROALGA-BACTERIA	52
3.2.1.-	Caracterización de los parámetros que definen los crecimientos de distintas poblaciones de microalgas y sus bacterias asociadas	52
	<i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butcher	52
	<i>Nannochloropsis gaditana</i> Lubian	58
	<i>Isochrysis galbana</i> Parke	61
	<i>Rhodomonas salina</i> (Wislouch) Hill & Wetherbee	64
	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen) Takano	70
	<i>Porphyridium cruentum</i> (S.F.Gray) Näg	75
3.2.2.-	Comportamiento de cultivos axénicos	80

3.3.- ANÁLISIS DE PIGMENTOS DE LA CEPA BACTERIANA <i>Alteromonas</i> sp. AISLADA A PARTIR DE CULTIVOS DE MICROALGAS	82
3.3.1.- Descripción de la cepa bacteriana	82
3.3.2.- Análisis espectrofotométrico y cromatográfico del perfil pigmentario	83
3.3.3.- Caracterización química de los grupos funcionales de las principales fracciones	88
Reducción con borohidruro	89
Tratamiento ácido suave	91
Tratamiento ácido fuerte	93
Saponificación del extracto crudo	95
3.3.4.- Identificación del pigmento mayoritario (Pico 1)	97
Espectroscopía de infrarrojos	97
Resonancia magnética nuclear (RMN)	99
Espectroscopía de masas	105
Estructura propuesta	107
Determinación del coeficiente de extinción específico y molar	107
3.3.5.- Producción de pigmentos	108
Influencia de la fuente de carbono en el perfil pigmentario	108
Influencia de la agitación-aireación sobre la producción del pigmento mayoritario	111
Efecto de la concentración de oxígeno en el medio	113
3.3.6.- Identificación y determinación de un agente tensioactivo producido por una cepa de <i>P. aeruginosa</i>	117
Descripción de la cepa bacteriana	117
Identificación del agente tensioactivo	118
Efecto de la salinidad y de la fuente de carbono sobre la producción del agente tensioactivo	123

Capítulo 4, Discusión

4.1.- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE MICROALGAS	126
4.2.- INTERACCIÓN MICROALGA-BACTERIAS	128
4.3.- ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS DE POSIBLE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	134
4.3.1.- Identificación y estudio de la producción de pigmentos en <i>Alteromonas</i>	134
4.3.2.- Estudio del agente tensioactivo purificado a partir de cultivos de la cepa bacteriana TCOR3 (<i>P. aeruginosa</i>), aislada a partir de cultivos de microalgas	137
Conclusiones	139
Bibliografía	142

1.1.- ANTECEDENTES GENERALES

Las microalgas son microorganismos eucariotas que poseen una maquinaria fotosintética capaz de convertir la energía solar en biomasa, con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que las plantas superiores (Thomas *et al*, 1984). Estos microorganismos presentan unas tasas altas de producción, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y son omnipresentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con el intervalo apropiado de temperaturas (Shelef & Soeder, 1980).

En la actualidad, las microalgas siguen siendo esenciales en acuicultura para el cultivo de moluscos y de estados larvarios de algunos crustáceos y peces. Además, se utilizan para el cultivo de especies intermedias, formando parte de la cadena alimentaria que tiene lugar en cualquier criadero convencional: rotíferos, artemia y copépodos. Las microalgas, a su vez, son organismos interesantes para la obtención de productos naturales, como carotenoides (β -caroteno, astaxantina, zeaxantina, etc.), lípidos y proteínas, con aplicación en farmacia, alimentación y cosmética. Otra aplicación es su utilización en sistemas de depuración de aguas, pudiendo retirar metales pesados, macronutrientes, etc., del medio acuático (Garbisu, *et al*, 1991, Garnham *et al*, 1992, Moreno-Garrido *et al*, 1994).

Desde hace tiempo se sabe que las poblaciones de microalgas en cultivo llevan asociadas poblaciones bacterianas, aunque su interdependencia no es bien conocida. Algunos autores apuntan la posibilidad de que las bacterias acompañantes de las microalgas favorecen el crecimiento de éstas (Berland *et al*, 1970, Forlani *et al*, 1989, Kesthacher-Liebson *et al*, 1995, Ukeles & Bishop, 1975), o bien pueden regularlo en algunas especies de microalgas estableciendo relaciones complejas (Iqbal *et al*, 1993). Asimismo, otros autores han puesto de manifiesto la presencia de bacterias patógenas en los cultivos de microalgas. Estas bacterias pueden ser patógenas para las especies que forman parte de la cadena alimentaria en el criadero, para la especie a alimentar, e incluso para el consumidor final de las especies cultivadas. Además, pueden producir el colapso de los cultivos de microalgas (Guillard, R.R.L., 1959, Openheimer, 1955).

Se considera que la flora bacteriana existente en el agua y fango marinos es un eslabón esencial en la cadena trófica del mar, pues las bacterias heterótrofas son capaces de aprovechar la materia orgánica en estado coloidal. Así, mediante actividad exoproteolítica (Delmas *et al*, 1994) producen compuestos monoméricos libres que, incorporándose de nuevo en el medio, restablecen las combinaciones químicas de C, N, P y S, controlando de este modo la distribución espacial y temporal de estos bioelementos (Castellví, 1972, ZöBell, 1961, Azam *et al*, 1983, Hopkinson & Vallino, 1994). Por ello, un problema a resolver es el tipo de relación que se establece entre las poblaciones de algas y bacterias en cuanto a los nutrientes se refiere, en un medio de cultivo de microalgas controlado y, a través de esta relación, conocer como interfiere la población bacteriana en el equilibrio de nutrientes. Por todo ello, el conocimiento de las cepas bacterianas acompañantes de las microalgas y las interacciones alga-bacteria, se presenta como esencial en los diversos campos de aplicación de las microalgas.

Desde hace mucho tiempo, distintos investigadores que han trabajado con microalgas se han esforzado por conseguir cultivos axénicos (Berland *et al*, 1969, 1970, Cotrell & Suttle, 1993, Droop, 1967, Reich & Kahn, 1954), primordialmente mediante el uso de antibióticos. Sin embargo, la aparición de resistencias a éstos y su rápida expansión (Andersen & Sandaa, 1994, Sandaa & Enger, 1994, Sizemore & Colwell, 1977, Sundin & Bender, 1993, Sundin *et al*, 1994) desaconseja su uso sistemático en acuicultura y en particular en cultivos de microalgas debido a los efectos indeseables que pueden ocasionar los antibióticos sobre ellas. Se han ensayado otras técnicas como la partición dextrano-polietilenglicol, que consiste en la separación de la población de microalgas de la de bacterias mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Losada *et al*, 1993); pero este sistema no se ha mostrado eficaz para cultivos en masa, además de resultar dañino para determinados tipos de microalgas, y pudiendo interferir en el estudio posterior que se realice. También se ha considerado la posibilidad de utilizar determinadas cepas bacterianas que potenciasen el crecimiento de las microalgas y, a su vez, sirvieran de barreras biológicas para posibles patógenos. Por ello se pone nuevamente de manifiesto la necesidad de un gran conocimiento de las cepas bacterianas asociadas a las microalgas, de las interacciones que se establecen entre ambas poblaciones y, por supuesto, el efecto que causan estas bacterias en las especies que se desea alimentar.

En los sistemas terrestres, las interacciones planta-bacteria están bien estudiadas en la zona de la rizosfera. Sin embargo, en entornos acuáticos las interacciones microalga-bacteria son poco conocidas. Por analogía con el medio terrestre, algunos autores como Cole (1982) y Bell (1983), definen el concepto de fitosfera como la zona que rodea al alga y en la que los microorganismos se ven influenciados por los productos liberados de la misma. Sin embargo, en este último caso el concepto es mucho más complejo, pues no se trata de una interacción microorganismo-célula de organismo pluricelular, sino que se trata de una interacción microorganismo-microorganismo, lo que hace que su estudio sea también mucho más complejo.

La bacteriología del medio marino es una disciplina relativamente nueva, a pesar de que a modo de anécdota, según Brisou (1980), las primeras observaciones datan del año 2700 a.d.C., cuando un trabajador chino observó que estanques salobres con agua estancada se tornaban de color rojo. Sin embargo, los primeros estudios relativos a bacterias marinas se considera que datan de mediados del siglo pasado, aunque se trata únicamente de observaciones aisladas que solo tienen un valor cualitativo debido a los métodos utilizados (Castellví, 1972).

En 1884, Certés publicó los resultados obtenidos en su artículo "Sur la culture à l'abri des germes atmosphériques, des eaux et des sédiments rapportés par les expéditions du Travailleur et du Talisman: 1882-1883" (Litchfield, 1976). El hecho de no encontrar restos de animales ni plantas a grandes profundidades marinas hizo que Certés se plantease la posibilidad de que, al igual que en los medios terrestres, hubiese bacterias en el medio marino que transformaban la materia orgánica en inorgánica. Para comprobar el hecho tomó más de 100 muestras de agua y sedimentos (a lo largo del curso de las dos expediciones) de las que algunas procedían de hasta 5000 m de profundidad. Siguiendo los consejos personales de "Ms. Pasteur" (como indica en su publicación), cultivó las muestras a salvo de contaminación con grandes dificultades pues, aunque en el laboratorio las técnicas de asepsia eran fáciles de conseguir, a bordo de un barco las dificultades fueron inmensas. Otra dificultad que encontró Certés fue que los medios de cultivo no dieron los resultados por él deseados. Sin embargo, comprobó que las bacterias eran viables a pesar de grandes cambios de presión, logrando una serie de aislamientos y ofreciendo las primeras descripciones. Ocho años después, en 1892, Rusell (Litchfield, 1976),

además de dar resultados cuantitativos de una serie de muestras procedentes del golfo de Nápoles, probó la existencia de distintos grupos fisiológicos, entre ellos las bacterias reductoras de nitratos. De este modo se demostró la presencia de bacterias en el medio marino no afectado por la presencia continental.

En 1894 Frankland & Frankland (Litchfield, 1976), basándose en los trabajos de Rusell, cuantifican la distribución de bacterias en el medio marino. Simultáneamente Fischer en 1894 (Castellví, 1972) realiza estudios similares, observando que el mayor número corresponde a las zonas costeras. En la distribución vertical, halló que el número máximo de bacterias se encuentra entre los 200 y 400 m de profundidad, interpretando este hecho como el resultado de la acción bactericida de los rayos solares a menores profundidades. Comprobó a su vez, que la distribución de las bacterias en el mar no es uniforme, sino que las poblaciones bacterianas se hallan asociadas a los organismos del plancton o localizadas en los bordes de corrientes convergentes, donde se produce un afloramiento de nutrientes a la superficie del mar.

En 1934 ZöBell (Castellví, 1972, Litchfield, 1976) impulsa la bacteriología marina, que a partir de este momento comienza a desarrollarse como una disciplina independiente, evolucionando en distintos campos. Desde entonces hasta la actualidad los estudios se han basado sobre todo en la taxonomía de las bacterias de entornos salinos, ecología de las bacterias de entornos naturales y bacterias patógenas de peces. Sin embargo son pocos los estudios enfocados hacia los efectos de las bacterias sobre las microalgas.

1.1.1.- Identificación de cepas bacterianas de entornos salinos

Los conocimientos sobre las bacterias halófilas son muy escasos, estimándose que el 98% de estas es aún desconocido (Manual Bergey, 1984). Los grupos bacterianos más estudiados hasta el momento son los relacionados con patogeneidad de peces, bacterias del entorno litoral, del sedimento y de condiciones extremas, como por ejemplo barófilas, termófilas y extremadamente halófilas. Otro grupo bacteriano estudiado en el entorno marino son las bacterias fotótrofas y las cianobacterias. Desde el punto de vista taxonómico la mayor parte de las bacterias halófilas se encuentran en una situación de *incertae sedis* (Manual Bergey, 1984), aunque últimamente se está

realizando un gran esfuerzo para identificar y ordenar este grupo de bacterias (Berland *et al*, 1969, Fuhrman *et al*, 1992, García *et al*, 1987, Kaspar & Tamplin, 1993, Márquez *et al*, 1987, 1992, Oliver, 1982, Torreblanca *et al*, 1986, Ventosa *et al*, 1982, 1989, 1990). Una de las herramientas más potentes con las que cuenta la microbiología en general, y la marina en particular, es la secuenciación del ARNr 16S, con la que se ha podido determinar la existencia de una gran variabilidad de especies bacterianas marinas (Kemp *et al*, 1993, Kramer & Singleton, 1993, Rochelle *et al*, 1994). Sin embargo, las bacterias asociadas a microalgas no han sido estudiadas aún de un modo sistemático; por esta razón existe una gran dificultad para identificar las bacterias procedentes de cultivos de microalgas.

Según Austin (1982), los principales géneros de eubacterias del entorno marino son:

Bacterias fotótrofas: *Chromatium*, *Thiospirillum*, *Thiocystis*, *Thiocapsa*, *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, *Chloroherpeton*, *Ectothiorhodospira*, *Rhodocyclus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* y *Erythrobacter*.

Cianobacterias: *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Nostoc*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Spirulina*, *Trichodesmium*, *Dermocarpa*, *Calothrix*, *Dichothrix*, *Richelia*, *Haliarachne*, *Dactyliococcopsis*, *Katagnymene*, *Nodularia*, *Pelagothrix* y *Prochloron*.

Bacterias deslizantes: *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Flexithrix*, *Herpethosiphon*, *Saprospira*, *Sporocythophaga*, *Microscilla*, *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Leucothrix* y *Thiotrix*.

Bacterias filamentosas: *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Pedomicrobium*, *Planctomyces*, *Pirella* y *Prosthecomicrobium*.

Bacterias Gram negativas microaerófilas: *Bdellovibrio*, *Oceanospirillum* y *Flectobacillus*.

Bacterias Gram negativas aerobias: *Halococcus*, *Halobacterium*, *Methylophaga*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Deleya*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Marinomonas*, *Paracoccus*, *Shewanella* y *Halomonas*.

Bacterias Gram negativas anaerobias facultativas: *Serratia*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Listonella*, *Halobacteroides*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfuromonas* y *Desulfovibrio*.

Bacterias Gram negativas quimiolitotrofas: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrosococcus*, *Nitrospina*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrospira*, *Macromonas*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiospira*, *Thiovulum*, *Thiobacterium* y *Achromatium*.

Bacterias metanógenas: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanococcoides*, *Methanogenium*, *Methanomicrobium*, *Methanoplanus* y *Methanosarcina*.

Cocos Gram positivos: *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Marinococcus*.

Bacterias formadoras de endosporas: *Bacillus* y *Clostridium*.

Actinomicetes y bacterias relacionadas: *Actinomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Curtobacterium*.

Spiroquetas: *Crispispira* y *Spirochaeta*.

El principal carácter que define a las bacterias marinas es su halofilia. Sin embargo, éste no es un carácter simple, sino la suma de múltiples adaptaciones fisiológicas, que se refleja en todas las funciones de la célula. Así, la membrana de estas bacterias no resiste la hipotonía, la morfología cambia con las diferencias de salinidad, los enzimas solo son activos a determinada concentración salina y la formación de ácidos nucleicos está sujeta a la salinidad del medio (Castellví, 1972, Rusell & Adams, 1991). No obstante, las bacterias marinas no son las únicas que poseen este carácter, ya que, por ejemplo, se han aislado bacterias con requerimientos salinos en lagos salobres cuya composición química se encuentra muy desviada de la del mar, en salinas y en otros entornos salinos.

Como consecuencia de esto muchos autores han buscado una forma de definir a los organismos halófilos. Así, Shoop en 1935 y Volcani en 1940 (Castellví, 1976) consideran a un microorganismo haloobligado cuando no se desarrolla más que en presencia de una determinada cantidad de NaCl y halotolerante cuando resiste elevadas concentraciones salinas. Sin embargo, estas primeras clasificaciones eran demasiado imprecisas, pues determinadas bacterias con requerimientos salinos, como por ejemplo algunas bacterias de entornos marinos, no crecen en un medio de cultivo con un 3% de NaCl.

Brisou (1980) propone otra clasificación que consiste en:

No halófilos: Crecen en menos de un 1% p/v de NaCl.

Halófilos débiles (Stenohalinos): Tienen su óptimo de crecimiento entre 2-4.5% p/v de NaCl.

Halófilos moderados: Crecen entre un 1 y 9% p/v de NaCl.

Hiperhalófilos: Tienen su intervalo de tolerancia a la salinidad entre el 14 y 35 % p/v de NaCl.

Eurihalinas: Pueden crecer sin dificultad en un intervalo entre 0 y 10% p/v de NaCl.

Halotolerantes : Pueden crecer entre 0 y 20% p/v de concentración de NaCl.

Posteriormente Kushner (1985) propuso la siguiente clasificación, que es la más aceptada en la actualidad:

No halófilos: Crecen en menos de un 1% p/v de salinidad (menos de 0,2 M de sales). Algunos toleran altas concentraciones salinas, se les denomina halotolerantes.

Levemente halófilos: Crecen en medios entre 1% y 3% p/v (0,2-0,5 M) de sal. En este grupo es donde se incluirían las bacterias marinas.

Moderadamente halófilos: Crecen en medios entre 3% y 5% p/v (0,5-2,5 M) de sal.

Muy halófilos: Requieren entre 9% a 23% p/v (1,5-4 M) de salinidad.

Extremadamente halófilos: Crecen en medios muy salinos, como salinas y minas de sal, precisan de un 15% a un 32% p/v (2,5- 5,2 M) de sal.

El carácter de la tolerancia a la salinidad debe ser muy tenido en cuenta a la hora de estudiar las bacterias presentes en los cultivos de microalgas, para distinguir claramente a las bacterias de origen marino de otras que puedan tolerar la salinidad y crecer en el medio enriquecido por las microalgas de un modo oportunista.

1.1.2.-Interacción microalga-bacteria

Los estudios sobre interacción microalga-bacteria en ecosistemas acuáticos y en condiciones de monocultivo son escasos (Cole, 1982); por ello la interpretación de resultados es ambigua y bastante complicada.

Algunos autores han mostrado relaciones de epifitismo, es decir, las bacterias se encuentran adheridas a la superficie del alga (Uriarte *et al*, 1990); otros muestran relaciones complicadas de potenciación y represión del crecimiento del alga, como en el caso de

Porphyridium cruentum (Iqbal *et al*, 1993).

Uno de los problemas que se plantea en este tipo de estudios es como determinar la evolución de las dos poblaciones de un modo simple y que interfiera lo menos posible con el cultivo. Una posibilidad es determinar mediante recuentos totales la evolución de la población total de bacterias y microalgas, y en su caso buscar un sistema que permita distinguir las distintas subpoblaciones bacterianas.

Al tratar con una población monoespecífica de microalgas, determinar la evolución de esta en cultivo es fácil mediante recuentos periódicos en un hematocímetro o con un contador de partículas tipo Coulter Counter. Para determinar el crecimiento de la población total de bacterias, los medios descritos para ello son: a) recuento directo de bacterias mediante microscopía de epifluorescencia, en este caso hay que recurrir a algún tipo de sustancia fluorescente que marque la célula, como Naranja de acridina (Hobbie *et al*, 1977) o DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) (Porter & Feig, 1980), b) recuento en placa de células viables (UFC, unidades formadoras de colonias), o c) mediante un contador de partículas. Sin embargo, tanto en el caso del recuento directo como en el del contador de partículas no se puede distinguir entre las distintas subpoblaciones bacterianas presentes en el cultivo de microalgas. Aunque, en el caso del recuento directo podemos distinguir entre diferentes morfologías celulares, sin embargo la variación morfológica dentro de algunas de las especies presentes, como en el caso de *Alteromonas* sp. (Lebaron & Joux, 1994), impide de cualquier modo emplear este sistema para diferenciar subpoblaciones bacterianas. Con un contador de partículas, aunque discrimina células en función de su tamaño, no es un criterio suficiente, como en el caso anterior, para diferenciar la variabilidad de tamaño existente en una mismo especie, respecto a la de otras subpoblaciones. Además, en ambos sistemas se puede sobreestimar el número de bacterias presentes debido a que se pueden contar las bacterias inviables y agregados de partículas de materia orgánica (Zweifel & Hagstrom, 1995).

El recuento de células viables (APHA, 1985, Buck, 1979, Donnison *et al*, 1993) nos permite distinguir, al menos, entre distintos tipos de colonias. De este modo se puede determinar las tasas de crecimiento de los distintos tipos de colonias bacterianas asociadas a una determinada

cepa de microalgas. Si bien es cierto que este sistema, a diferencia de los anteriores, puede subestimar el número de bacterias, ya que no detecta las células que siendo viables no crecen (Roszak & Colwell, 1987), el método de recuento en placa presenta la ventaja de permitir estudiar la evolución de las poblaciones bacterianas mayoritarias, aunque no permite determinar que sucede con posibles poblaciones con pocos representantes en el cultivo, que debido al factor de dilución no se detectan, y que podrían tener una relevancia importante en el desarrollo del cultivo. Sin embargo, ante la necesidad de escoger un sistema, éste último se consideró como el más apropiado para el presente estudio, del que el objetivo principal es caracterizar la evolución temporal de distintas poblaciones bacterianas asociadas a un cultivo monoespecífico de microalgas.

1.1.3.-Producción de compuestos de posible interés biotecnológico

Las bacterias, a su vez, pueden ser una fuente importante de productos naturales de interés biotecnológico, con amplia aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y química. Pues producen compuestos del tipo de los carotenoides (por ejemplo retinal, precursor de la vitamina A; Stockenius, 1976), lípidos (entre los cuales son de destacar los biosurfactantes; Cooper, 1986, Georgiou *et al*, 1992, Poremba, 1993, Poremba & Gunkel, 1991), antibióticos y proteínas (entre las que se pueden destacar enzimas de interés industrial como las celulolíticas; Tanaka, 1993). Además, el rápido crecimiento de las bacterias y la relativa facilidad de obtención de biomasa, hace que estos microorganismos sean objeto de estudios enfocados a la caracterización y obtención de productos naturales.

En esta memoria se dedica un capítulo al estudio de la pigmentación de una cepa bacteriana que aparece frecuentemente asociada a los cultivos de microalgas marinas, y al estudio de un compuesto tensioactivo producido por una cepa bacteriana presente en algunos cultivos de microalgas.

Pigmentos bacterianos

Existe un gran número de compuestos coloreados obtenidos a partir de seres vivos, conocidos genéricamente como pigmentos, que tienen un gran interés tanto por su función biológica (precursores de vitaminas, fotoprotección, etc.), como por sus aplicaciones industriales como colorantes y antioxidantes.

Las bacterias en general producen una gran variedad de pigmentos, en concreto en algunas bacterias halófilas es bien conocida la producción de retinal, que es un precursor de la vitamina A, derivado del β -caroteno. El retinal es el cofactor de la bacterioruberina, que es un compuesto que en presencia de la luz se excita y es capaz de bombear protones del interior al exterior de la célula, lo que le permite generar poder reductor mediante la acción de la luz (Stockenius, 1976). Existen también otros pigmentos característicos de bacterias halófilas que son derivados de la bacterioruberina (Kelly *et al*, 1970, Norgard *et al*, 1970). Otras bacterias producen otros pigmentos, como por ejemplo, la prodigiosina que es un pigmento de color rojo producido por bacterias del género *Serratia*, pioverdina que es un pigmento amarillo-verde producido por *Pseudomonas aeruginosa*, etc...

Compuestos con propiedades tensioactivas

Otro grupo interesante de sustancias de origen biológico lo constituyen los biosurfactantes, compuestos anfílicos capaces de reducir la tensión superficial e interfacial. Son producidos en las superficies celulares o excretados al medio. Es conveniente distinguir entre biosurfactantes y bioemulsionantes, ya que los primeros poseen capacidad emulsionante a la vez que reducen la tensión superficial del medio, mientras que los segundos únicamente poseen actividad emulsionante, aunque tradicionalmente ambos tipos de compuestos se incluyen en el mismo grupo, es decir, como biosurfactantes (Van Dyke *et al*, 1991).

Bajo la denominación de biosurfactante se encuentra una amplia variedad de compuestos de distinta naturaleza, así pueden ser ácidos micólicos, glicolípidos, complejos lipopolisacáridicos,

lipoproteínas o lipopéptidos, fosfolípidos, e incluso las propias superficies celulares (Cooper, 1986, Van Dyke *et al*, 1991).

La ventaja de estos compuestos frente a sus homólogos sintéticos, es su menor toxicidad y su mayor labilidad (Poremba & Gunkel, 1991, Poremba, 1993), lo que permite que sean fácilmente degradables. De este modo sus aplicaciones industriales son muy prometedoras; así, se pueden aplicar en la degradación de hidrocarburos en suelos, en medios acuáticos, recuperación de aceites, solubilización de pesticidas, dispersión de minerales, y además se pueden usar en la industria textil, farmacéutica y cosmética (Bertrand *et al*, 1993, Van Dyke *et al*, 1991).

1.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

1.2.1.- Identificación de cepas de bacterias asociadas a los cultivos de microalgas marinas

Dada la complejidad de la sistemática bacteriana marina y las propias limitaciones para llevar a cabo determinadas técnicas en el laboratorio, el objetivo inicial fue conocer, al menos, los tipos de bacterias que acompañan a una serie escogida de especies de microalgas en cultivo. Básicamente se pretende comprobar el grado de coincidencia de las poblaciones bacterianas en las distintas especies de microalgas.

Para ello, se realizó inicialmente una prospección entre las distintas especies de microalgas pertenecientes a la colección de cepas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC) (Lubián & Yúfera, 1989). Esta colección incluye una serie de especies de microalgas marinas, pertenecientes a nueve clases de algas, de gran interés en los campos de la acuicultura y biotecnología.

Las cepas bacterianas aisladas fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas que, aunque esenciales, no fueron suficientes para la identificación. La mayor dificultad reside en el hecho de que las bacterias crecen en un medio con un alto contenido en sales, que puede interferir en el resultado de las distintas pruebas de identificación. De hecho es sabido que las sales afectan una prueba tan esencial en microbiología como la tinción Gram, y por ello, siempre durante la realización de esta Memoria se ha tenido en cuenta este hecho, sobre todo cuando se han

empleado kits comerciales, como las galerías de identificación rápida API.

También se han determinado los intervalos de salinidad en los que crecen las bacterias aisladas y, de este modo, poder clasificar las bacterias aisladas, al menos, sobre la base de la tolerancia a la salinidad.

1.2.2.- Interacción microalga-bacteria

El siguiente objetivo perseguido ha sido aportar información sobre el tipo de relación existente entre las poblaciones de microalgas y bacterias acompañantes en cada caso, sobre la base del estudio de las respectivas curvas de crecimiento en un sistema de cultivo controlado.

Para ello se estudió el crecimiento de seis especies de microalgas, representativas de otras tantas clases, y las poblaciones bacterianas asociadas a estas. A partir de los datos obtenidos se compararon las tasas de crecimiento exponencial, los rendimientos total y óptimo del cultivo y las densidades finales de células, tanto para la población de microalgas como de bacterias.

A su vez se determinó la evolución de nutrientes del cultivo, para poder fijar los efectos de las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono de que disponen las algas y las bacterias.

Por último, con objeto de determinar la posible dependencia de las microalgas y sus bacterias asociadas, se estudió el crecimiento de tres de las especies de microalgas en cultivos axénicos mediante el uso de antibióticos.

1.2.3.-Estudio de compuestos de posible interés biotecnológico

1.2.3.1.- Estudio de la composición pigmentaria de *Alteromonas* sp. aislada a partir de cultivos de microalgas.

Uno de los tipos bacterianos aislados más fácilmente reconocible, e identificado como *Alteromonas* sp., forma colonias de color rojo, cuya intensidad varía según las condiciones de cultivo. Esta observación y el hecho ya mencionado del interés existente por los pigmentos de origen biológico, condujeron a considerar su estudio bajo un doble objetivo:

- a) Caracterizar la composición pigmentaria de una de las cepas aisladas de *Alteromonas*

sp. e identificar con todos los medios a nuestro alcance, al menos, el o los pigmento/s responsable/s de la coloración de la bacteria. Se utilizaron para ello tanto ensayos químicos como técnicas instrumentales analíticas apropiadas.

b) Cuantificar la producción de pigmentos y su variación, en función de la fuente de carbono, las condiciones de agitación-aireación de los cultivos y la concentración de oxígeno en el medio de cultivo.

1.2.3.2.- Estudio de un agente tensioactivo purificado a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, aislada de cultivos de microalgas marinas

De manera similar a la descrita en el apartado anterior, la presencia en algunos cultivos algales de una bacteria, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, que secreta un compuesto con propiedades tensioactivas, ha despertado una especial atención en este caso. Existe una amplia bibliografía sobre este tipo de compuestos en el mundo bacteriano, incluida *P. aeruginosa* (Abu-Ruwaida *et al*, 1991, Banat, 1993, Cooper, 1986, Cooper & Goldenberg, 1987, Cooper & Paddock, 1984, Cooper *et al*, 1979, Georgiou *et al*, 1992, Guerra-Santos *et al*, 1984, Poremba, 1993, Poremba & Gunkel, 1991, VanDyke *et al*, 1991, 1993, Vater, 1986). El aspecto significativo, que propició esta parte del estudio fue que, por primera vez, se había obtenido una cepa de esta bacteria que crecía en condiciones óptimas en un medio cuya composición salina era agua de mar, Por ello, la investigación desarrollada se encaminó en una doble vertiente:

a) Purificar e identificar el compuesto tensioactivo.

b) Cuantificar su producción en función de la fuente de carbono existente en el medio y de la salinidad.

2.1.- PROCEDENCIA Y DESCRIPCIÓN DE LAS MICROALGAS ESTUDIADAS

2.1.1.-Procedencia de las microalgas

Las microalgas empleadas en esta memoria procedían de la Colección de Microalgas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN) (CSIC) (Lubian & Yúfera, 1989).

2.1.2-Descripción de las microalgas estudiadas

Las seis microalgas escogidas en esta memoria varían en muchas de sus características, como se verá a continuación. En la tabla 2.1 se muestran los diferentes volúmenes celulares de las seis especies escogidas; como se puede apreciar, existe una amplia variedad de tamaños celulares entre estas seis especies, lo que se puede considerar ya un aspecto diferenciador a destacar bajo el punto de vista del estudio que se aborda.

Tabla 2.1: Volúmenes relativos de las seis microalgas estudiadas, obtenidos a partir de Lubián y Yúfera (1989) y Cañavate (1995).

Alga	Volumen
<i>R. salina</i>	301,9 μm^3
<i>T. suecica</i>	230,4 μm^3
<i>P. cruentum</i>	220,9 μm^3
<i>C. calcitrans</i>	76,7 μm^3
<i>I. galbana</i>	67,1 μm^3
<i>N. gaditana</i>	10,6 μm^3

Tetraselmis suecica (Kyllin) Butcher

T. suecica pertenece a la clase Prasinophyceae = Micromonadophyceae, anteriormente estuvo incluida en el género *Platymonas* y es una especie de gran valor nutritivo para larvas y adultos de bivalvos, así como para larvas de crustáceos. Debido a la facilidad de su cultivo, es una

de las especies de uso más extendido en acuicultura (De Pauw & Persoone, 1988).

Esta microalga marina móvil se clasificó en un principio dentro de la clase Chlorophyceae, pero actualmente se engloba dentro de las Prasinophyceae (Stewart, 1974), clase que se encuadra a su vez dentro de la división Chlorophyta. Esta separación se justifica por su producción de manitol, al igual que las algas pardas, y por ser su fisiología distinta. Presenta sifonaxantina y el éster de este pigmento, la sifoneína (que se presenta únicamente en este grupo y en las algas verdes sifonadas).

La forma de la célula es elipsoidal y lateralmente comprimida. Es de color verde, debido a la presencia de clorofilas *a* y *b*. Mide entre 7-10 μm de diámetro, tiene una membrana celular delgada y presenta cuatro flagelos plumulosos, con la raíz flagelar cruzada, tipo 4-2-4-2. Como sustancia de reserva emplea el almidón. En general presenta caracteres muy antiguos, como la inserción de los flagelos en una fosa (Lee, 1989).

Los cuerpos celulares discernibles son: un estigma de color rojo, un cromatóforo verde y un cuerpo pirenoidal que se encuentra generalmente en una posición basal.

La reproducción ocurre por fisión longitudinal de las células, momento en el que las células pierden el estado móvil; en este estado inmóvil, las células pueden observarse completamente flageladas antes de quedar libres. No se conoce su reproducción sexual. Puede crear quistes bajo condiciones adversas (envejecimiento del cultivo, pH menor que 6 o mayor que 9). Los quistes liberan cuatro células hijas que pueden permanecer latentes durante meses.

Las células presentan fototactismo positivo. Es fácil observar en los cultivos restos de tecas y flagelos. La teca está formada por polisacáridos neutros o ácidos, asociados a ciertos aminoácidos (glicoproteínas).

Los requerimientos nutritivos de *Tetraselmis* son simples. Puede utilizar amonio, urea, nitratos y aminoácidos como fuente de nitrógeno, y no requiere vitaminas. Soporta temperaturas entre 2 y 35°C, y un amplio intervalo de salinidades (Regan, 1988). Es muy competitiva en cultivos mixtos.

Isochrysis galbana Parke

I. galbana pertenece a la clase Prymnesiophyceae (= Haptophyceae), con los clones *I. galbana* Parke e *I. aff. galbana* (clon T-Iso), es una especie de gran interés por su alto contenido en ácido decosahexanoico (DHA 22:6), lo que la capacita como fuente alternativa de DHA en dietas humanas (Burguess *et al.*, 1993 en Otero, 1994). El clon *I. galbana* Parke presenta, además de DHA, un contenido considerable de ácido eicosapentanoico (20:5, EPA), pudiendo constituir hasta el 32% del total de lípidos (Molina Grima *et al.*, 1992 en Otero, 1994).

Son células móviles, con dos flagelos acronemáticos anteriores de igual longitud. Están cubiertas de escamas circulares que están embebidas en una matriz mucilaginosa, y solo son detectables mediante microscopía electrónica. El orden al que pertenecen (Isochrysidales) se caracteriza por poseer un haptonema muy reducido, a veces inexistente.

La mayor parte de la literatura disponible sobre esta microalga está referida al clon T-Iso (*I. aff. galbana*, UTEXCB2307) (Sukenic & Wahnou, 1991), que presenta características de crecimiento y composición bioquímicas distintas a las descritas para *I. galbana* Parke (Whyte, 1987; Ewart & Pruder, 1981), por lo que los resultados obtenidos con ambas cepas no son totalmente comparables. Así, por ejemplo, en *I. galbana* Parke un incremento de luz produce un descenso en el contenido total de PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) pero no de DHA, que se mantiene estable, lo que no ocurre en el clon T-Iso. La variabilidad en la composición bioquímica también se manifiesta de forma intraespecífica en *I. galbana* Parke (López-Alonso *et al.*, 1992). Hay una gran variedad de resultados en cuanto a la composición porcentual de ácidos grasos, probablemente debida a las diferencias entre métodos de cultivo y fase de crecimiento analizada; esto explicaría las diferencias de criterio en cuanto al valor nutricional de estas especies para su utilización en acuicultura.

La composición pigmentaria está constituida principalmente por clorofilas *a*, *c*₁ y *c*₂ (Lee, 1989) y los carotenoides β -caroteno, fucoxantina y algunos derivados diadinoxantina y diatoxantina.

Porphyridium cruentum (S.F. Gray) Näg

Esta microalga pertenece a la clase Rhodophyceae, es sinónimo de *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross. Fue aislado por primera vez por Kufferath, en 1912 (Lee, 1989).

Se pueden encontrar representantes de este género en aguas dulces, salobres y marinas, e incluso en ambientes terrestres. No tienen paredes con estructura fibrilar; en cambio, poseen una envuelta mucilaginosa compuesta de un polisacárido sulfatado polianiónico hidrosoluble, que es producido copiosamente durante la fase estacionaria.

Son algas esféricas con un diámetro aproximado de 7-8 μm . Se reproducen por divisiones celulares. Se conoce también su reproducción mediante monosporas. Es frecuente que presenten un movimiento ameboide, con fototactismo positivo. Las células que son móviles están polarizadas, presentando una vesícula de contenido fibrilar en la parte posterior. Posiblemente, esta vesícula está relacionada con la producción de un rastro de mucílago. *P. cruentum* soporta un intervalo bastante amplio de luz (Lee, 1989). Al incrementar la intensidad de la irradiancia, se reduce el tamaño del cloroplasto y se incrementa el contenido granular de las células. En oscuridad puede utilizar azúcares como fuente de carbono.

A partir de estas algas se pueden obtener varios productos de interés comercial, como ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosapentanoico), que llega a conformar el 36% del total del contenido de lípidos de *P. cruentum*. También se obtienen polisacáridos con propiedades gelificantes y pigmentos del tipo de las ficocianinas y ficoeritrinas (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Estos últimos pigmentos conforman el patrón pigmentario característico de las Rhodophyceae, junto con clorofilas *a* y *c*, y como carotenoides luteína, zeaxantina y β -cryptoxantina, además de α - y β - caroteno.

Chaetoceros calcitrans (Paulsen) Takano

Esta microalga pertenece a la clase Bacillariophyceae (= Diatomophyceae). Existe una enorme complejidad en las descripciones y taxonomía de las distintas formas de *C. calcitrans*. Así, se consideran formas relacionadas y se agrupan bajo el mismo tipo, aún dudándose de si son la misma especie, *C. tenuissimus* Meunier, *C. galvestonensis* Collier & Murphy, *C. calcitrans* fo. *pumilus* Takano, y *C. simplex* var. *calcitrans* Paulsen (renombrado por Takano como *C. calcitrans*).

Las diatomeas se caracterizan por la presencia de una cápsula protectora silicea, el frústulo, constituido por dos partes, las tecas (epi- e hipoteca). Cada teca se compone de una placa más o menos aplanada, abombada o deprimida, la valva, que está rodeada por una banda conectiva lateral, el *cingulum*. Los dos grandes grupos de diatomeas, pennales y centrales, se diferencian por la forma general del frústulo y la naturaleza y localización de sus principales estructuras. Básicamente, las diatomeas poseen frústulos de formas elípticas a circulares, con las ornamentaciones dispuestas con respecto a un punto central. Presentan reproducción sexual oogámica. Los cloroplastos se encuentran en un número variable. El principal producto de reserva de las diatomeas es la crisolaminarina.

El género *Chaetoceros* es extremadamente polimorfo y taxonómicamente muy diversificado. Es típicamente plantónico, siendo el género más representado en todos los mares del planeta, con sólo dos especies dulceacuícolas. Comprende formas unicelulares o coloniales, reunidas en cadenas más o menos largas por el entrecruzamiento de las sedas, y a veces englobadas por un gel mucilaginoso. Las valvas son planas, ligeramente cóncavas o convexas, con un manto vertical más o menos desarrollado. El *cingulum* es corto, con una banda conectiva y numerosas bandas intercalares; a veces presentan un *sulcus*. Las sedas, más o menos largas, están situadas por parejas en el ápice de cada valva. Las sedas terminales de las formas coloniales son a menudo diferentes de las intermedias, más robustas y/u orientadas de distinta forma. Las sedas aumentan el área superficial, proporcionando una mayor relación superficie/volumen, lo que aumenta a su vez la capacidad de flotación de estas diatomeas plantónicas. La cara valvar suele llevar una red de costillas radiales, divergentes a partir de un campo central hialino. El frústulo,

sin ornamentación aparente, está poco silicificado. Generalmente presentan hipnosporas y quistes con paredes muy fuertemente silicificadas. Se puede producir más de un tipo de quistes durante el ciclo vital de esta alga (Hollibaugh *et al.*, 1981).

Los pigmentos descritos para *C. Calcitrans* son, clorofila *a*, *c*₁ y *c*₂, β-caroteno, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina.

C. calcitrans es considerada como una microalga de valor alimenticio en acuicultura (Yúfera & Lubián, 1990). Se ha propuesto también como una fuente de EPA (Regan, 1988).

Nannochloropsis gaditana Lubián

N. gaditana pertenece a la clase Eustigmatophyceae. En un primer momento este alga estuvo considerada dentro del género *Nannochloris* (Chlorophyceae) por sus caracteres morfológicos (Lubián, 1979). Estudios posteriores de ultra estructura y composición pigmentaria determinaron su incorporación a la clase Eustigmatophyceae, establecida por Hibberd y Leedale (1970, 1971, 1972); y pasó a ser de este modo *Nannochloropsis gaditana* Lubián (1982). Actualmente se integra dentro de la familia Monopsidaceae, junto con *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloropsis salina* Hibberd y *Nannochloropsis granulata* Karlson et Potter sp. nov..

N. gaditana presenta, al microscopio óptico, una forma esférica ligeramente arriñonada, de 2 a 4 μm de diámetro, y con un único cloroplasto ocupando gran parte de la célula. Es inmóvil, desprovista de flagelos y con una pared celular muy gruesa de una sola capa. No presenta pirenoides, y la reproducción se produce por fisión binaria, careciendo de zoosporas (Lubián, 1979). Se desconoce si tiene reproducción sexual.

La composición pigmentaria de *N. gaditana* obedece a la encontrada en el resto de las Eustigmatophyceae; es decir, posee clorofila *a*, β-caroteno, cantaxantina, violaxantina, vaucherixantina y neoxantina (Lubián y Establier, 1982).

Rhodomonas salina (Wislouch) Hill & Wetherbee

Esta microalga pertenece a la clase Cryptophyceae, es un género típico de aguas marinas, fácil de reconocer al microscopio óptico, y que se cultiva sin dificultad en el laboratorio. Fue propuesto por Karsten (1898), estableciendo como especie tipo a *Rhodomonas baltica*. A partir de entonces, el estatus taxonómico del género ha sido revisado y modificado por varios autores, invalidando su descripción y transfiriendo distintas especies a los géneros *Cryptomonas*, *Hillea*, *Chroomonas* (Butcher, 1967) y *Pyrenomonas* (Santore, 1984). De todos modos, este último acepta la necesidad de estudios más completos para establecer finalmente si el género *Rhodomonas* debe mantenerse o ser eliminado. Finalmente, Hill y Wetherbee (1989) restauran la validez del género *Rhodomonas* sobre la base de un estudio comparativo de su ultraestructura. Estos autores reconocen cuatro especies de *Rhodomonas*: *R. baltica*, *R. salina*, *R. maculata* y *R. duplex*, que se diferencian por la longitud celular, el tamaño del surco, la forma y disposición del cloroplasto y la estructura del periplasto.

R. salina (Wislouch) fue identificada en 1924 como *Cryptomonas salina*, Butcher (1967) la transfirió al género *Chroomonas* y Santore (1984) al género *Pyrenomonas*, hasta que Hill y Wetherbee (1989) la clasifican definitivamente como *R. salina*.

Son organismos unicelulares biflagelados, de forma ovoidal y un tamaño que puede oscilar entre 10 y 40 μm de longitud. La simetría de su forma se rompe por la presencia de una estructura en posición subapical denominada citofaringe, y que define la cara ventral de la célula. Consiste en una invaginación de la pared celular constituida por un vestíbulo (depresión donde se insertan los flagelos), que se transforma posteriormente en un surco corto y termina en una estructura tubular ligeramente curvada, denominada gullet. Posee dos flagelos que emergen de la citofaringe, que son homodinámicos y de longitud ligeramente diferente, con dos hileras de mastigonemas en el flagelo mayor y una única hilera en el menor.

Al igual que el resto de los miembros de la clase Cryptophyceae, posee una cubierta celular proteica, denominada periplasto, constituida por placas que en el género *Rhodomonas* son de forma más o menos rectangulares, cuya disposición, junto con la estructura de la citofaringe, constituyen los principales criterio de clasificación. Otra estructura característica de la clase es los

eyectonemas o tricocistes.

Su complejo plastidial presenta un único cloroplasto en forma de "H", con tilacoides emparejados que no penetran en la matriz de un pirenoide central. A su vez, presentan un nucleomorfo, que consiste en una evaginación del citoplasma periplastidial que divide en dos al pirenoide, y un núcleo en posición posterior a la zona de interconexión entre los lóbulos plastidiales.

La composición de pigmentos está constituida por clorofilas *a* y *c*, α - y β -caroteno, como carotenoide mayoritario y otros como, alloxantina, diadinoxantina, criptoxantina y manixantina, además posee ficoeritrina, esta última distribuida a nivel del lumen intertilacoidal, sin organizarse en ficobilisomas (Ingram & Hiller, 1982, McColl, 1976, Lewitus & Caron, 1990, 1991), y que le da su característico color rojo.

2.2.- CULTIVO DE MICROALGAS

2.2.1.-Condiciones de cultivo y medida del crecimiento

Como medio de cultivo para las microalgas se empleó agua de mar procedente de la bahía de Cádiz, filtrada a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 1,2 μm de diámetro de poro, esterilizada en autoclave (121°C, 1.5 Kg/cm², 15 minutos) y enriquecida con la solución f/2 de Guillard (Guillard & Ryther, 1962) modificada (Tabla 2.2).

Los cultivos experimentales se realizaron en matraces esféricos de fondo plano de 1 L, con aireación continua mediante tubos de vidrio y sin adición de medio fresco durante el tiempo de la experiencia (cultivo "Batch"). Los cultivos se han ubicado en una cámara isotérmica a 20°C de temperatura e iluminación constante de 75 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes tipo OSRAM Daylight L36W/10.

Los inóculos utilizados en la siembra provenían de "cultivos madre", crecidos previamente en las mismas condiciones que los experimentales. Se hicieron siempre dos series de experimentos, alto y bajo inóculo, habiendo una diferencia de densidad de células inicial entre ambos, de un orden de magnitud

Tabla 2.2 Composición final del medio de cultivo
f/2 de Guillard y Ryther (modificado).

Componente	Proporción
NaNO ₃	150 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	10 mg
EDTANa ₂ ·2 H ₂ O	4.36 mg
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	3.15 mg
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	10 µg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	22 µg
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	10 µg
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	180 µg
Na ₂ Mo ₄ ·.2 H ₂ O	6 µg
Vit. B ₁₂	10 µg
Vit. B ₁	200 µg
Agua de mar filtrada y esterilizada	1000 mL

Para medir el crecimiento de la población de microalgas, a lo largo del tiempo, se tomaron muestras cada 24 horas durante los 5 primeros días de cultivo, y posteriormente se tomaban muestras a las 168, 240 y 336 horas (días de cultivo 8, 11 y 15 respectivamente).

En cada día de muestreo se extrajeron del cultivo (bajo condiciones de asepsia) 10 mL, que se emplearon para la determinación de la densidad de cultivo de microalgas y bacterias, y evolución de los nutrientes en el periodo de los 15 días que duraba la fase experimental del cultivo.

La densidad celular se determinó mediante el recuento de alícuotas al microscopio en un hematocimetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Esta cámara es adecuada para el recuento de células de un tamaño comprendido entre 2 y 30 µm y una densidad celular de 5×10^4 y 10^7

células/mL (Guillard, 1973). Cuando la densidad del cultivo sobrepasó estos límites, el recuento se llevó a cabo sobre muestras convenientemente diluidas. El error de estimación está comprendido entre el 5 y 10%, con un límite de confianza del 95% (Lund *et al.*, 1958).

Antes del recuento la muestra se fijó en formol al 50%, excepto en el caso de *Rhodomonas salina*, que se fijó con una mezcla de agua, formol y glicerol (6:2:2), para evitar la lisis celular. Todos los recuentos se realizaron en un plazo máximo de 72 horas.

2.2.2.-Cálculo de los parámetros de crecimiento: Tasa exponencial y rendimiento del cultivo

El crecimiento de un cultivo cuyo volumen permanece constante y sin renovación del medio, se puede describir mediante una curva logística en la que se pueden distinguir hasta cuatro fases: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial, fase de retardo y fase estacionaria.

A partir de la representación de la variación del logaritmo del tamaño de la población a lo largo del tiempo, se delimita el tramo de la curva correspondiente a la fase de crecimiento exponencial. Mediante una regresión lineal se calcula el valor de la pendiente de dicho tramo, que corresponde a la tasa de crecimiento exponencial (μ) y que viene dada en unidades de t^{-1} . El tiempo de generación se calcula aplicando la expresión $T_g = \ln 2 / \mu$.

El rendimiento de los cultivos se puede definir como el incremento de la densidad de células de un volumen de cultivo fijo en un intervalo de tiempo determinado:

$$R = (D_{t_1} - D_{t_0}) \cdot \text{vol} / t$$

Donde R: es el rendimiento, D_{t_1} : densidad final, D_{t_0} : densidad inicial, vol: volumen de cultivo y t: tiempo transcurrido. A partir de esta definición, dependiendo del intervalo de tiempo empleado se ha distinguido entre: **Rendimiento total**: el rendimiento obtenido entre inicio del cultivo y el fin del mismo; **Rendimiento óptimo**: el rendimiento mayor obtenido al determinar el incremento de células entre el inicio del cultivo y los distintos momentos de toma de muestra; y por último, **Rendimiento máximo**: el rendimiento mayor obtenido entre dos instantes consecutivos de la toma de muestras del cultivo.

2.2.3.-Consumo de nutrientes

Al trabajar en un sistema cerrado, es de gran interés conocer la evolución de los nutrientes a lo largo del tiempo de cultivo. Para ello se analizaron en un Autoanalizador de flujo segmentado TRAACS-800, en el Servicio de Análisis del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), la evolución de fosfatos, nitritos y nitratos, y el carbono orgánico disuelto (COD).

El método para la determinación de los nutrientes, según este método, se basa en la formación cuantitativa de algún compuesto coloreado y su posterior medida espectrofotométrica. En concreto, el nitrito se determina añadiendo sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamida que provocan la formación de un compuesto azo coloreado, midiéndose la intensidad del color desarrollado a 540 nm. El nitrato se determina tras la reducción previa del mismo a nitrito, mediante el paso a través de una columna rellena de una amalgama de Cd y Cu. Para el fosfato, el método consiste en la formación de un complejo de fosfomolibdato que se reduce a un compuesto azul fuertemente coloreado, midiéndose espectrofotométricamente a 880 nm. El COD se determina mediante un método basado en la oxidación por vía húmeda de la materia orgánica presente en la muestra de agua. Tras eliminar el carbono inorgánico, la oxidación se realiza por irradiación con una lámpara de U.V. en presencia de persulfato. El CO₂ resultante de la oxidación del carbono orgánico es dializado en continuo a una solución tamponada de fenolftaleína, midiéndose espectrofotométricamente la decoloración que se produce (Arjonilla *et al*, 1993).

2.2.4.-Tratamientos con antibióticos

Diversos cultivos de microalgas fueron tratados con antibióticos, para axenificarlos y estudiar su crecimiento en estas condiciones para, como se ha dicho anteriormente, intentar profundizar en lo posible en el tipo de relación que se establece entre la población de microalgas y sus bacterias acompañantes.

Para esto se emplearon las soluciones antibióticas de Guillard y Provasoli, que cuentan con una formulación comercial en Sigma Chemical Co. La composición de la solución de Guillard es: 16.250 U de *penicilina G sódica*, 5 mg de *estreptomicina sulfato* y 2 mg de *cloranfenicol* (por mL, en 0.9 % NaCl). La composición de la solución de Provasoli es: 12.000 U de *penicilina G sódica*, 50 mg de *cloranfenicol*, 300 U de *polimixina B sulfato* y 60 mg de *neomicina sulfato* (por mL, en 0.9 % NaCl).

A su vez se utilizó una solución antibiótica de amplio espectro, para ensayar una solución con modificaciones respecto a las formulaciones comerciales empleadas, que consiste en: 7 mg/mL de *cloranfenicol*, 7 mg/mL de *neomicina* y 7 mg/mL de *amoxicilina*.

Otro antibiótico utilizado en esta memoria han sido la *anisomicina* que afecta a las arqueobacterias, impidiendo su crecimiento, por lo que resulta, que hacer crecer a las bacterias en este antibiótico es un buen criterio para la identificación de arqueobacterias (Oren, 1991).

2.3. Cultivos de bacterias

2.3.1.-Medios de cultivo

A lo largo de este trabajo se han ensayado diversos medios de cultivo para el aislamiento, enriquecimiento y mantenimiento de las cepas aisladas.

En principio se probaron los medios de cultivo descritos en la bibliografía para bacterias heterótrofas marinas, como el medio para bacterias halófilas descrito por Ventosa *et al* (1982) (Tabla 2.3), o el medio descrito por ZöBell en 1941 (Austin, 1988) (Tabla 2.3). Este último posee una fórmula comercial, el Marine Agar 2216 de Difco. A su vez, se probó el uso de agua de mar, como base salina, diluyendola con un 25% de agua destilada, y enriqueciendola con 0,1% (p/v) de extracto de levadura, 0,5% (p/v) de proteasa peptona y 1,5% de agar (Colección Española de Cultivos Tipo, 1990). Por último, se ensayó el medio AMAEB, diseñado por nosotros y descrito en la tabla 2.3., que ofreció unos resultados muy similares a los del Marine Agar 2216 de Difco.

Para el aislamiento de bacterias heterótrofas marinas asociadas a los cultivos de microalgas, los medios más empleados han sido el Marine Agar 2216 de Difco y el medio AMAEB.

El enriquecimiento y la producción de cultivos bacterianos, se ha llevado a cabo en los medios líquidos Marine Broth de Difco, con la misma formulación que el Marine Agar 2216, y AMAEB sin agar; ambos mostraron la misma eficiencia y han sido utilizados indistintamente.

Para el estudio de los intervalos de tolerancia de las bacterias a la salinidad se emplearon soluciones diluidas a partir de un "stock salino" al 28% (p/v) de sales, cuya composición se

muestra en la tabla 2.4. Se prepararon soluciones de salinidad: 0%, 0,5%, 1%, 3,5%, 8%, 16% y 20%.

Tabla 2.3: Composición de los medios de cultivo descritos por ZöBell, Ventosa *et al.*(1982), y AMAEB.

Componente	Proporción	Proporción (%P/V)	Proporción
	(%P/V) Medio ZöBell 2216E	Bacterias Marinas Ventosa <i>et al.</i> (1982)	(%P/V) AMAEB
Proteasa-peptona	0,5	0,5	0,5
Extracto de levadura	0,1	1	0,1
Nitrato de amonio	0,00016	----	----
Ácido bórico	0,0022	----	----
Cloruro cálcico	0,18	----	0,01
Fosfato disódico	0,0008	----	----
Citrato férrico	0,01	----	0,01
Cloruro de magnesio	0,88	0,39	0,4
Bromuro potásico	0,008	----	----
Bromuro sódico	----	0,007	0,007
Cloruro potásico	0,055	0,06	0,06
Bicarbonato potásico	0,016	0,002	0,002
Cloruro sódico	1,945	2,34	2,43
Fluoruro sódico	0,00024	----	----
Silicato sódico	0,0004	----	----
Sulfato sódico	0,0324	----	----
Sulfato de magnesio	----	0,61	0,63
Cloruro de estroncio	0,0034	----	----
Glucosa	----	0,1	----
Agar	1,5	1,5	1,7
pH~7,2			
Esterilizado a			
121°C/15min			

En todos los casos que se empleó algún medio comercial, como los empleados para la caracterización de las bacterias aisladas, se prepararon con una solución al 3,5% de la solución salina stock, para evitar la inhibición del crecimiento provocado por los cambios en la salinidad.

Tabla 2.4: Composición de sales del stock salino

Componente	Proporción % (p/v)
Cloruro sódico	1,95
Sulfato de magnesio hepta hidratado	0,506
Cloruro de magnesio hexa hidratado	0,325
Cloruro potásico	0,050
Cloruro cálcico dihidratado	0,008
Bromuro sódico	0,0058
Bicarbonato sódico	0,0016

2.3.2.-Condiciones de cultivo y medida del crecimiento

Los cultivos de bacterias se llevaron a cabo a 35°C (temperatura óptima de crecimiento), aunque se ensayaron otras temperaturas, que fueron 4°, 20°, 30°, 37° y 45°C. Los tiempos de cultivo variaron entre 24 y 168 horas. Algunas cepas bacterianas aisladas se mantuvieron en condiciones de luz y oscuridad, para determinar el posible efecto de la luz sobre el crecimiento de estas (Stoeckenius, 1976).

Para determinar la densidad celular se utilizó el método de recuento directo de células viables (unidades formadoras de colonias, UFC) (Buck, 1979, APHA, 1985, Donnison, 1931).

El crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a las microalgas se determinó a partir de las muestras de microalgas tomadas, como se ha indicado anteriormente (apartado

2.2.1). Las curvas de crecimiento de cultivos bacterianos puros se han obtenido tomando muestras cada 2 horas durante las primeras 24 horas y cada 3 durante las siguientes 24 horas.

2.3.3.-Volúmen y biomasa celular

Dada la dificultad para obtener por separado datos de estimadores de la biomasa microalgal y bacteriana (como por ejemplo, peso seco, contenido de carbono total, etc), se ha recurrido a relacionar los biovolúmenes de las dos poblaciones en cada caso. Conocidos los volúmenes celulares en cada especie algal (tabla 2.1), se ha estimado un volumen celular bacteriano medio de $0,05 \mu\text{m}^3$, teniendo en cuenta los valores descritos en la bibliografía para bacterias marinas (Manual Bergey, 1989, Lee *et al*, 1987). La relación entre biovolúmenes, expresada como porcentaje del biovolumen bacteriano (Bv) respecto al de las microalgas, se calculó mediante la fórmula $Bv (\%) = [(N_b \times V_b) / (N_a \times V_a)] \times 100$, donde Bv(%) es la tasa de biovolumen en tanto por ciento, N_b es el número total de bacterias, V_b es el biovolumen bacteriano, N_a es el número total de algas y V_a es el biovolumen algal.

2.4.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

2.4.1.-Aislamiento y obtención de cultivos puros

A partir de la colección de microalgas se han aislado diversas cepas bacterianas mediante siembras en placas de Petri de alícuotas de $100 \mu\text{L}$ de cultivo de microalgas. El medio de cultivo empleado fue Marine Agar 2216 de Difco, al que se añadieron 7 mg de cicloheximida con el fin de evitar el posible crecimiento de algas y sobre todo de hongos. De este modo se obtuvo una masa bacteriana procedente del cultivo de microalgas, a partir de la cual se seleccionaron las colonias claramente diferenciadas. A partir de estas se realizaron siembras en estría, hasta conseguir aislar colonias individuales, y de este modo obtener un cultivo puro.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se mantienen en los medios de cultivo antes indicados a 4°C , y renovándose cada 3 o 4 meses. A su vez, las cepas bacterianas se mantienen

congeladas a -80°C .

2.4.2.-Caracterización de las cepas bacterianas

Para caracterizar las cepas bacterianas procedentes de los cultivos de microalgas se realizaron una serie de pruebas bioquímicas esenciales.

En primer lugar, se consideró conveniente realizar la tinción Gram para determinar la forma bacteriana y sobre todo la pureza del cultivo. Aunque presenta serios problemas en aguas salinas. Por ello, también se empleó la técnica descrita por Buck (1982) para la determinación del Gram mediante un tratamiento con potasa (KOH). El procedimiento consiste en resuspender en una gota de una solución de KOH al 3% (p/v) una colonia bacteriana, si en un plazo de 5-60 segundos la solución se vuelve viscosa las bacterias son Gram negativas, si por el contrario se mantiene líquida la cepa es Gram positiva; este procedimiento es más eficaz para la determinación del Gram en agua de mar debido a que las sales no interfieren.

También se han realizado los ensayos siguientes: actividad oxidasa (Spot test oxidase reagent, Difco y Oxidase test, Biomerieux); nitrito y nitrato reducción (Spot test Nitrite reagent A, B, C, y Nitrite strips, Difco); test de la sulfato reducción (Bacto H_2S test strips, Difco); Catalasa; actividad ADNasa (DNASE test agar, Difco); degradación del almidón (Starch agar, Difco); crecimiento en medio MacConkey (Difco); oxidación-fermentación con Bacto OF Basal Medium; movilidad de las bacterias con el medio descrito por Tittsler y Sandholzer en 1936 (Manual Difco, 1984).

Además se han empleado los sistemas de identificación rápida para bacterias Gram negativas, API 20NE (no enterobacteriaceas) y API 20E (enterobacteriaceas), de Biomerieux. Debido al posible efecto de las sales de los medios de cultivo, se comprobó que las identificaciones positivas eran válidas. Para ello se utilizó la cepa bacteriana TCOR3, que es capaz de crecer en un intervalo de salinidad de 0-8% y que se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*

empleando las galerías de identificación rápida según el protocolo descrito por el fabricante y empleando una solución salina al 3,5%, obteniéndose los mismos resultados de ambas formas.

A su vez, como se trata de bacterias procedentes de un entorno marino, se han determinado los intervalos de salinidad tolerados por las cepas bacterianas aisladas. El intervalo de salinidad elegido fue entre 0% y 20%(p/v); los medios de cultivo se obtuvieron mediante dilución del stock salino (tabla 2.4). La prueba es considerada positiva si se observa crecimiento a las 24 o 48 horas, y negativa en caso contrario.

Como método de identificación de las posibles arqueobacterias, se hizo crecer las cepas bacterianas en presencia del antibiótico *anisomicina*, que es selectivo con las arqueobacterias inhibiendo su crecimiento (Oren, 1991); de este modo se puede determinar la presencia de este grupo bacteriano entre las distintas cepas aisladas.

2.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos de crecimiento de las microalgas y bacterias han sido sometidos a un análisis multifactorial de la varianza, aplicando un test de Scheffé para ver las diferencias significativas entre los parámetros que definen el crecimiento, con un intervalo de confianza del 95%, en las distintas condiciones de cultivo.

Para la formación de los posibles clusters de bacterias y algas-bacterias, se aplicó el paquete estadístico BMDP 2M. Para determinar cuáles eran los factores con mayor peso entre las distintas cepas bacterianas, y de este modo obtener un criterio para generar los clusters, para ello se aplicó el paquete estadístico BMDP 4M de Análisis de Factores.

2.6.- ANÁLISIS DE PIGMENTOS EN *Alteromonas* sp., AISLADA DE CULTIVOS DE MICROALGAS.

2.6.1.-Extracción con distintos disolventes

Los disolventes ensayados han sido: agua, metanol, n-hexano, éter de petróleo, éter dietílico, acetona, etanol, benceno, N,N-dimetilformamida (DMF), diclorometano y triclorometano. Los disolventes orgánicos, triclorometano y diclorometano fueron los mejores extractantes, mientras que DMF, acetona y piridina mostraron una moderada eficacia para la extracción. Metanol, etanol y éter de petróleo han resultado totalmente inapropiados para obtener el extracto crudo total, si bien se han podido utilizar como solventes de los distintos pigmentos una vez purificados.

Ensayados los distintos extractantes, finalmente se ha empleado el siguiente protocolo de extracción:

- 1.- Se cultivan las bacterias en medio líquido, durante 48 horas.
- 2.- Se centrifuga el cultivo 30 minutos a 3500 rpm.
- 3.- Se desecha el sobrenadante y se lavan las células con una solución isotónica de formiato amónico al 0,9% (P/V). En cada uno de los pasos de lavado se centrifuga durante 15 minutos a 4100 rpm. En el último centrifugado, se desecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en triclorometano.
- 4.- Se sonica la mezcla hasta que toma un color homogéneo (rosa suave), teniendo la precaución de mantener la temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente.
- 5.- Se centrifuga el homogeneizado a 4100 rpm durante 3 minutos.
- 6.- Se recoge la fase orgánica (primer extracto) y se reserva el pellet, que se trata con acetona en frío para precipitar los péptidos presentes en el exopolímero y que aún retienen una parte importante del pigmento. Se deja durante una noche a -20°C para la extracción completa.
- 7.- Al día siguiente se decanta el sobrenadante, del que se extraen los pigmentos con éter dietílico (segundo extracto); se lava varias veces con una solución salina saturada y se seca con SO_4Na_2 .
- 8.- Finalmente los extractos se evaporan y resuspende el residuo seco en el disolvente apropiado,

obteniéndose de este modo el extracto total.

2.6.2.- Separación de pigmentos

2.6.2.1.-Cromatografía en capa fina (TLC)

Se ha realizado en placas preparadas Polychrom SIF₂₅₄(Cf 350) (Scharlau SA), con una capa de 0.25 mm de gel de sílice e indicador fluorescente UV₂₅₄. Los juegos de solventes empleados han sido: éter de petróleo: acetona: dietilamina (10:4:1), acetona: metanol (4:6), acetona: etanol (4:6), triclorometano: metanol: ácido acético (6:3:1) y acetona:isopropanol: n-hexano (5:4:1).

2.6.2.2.-Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El análisis cromatográfico, mediante HPLC, se ha llevado a cabo en un equipo Waters 600E Multisolvant Delivery System, con columna RP-C-18 rellena con Spherisorb ODS-2 (15 cm x 4 mm d.i. y un tamaño de partícula de 5 μ m). Las muestras eran filtradas a través de una membrana de nylon de 0,22 μ m de poro, inyectándose 20 μ L de la muestra. El cromatograma se desarrolló durante 30 minutos, utilizando el sistema de solventes en gradiente descrito por Mínguez-Mosquera *et al* (1990), tabla 2.5, basado en el sistema descrito por Mantoura & Llewellyn (1983). Los solventes fueron: A) agua:par iónico:metanol (1:1:8 v/v), y B) acetona:metanol (1:1). El sistema de gradiente fue: a) inicial 75%A+25%B, b) minutos 0-8 lineal (6) gradiente a 25%A+75%B, c) minutos 8-10 isocrático, d) minutos 10-18 convexa (4) a 10%A+90%B, e) minutos 18-23 concava (10) a 100% B, y f) minutos 23-30 concava (10) a condiciones iniciales, a un flujo de 1 mL/min. Los números entre paréntesis corresponden a la curva tipo incluida en el programa, del equipo cromatográfico Waters 600 E. Para la detección de pigmentos se utilizó un sistema programable de Detector de Diodos en Serie (PDA WATERS 991). Los datos fueron adquiridos tridimensionalmente (absorbancia-tiempo-longitud de onda) en un intervalo de longitudes de onda de 350 a 750nm.

Este sistema de cromatografía se empleó para el análisis de la composición pigmentaria

de la bacteria, como para la purificación de algunas de las fracciones obtenidas en el análisis de la composición.

Tabla 2.5. Esquema del gradiente usado para la separación de pigmentos, descrito por Mínguez-Mosquera *et al* (1990).

Tiempo (min)	Fase móvil		Curva
	A%	B%	
Inicial	75	25	
8	25	75	Lineal (6)
10	25	75	Isocrático
18	10	90	Convexa (4)
23	0	100	Cóncava (10)
30	75	25	Cóncava (10)

2.6.3.- Identificación de pigmentos

2.6.3.1.- Reacciones químicas

La caracterización de un pigmento exige conocer los grupos funcionales químicos presentes en la molécula. Datos importantes al respecto pueden obtenerse mediante ensayos químicos específicos, al menos, como primera aproximación. A continuación se muestran las distintas pruebas que se han aplicado para detectar la presencia o ausencia de distintos grupos:

Saponificación de extracto crudo (Goodwin, 1976)

Este es un procedimiento que se emplea para determinar si alguno de los pigmentos está esterificado y para detectar grupos hidroxilo y/o carbonilo, respectivamente. La presencia de estos grupos se detecta por el desplazamiento de los máximos de absorción hacia longitudes de onda mayores. Se llevó a cabo extrayendo los pigmentos de la cepa bacteriana con cloroformo y secándose. A continuación se añadió metanol-KOH al 20% y se dejó durante 30 minutos en frío y oscuridad. Finalmente se recuperó el pigmento con éter etílico, se llevó a sequedad y se disolvió

en un disolvente para su estudio mediante HPLC.

Reducción con borohidruro (De La Mar & Francis, 1969)

Esta reacción permite detectar grupos ceto. Es una reacción de reducción que transforma en un primer paso los grupos ceto en hidroxilos y en un segundo paso en metilos. Mediante este tratamiento, según Goodwin (1976), se pueden detectar también grupos epóxido.

Consiste en añadir borohidruro sódico, a concentración saturante, a una solución del extracto de pigmentos en etanol, desarroyandose la reacción durante aproximadamente 30 minutos. Una vez realizada se recupera el pigmento de la solución etanol+borohidruro con éter etílico, se eliminan los posibles restos de agua con sulfato sódico anhidro, y se lleva a sequedad. Finalmente se resuspende en un disolvente apropiado y se determinan las posibles modificaciones en los espectros y tiempos de retención de los pigmentos mediante HPLC.

Tratamiento ácido suave (Siefermann-Harms, 1988)

Esta es una reacción de acidificación que se emplea para la determinación de los grupos epóxido, mediante el desplazamiento en los espectros Vis-UV de los pigmentos.

A una solución del pigmento en acetona (0.96 mL) se le añaden 0.02 mL de ácido clorhídrico 0.1 M. Pasados 30 minutos se detiene la reacción con 0.02 mL del tampón Tris-HCl 0.2 M (pH = 8). A continuación se estudian las modificaciones sufridas en los máximos de absorción de los espectros de los pigmentos bacterianos mediante HPLC.

Tratamiento ácido fuerte (De La Mar & Francis, 1969)

Este es un procedimiento que se emplea para la detección de grupos hidroxilo alílicos. La presencia de estos grupos se detecta por el desplazamiento de los máximos de absorción hacia longitudes de onda mayores. Se llevó a cabo añadiendo a 450 µL de una solución del extracto de pigmentos 50 µL de ácido clorhídrico puro, se esperó durante 5 minutos y se añadieron 450 µL

de potasa metanólica. Se recuperó de esta solución con el mismo procedimiento descrito en la reducción con Borohidruro.

2.6.3.2.-Espectrofotometría Vis-UV

Los máximos de absorción del extracto total y de las fracciones purificadas, mediante HPLC, en distintos disolventes, se realizaron en un Espectrofotómetro Lambda 5 de Perkin Elmer. Los máximos de absorción de fracciones no purificadas se obtuvieron a partir del procesado de datos del equipo de HPLC. Las medidas se realizaron en los siguientes disolventes: triclorometano, metanol, éter de petróleo, éter dietílico, n-hexano, benceno, sulfuro de carbono, piridina y acetona.

2.6.3.3.-Espectroscopía de infrarrojo

Con este procedimiento se puede determinar la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales. En nuestro caso se aplicó sobre una de las fracciones purificadas, mediante HPLC, midiéndose entre 4000 y 600 cm^{-1} . El equipo empleado fue un Espectrofotómetro de Infrarrojo Perkin Elmer mod. 9257. El espectro se obtuvo midiendo sobre una muestra seca de pigmento en un cristal de sal gema.

2.6.3.4.-Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con un espectro de resonancia magnética nuclear protónica se puede determinar el número, la naturaleza y el entorno que rodea a los hidrógenos de una molécula. A partir de esta información se puede deducir la estructura del esqueleto molecular. Este método estudia la absorción molecular en las frecuencias de radio (Mhz). Sin embargo, en ocasiones las señales obtenidas con esta técnica son tan numerosas que no se consigue interpretar claramente, lo que impide determinar la estructura del esqueleto molecular. Esta dificultad favoreció el desarrollo de la resonancia magnética nuclear en base a otros átomos, este fue el caso del carbono-13, con el que se puede trabajar en un espectro más amplio, evitando así los solapamientos de señal y, además, ofrece información sobre las posibles simetrías de la molécula.

Los espectros presentados en esta memoria se obtuvieron disolviendo la muestra en una solución de Cloroformo deuterado (DCCl_3). Las medidas se realizaron en los servicios centrales de la Universidad de Cádiz, en un Espectrómetro de 400 MHz Varian Unity-400.

2.6.3.5.-Espectrometría de masas

Un espectro de masas es el registro gráfico de los fragmentos obtenidos al bombardear una molécula en fase gaseosa con un haz de electrones. La masa molecular de dichos fragmentos, dada por la relación masa/carga (m/e), aporta un valioso dato para deducir la estructura de la molécula.

La energía empleada fue de 12 eV. El espectro se realizó en el Instituto de la Grasa (CSIC) en Sevilla. Se empleó un Espectrómetro de masas de doble enfoque mod.MS30/70VG con interfase líquido masas Vestec mod.B. La muestra se inyectó sin columna, en una solución agua:acetonitrilo;acetato amónico 25:75;0.1M, a un flujo de 1mL/min. El gas portador fue nitrógeno (2.5L/min) y el gas de barrido fue helio (4.25 mL/min). Las temperaturas de los componentes fueron: 130°C (vaporizador), 85°C (control), 75-86°C (cámara), 49°C (membrana) y 160°C (separador de momento). El rango de masas fue de 50-750 con 3s de canal. El sistema de datos es el 11/250 VG Data system. Las librerías empleadas para comparar el resultado experimental con compuestos conocidos han sido NBS y NIST.

2.6.4.-Producción de pigmentos

2.6.4.1.-Procedimiento y medios de cultivo

Los cultivos se llevaron a cabo en un fermentador BIOSTAT B., BRAUN BIOTECH S.A. (Melsungen, Germany), variando las condiciones de agitación-aireación o inyectando directamente oxígeno molecular. Los flujos de aireación fueron 0mL/min, 0,5mL/min y 5mL/min. Las intensidades de agitación aplicadas han sido de 0 rpm, 50 rpm y 500rpm. Después de 48 horas de cultivo, se tomaba una muestra, con una densidad celular de 10^8 cels/mL aproximadamente, para

el análisis de pigmentos. Los cultivos (2L) se inocularon con un volumen apropiado de un cultivo “stock” para conseguir una densidad final de aproximadamente 10^6 cels/mL. La temperatura de cultivo se mantuvo constante a 35°C por medio de una unidad refrigerante FRIGOMIX R BRAUN (Melsungen, Germany).

El medio de cultivo empleado para esta serie de experimentos ha sido el medio AMAEB descrito en la tabla 2.3. Para determinar los posibles efectos de distintas fuentes de carbono sobre la composición pigmentaria de la cepa bacteriana estudiada, se cambió la fuente de carbono, 0,01%(p/v) de Citrato Férrico, en el medio AMAEB por 0,1% de Glucosa, 0,1% de Glucosa + hierro y 0,01% de Citrato sódico.

2.6.4.2.-Cuantificación de pigmentos

Se ha cuantificado la cantidad de cada pigmento en el extracto total, tanto de modo relativo (es decir el area determinada en % de una fracción de los pigmentos frente a la suma del area total), como absoluto (es decir cuantificando la concentración de pigmentos en el cultivo expresada en mg/L y $\text{pg}10^{-6}$ células). Las proporciones relativas se han obtenido a partir del procesamiento de datos propio del equipo de HPLC.

En los distintos ensayos realizados el pigmento rojo, responsable de la coloración característica de la cepa bacteriana, se cuantificó a partir de los datos cromatográficos (HPLC) según la ecuación $W = (A_t f a_n) / (E_{\lambda}^{1\%} 200)$, donde A_t : es la absorbancia máxima (UA), f : es el flujo de disolventes por minuto (mL/min), a_n : es el ancho del pico (min), $E_{\lambda}^{1\%}$: coeficiente de extinción específico a una longitud de onda λ (UA/[%p/v]) y W : gramos de pigmento. Esta ecuación relaciona el area del pico cromatográfico con la absorbancia correspondiente.

Se ha determinado el coeficiente de extinción específico de esta fracción mayoritaria y para ello, se purificó recogiendo esta fracción en el tiempo correspondiente de su elución en el HPLC, llevándola a sequedad. A partir de esta muestra diluida en acetona se determinó la correlación lineal de la absorbancia (medida a 477nm) frente a la concentración de pigmento, obteniéndose de este modo el coeficiente de extinción específico. Conocido el ion molecular de

este compuesto mediante espectrometría de masas, se calculó el coeficiente de extinción molar a partir del coeficiente de extinción específico (Goodwin, 1976).

2.7.- ESTUDIO DEL TENSIOACTIVO PRODUCIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* (TCOR3), AISLADA DE CULTIVOS DE MICROALGAS.

2.7.1.-Extracción y caracterización del tensioactivo

La cepa bacteriana TCOR3 colorea de un tono verde el medio de cultivo, desprende un olor agradable y forma espuma perdurable. Sobre la base de este último dato se supuso la presencia de algún agente tensioactivo. Debido a la amplia bibliografía sobre la naturaleza de este tipo de compuestos en el mundo bacteriano (Abu-Ruwaida *et al*, 1991, Banat, 1993, Cooper, 1986, Cooper *et al*, 1979, Cooper & Paddock, 1984, Cooper & Goldenberg, 1987, Georgiou *et al*, 1992, Guerra-Santos, 1984, Poremba, 1993, Poremba & Gunkel, 1991, Van Dyke *et al*, 1991, 1993, Vater, 1986), se decidió aplicar el sistema de extracción para la surfactina descrito por Nakano *et al* (1991), el cual se consideró apropiado sobre la base de que este tensioactivo podía ajustarse a alguno de los tipos descritos por Cooper (1986), entre los que se incluyen los glicolípidos, y para los que se recomienda el sistema de extracción mencionado.

El protocolo de extracción consiste en:

- 1.-Se centrifuga el medio de cultivo, retirándose el pellet.
- 2.-El sobrenadante, que se encuentra a un pH de aproximadamente 7-8, se acidifica hasta pH 2 con una solución concentrada de HCl, lo cual produce la precipitación de proteínas y lípidos.
- 3.-Se recoge el precipitado centrifugando a 4500 rpm durante 15 minutos.
- 4.-Se resuspende en agua a pH 7 y se deja durante la noche a 4°C
- 5.-Se añade diclorometano a igual volumen, se agita fuertemente y se deja durante algunas horas a 4°C, a continuación se recoge la fase orgánica.
- 6.-Se evapora el disolvente y el residuo seco se resuspende en un disolvente adecuado para su análisis.

La naturaleza del compuesto tensioactivo se confirmó mediante Espectroscopía de Masas, aplicando la técnica del FAB (Fast Atom Bombard), que se ha realizado en los servicios centrales de la Facultad de Química de la Universidad Hispalense.

2.7.2.-Producción del compuesto tensioactivo

2.7.2.1.-Procedimiento y medios de cultivo

Una vez identificada la cepa bacteriana, y debido a su aislamiento a partir de un medio salobre se ha procedido a cuantificar la producción del agente tensioactivo, con distintas fuentes de carbono y a distintas salinidades del medio de cultivo. En la bibliografía es frecuente encontrar la glucosa como fuente idónea para la obtención del agente tensioactivo identificado (Guerra-Santos *et al*, 1984), por ello se empleo el medio AMAEB preparado con citrato férrico(0,01%) y glucosa (0,1%), para determinar las diferencias de producción con estas dos fuentes de carbono. A su vez se ensayaron distintas salinidades, 0%, 1%, 2%, 3,5%, 5% y 6%, para de este modo determinar el efecto de la salinidad en la producción del agente tensioactivo. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250mL y a 35°C.

2.7.2.2.-Cuantificación del agente tensioactivo

La cuantificación del agente tensioactivo se ha llevado a cabo mediante el análisis cromatográfico de alta eficacia (HPLC), empleando la misma ecuación que la descrita para la cuantificación de pigmentos. Se llevó a cabo en un equipo Waters 600E Multisolvant Delivery System, con columna RP-C-18 rellena con Spherisorb ODS-2 (15 cm x 4 mm d.i. y un tamaño de partícula de 5µm). Las muestras eran filtradas a través de una membrana de nylon de 0,22µm de poro, inyectandose 20µL de la muestra. El cromatograma se desarrolló durante 20 minutos, eluyendo en régimen isocrático con una solución metanol:H₂O (8:2) a un flujo de 1mL/min (González-Mazo, 1994). Se utilizó un sistema programable de Detector de Diodos en Serie (PDA WATERS 991) para la detección del agente tensioactivo. Los datos fueron adquiridos tridimensionalmente (absorbancia-tiempo-longitud de onda) en un intervalo de longitudes de onda de 190 a 350nm.

El coeficiente de extinción se determinó con el mismo procedimiento que se siguió para la determinación del coeficiente de extinción de los pigmentos bacterianos. La medida se realizó en metanol:H₂O (8:2) a 236nm.

3.1.-IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS PRESENTES EN LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

3.1.1.- Caracterización de las bacterias aisladas a partir de los cultivos de microalgas

El principal criterio seguido en el aislamiento de las distintas cepas ha sido las características morfológicas de las colonias bacterianas. Si bien inicialmente se observaron numerosas cepas bacterianas durante el proceso de aislamiento, solamente una parte de ellas pudieron ser aisladas finalmente. Así pues, se constata el hecho de que el número de cepas bacterianas presentes en los cultivos de microalgas es superior a las aisladas en el transcurso de esta memoria.

Los resultados de las pruebas a las que fueron sometidas las 46 cepas aisladas se muestran en la tabla 3.1. Todas estas pruebas se repitieron en varias ocasiones para, de este modo, evitar las posibles diferencias causadas por la variación poblacional. El número de pruebas realizadas fue bajo, ya que no se pretendía una identificación exhaustiva de las distintas cepas bacterianas presentes en los cultivos. Sí se prestó una mayor atención a las 11 cepas que se muestran en la tabla 3.2, las cuales fueron identificadas a nivel presuntivo en base a las pruebas mencionadas y las galerías API 20NE y API 20E (Biomerieux).

De entre todas las cepas aisladas, destaca un grupo con similares características, entre ellas su color rojo, TSHR2, TSHR3, PR1, MacuAR1, CALFR2, B3R1, IR1 y STIGR1, identificadas todas como *Alteromonas* sp. (tabla 3.2). Proceden respectivamente de las algas: *Tetraselmis suecica*, *Porphyridium cruentum*, *Nannochloris maculata*, *Chaetoceros calcitrans*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana* y *Chlorella stigmatophora*.

Se observó que esta bacteria de color rojo es la más frecuente entre todas las algas. Además, al aislarla y purificarla se aprecia un aumento de la coloración del cultivo con la agitación; este hecho sugirió una posible relación entre la coloración de esta cepa bacteriana y la concentración de oxígeno en los cultivos. Por esta razón se dedica parte de un apartado posterior a este grupo bacteriano en particular.

Otra cepa bacteriana a la que se dedica un apartado en este capítulo es TCOR3 (*P. aeruginosa*), debido a la producción por parte de esta cepa de un agente tensioactivo, aunque se debe destacar que la presencia de esta cepa bacteriana en los cultivos de microalgas es de escasa importancia. Esta cepa bacteriana se aisló conjuntamente con TSHR3.

Tabla 3.1. Características de las cepas bacterianas aisladas a partir de las microalgas

	TSHR2	TSHR3	TSHB1	TSHB2U	TSHTC	TSHBET1	TSHR4	TSHBET2
Procedencia	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>	<i>T.suecica</i>
Color de la colonia	Rojo	Rojo	Blanco	Blanco	Blanco	Beig/ Transpar	Blanco	Beig/ Transpar
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-	+	+	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	+	-	-	+	+	+	+
SH2	-	-	-	(+)				
Nitrato red.	-	-	+	-	(-)	+	nd	nd
Nitrito red.	-	-	+	-	-	+	nd	nd
DNAasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidon	-	-	-	-	-	-	-	-
McConkey	-	-	-	-	-	-	-	-
MOB	+	+	+	+	+	+	+	+
OF	I	I	IIIa	I	I	IIIb	IIIb	II
Anisomicina	+	+	+	+	+	+	+	+
0%	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
0.5%	-/+	-/+	+/-	+/+	-/+	+/+	+/-	+/-
1%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
16%	-/-	-/-	-/+	+/-	-/-	-/+	-/-	+/+
20%	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	nd

Notación: +: resultado positivo, -: resultado negativo, +/-: crecimiento débil, -/+ : no lisan o crecimiento muy débil, nd: no determinado.

Tabla 3.1. Continuación

	PR1	PC3	PB2	PR2	PPAM	PGB	MACUAR1	MACUB1
Procedencia	<i>P.cruentum</i>	<i>P.cruentum</i>	<i>P.cruentum</i>	<i>P.cruentum</i>	<i>P.cruentum</i>	<i>P.cruentum</i>	<i>N.maculata</i>	<i>N.maculata</i>
Color de la colonia	Rojo	Blanco	Blanco	Blanco/ Transpar	Amarillo	Blanco	Rojo	Blanco
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	+	+	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
SH ₂								
Nitrato red.	-	+	+	nd	-	nd	-	nd
Nitrito red.	-	+	+	nd	-	nd	-	nd
DNAasa	-	-	-	+	-	nd	-	+
Almidon	-	-	-	-	-	nd	-	-
McConkey	-	-	-	-	-	nd	-	-
MOB	+	+	+	+	+	+	+	+
OF	I	I	IIIb	I	I	IIIb	nd	nd
Anisomicina	+/-	+	+	+	nd	nd	+/-	+
0%	-/-	-/+	-/+	-/-	nd	nd	-/-	-/-
0.5%	-/-	-/+	+/-+	-/-	nd	nd	-/-	-/-
1%	+/+	+/+	+/-+	-/-	nd	nd	+/+	-/+
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	+/+	+/+	+/+	nd	nd	+/+	+/+
16%	-/-	-/-	-/+	+/+	nd	nd	-/+	-/-
20%	-/-	-/-	-/+	nd	nd	nd	-/-	-/-

Tabla 3.1. Continuación

	MACU C1	AMI	CALF R1	CALF BEBA1	CGRAC CT1	SKEL BET1
Procedencia	<i>N. maculata</i>	Agua de mar	<i>C. calcitrans</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>S. costatum</i>
Color de la colonia	Transpar	Blanca	Blanca	Beig	Transpar	Beig
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
SH2	-	-	nd	nd	nd	nd
Nitrato red.	-	(-)	nd	nd	nd	nd
Nitrito red.	+	-	nd	nd	nd	nd
DNAasa	-	-	-	-	-	-
Almidon	-	+	-	-	-	-
McConkey	+-	+	-	-	-	-
MOB	-	+	+	+	+	+
OF	nd	nd	nd	I	nd	nd
Anisomicina	+	+	+	+	+	+
0%	-+/-+	-+/-+	-/-	+/+	-/-	-/-
0.5%	-+/+	-+/-+	+/-+	+/+	-+/-+	+/-+
1%	+/+	+/-+	+/+	+/+	+/+	+/+
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
16%	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
20%	nd	+/-+	nd	nd	nd	nd

Tabla 3.1. Continuación

	OCU66 CB1	MONASALB	B3B1	B3AM	B3R1	B3BL	MONOCT1
	1						
Procedencia	<i>N. oculata</i>	<i>N. salina</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>M. lutheri</i>
Color de la colonia	Blanca	Blanca	Blanca	Amarilla	Roja	Blanca	Transpar
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-	-	-	-	-	+
Oxidasa	-	+	+	+	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
SH2	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
Nitrato red.	nd	-	+	nd	nd	nd	nd
Nitrito red.	nd	-	+	nd	nd	nd	nd
DNAasa	-	-	+	-	-	-	-
Almidon	-	-	-	-	-	-	-
McConkey	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
MOB	+	+	+	+	+/-	+	+
OF	nd	nd	nd	II	nd	IIIb	nd
Anisomicina	+	+	+	+	+	+	+
0%	-/-	-/-	-/+	nd	nd	nd	-/-
0.5%	-/-	+/-	+/+	nd	nd	nd	-/+
1%	-/+	+/+	+/+	nd	nd	nd	+/-
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	+/+	+/+	nd	nd	nd	+/+
16%	-/-	-/-	-/+	nd	nd	nd	+/+
20%	-/-	-/-	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla 3.1. Continuación

	T-IB1	IAMAN1	IB1	IR1	IBP	STIGBET1	STIGR1	STIGB1
Procedencia	<i>I.galbana</i>	<i>I.galbana</i>	<i>I.galbana</i>	<i>I.galbana</i>	<i>I.galbana</i>	<i>C. stigmatophora</i>	<i>C. stigmatophora</i>	<i>C. stigmatophora</i>
Color de la colonia	Beig	Amarillo/ Anaranjado	Blanca	Roja	Blanca	Beig/ Tranpar	Roja	Blanca
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	+	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	-	+	+	nd	nd
Catalasa	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd
SH2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrato red.	Nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrito red.	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DNAasa	-	-	nd	nd	nd	-	-	-
Almidon	-	+	nd	nd	nd	-	-	-
McConkey	-	-	nd	nd	nd	-	-	-
MOB	+	+	nd	nd	nd	+	nd	+
OF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Anisomicina	+	+	nd	nd	nd	+	+	+
0%	-/-	-/-	nd	nd	nd	-/-	-/-	-/-
0.5%	-/+	+/-	nd	nd	nd	-/+	-/+	+/-
1%	+/-	+/+	nd	nd	nd	+/-	+/+	+/+
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	+/+	nd	nd	nd	+/+	+/+	+/+
16%	-/-	-/-	nd	nd	nd	+/+	-/-	+/+
20%	-/-	-/-	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla 3.1. Continuación

	RU BET1	RUT	RU AM1	RU AM2	RU B1	OCU BET1	DUNA CT1	TCHUI AM1	TCOR3
Procedencia	<i>R.salina</i>	<i>R.salina</i>	<i>R.salina</i>	<i>R.salina</i>	<i>R.salina</i>	<i>N.atomus</i>	<i>D.salina</i>	<i>T.chuii</i>	<i>T.suecica</i>
Color de la colonia	Beig/ Transpar	Transpar	Amar	Amar	Blanca	Beig/ Traspar	Transpar	Amar	Gris
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Oxidasa	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Catalasa	+		+	+		+	+	+	nd
SH2	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
Nitrato red.	nd	nd	nd	+	nd	-	nd	nd	+
Nitrito red.	nd	nd	nd	+	nd	+	nd	nd	+
DNAasa	-	nd	-	-	nd	-	-	+	-
Almidon	+	nd	-	-	nd	+	-	-	-
McConkey	-	+/-	+	+	nd	+	-	nd	+
MOB	nd	-	+	+	-	+	+	+	+
OF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Anisomicina	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
0%	-/-	nd	nd	nd	nd	-/-	-/+	nd	+/+
0.5%	+/-	nd	nd	nd	nd	+/+	+/-	nd	+/+
1%	+/+	nd	nd	nd	nd	+/+	+/+	nd	+/+
3.5%	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8%	+/+	nd	nd	nd	nd	+/+	+/+	+/+	+/-
16%	+/+	nd	nd	nd	nd	-/+	+/+	-/-	-/-
20%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-/-	-/-

Tabla 3.2. Cepas bacterianas identificadas, procedentes de distintas microalgas en cultivo.

Cepa bacteriana	Especie	Cultivo de procedencia
Macu AR1	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Nannochloris maculata</i>
Macu C1	<i>Pasteurella sp.</i>	<i>Nannochloris maculata</i>
MoanasaLB1	<i>Vibrio (Listonella) damsela</i>	<i>Nannochloropsis salina</i>
B3B1	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
B3R1	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
TSHR2,3	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>
TCOR3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>
PR1	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
CalFR3	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Chatoceros calcitrans</i>
IR1	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Isochrysis galbana</i>
StigR1	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Chlorella stigmatophora</i>

3.1.2.-Comparación de las distintas cepas y análisis de clusters

Uno de los objetivos recogido en esta memoria fue comprobar si existía algún grupo bacteriano presente en todos los grupos de microalgas, o ver si algún grupo de microalgas poseía una bacteria específica asociada. Para ello, en primer lugar se realizó un análisis de factores para determinar cuales de ellos tenían mayor peso entre las distintas cepas bacterianas y, de este modo, tener un criterio para agruparlas. Las variables empleadas en el análisis de factores fueron las distintas características bioquímicas estudiadas y el intervalo de tolerancia a la salinidad.

Para poder aplicar el análisis de factores se crearon inicialmente cuatro grupos, en base a la tinción Gram y a la reacción oxidasa. Los cuatro grupos creados se muestran en la tabla 3.3. A estos se les aplicó el programa de Análisis de Factores BMDP 4M incluido en el paquete estadístico BMDP. En todos los casos se obtuvo que el mejor criterio para agrupar a las bacterias, de entre todas las variables empleadas, era el intervalo de tolerancia a la salinidad.

En un segundo paso se crearon, a partir de cada uno de estos cuatro grupos (tabla 3.3), “clusters” con el programa BMDP 2M para Análisis de Grupos de Casos, determinando las distancias entre casos mediante un algoritmo de centralización. Como resultado del análisis previo, la variable empleada fue los intervalos de tolerancia a la salinidad. Los resultados obtenidos mostraron una gran dispersión entre las distintas cepas bacterianas, tal que no permite crear “clusters”, ni siquiera entre las bacterias de color rojo que fueron identificadas como cepas de la misma especie. Consecuentemente, se llegó a la conclusión de que la variabilidad del factor empleado era muy grande y no permitía determinar el grado de especificidad entre microalga y bacterias asociadas, ni el grado de asociación inespecífica por parte de las distintas poblaciones bacterianas.

Tabla 3.3: Agrupación de bacterias según tinción Gram y reacción oxidasa para la realización de los clusters.

Gram +, oxidasa+	Gram+, oxidasa-	Gram-, oxidasa+	Gram-, oxidasa-
TSHB1, TSHB2U, CaIFR1, MONOCT1, TIB1, DUNACT1,	CaIFBEB1	TSHTC, TSHBET1, TSHR4, TSHBET2, PC3, PB2, AM1, CGRACCT1, SKELBET1, MONASAL B1, B3B1, B3AM, IAMAN1, IB1, IBP, STIGBET1, STIGB1, RUBET1, RUT OCUBET1, TCHUIAM1, TCOR3	TSHR2, TSHR3, PR1,PPAM, PR2, PGB, MACUAR1, MACUB1, MACUC1, OCU66CB1, B3R1, B3BL, RUAM1, RUAM2, RUB1, IR1, STIGR1

Sin embargo, considerando los grupos creados entorno a la tinción Gram y a la reacción oxidasa (tabla3.3), se puede afirmar que las bacterias G- son las más abundantes, representando el 84,7% de todas las bacterias aisladas; y dentro de estas, las más abundantes, aunque con escasa diferencia, son las oxidasa positivas con el 56,4% de las bacterias G- aisladas.

3.2.-INTERACCIÓN MICROALGA-BACTERIAS

3.2.1.- Caracterización de los parámetros que definen los crecimientos de distintas poblaciones de microalgas y sus bacterias asociadas.

En este apartado se caracteriza el crecimiento de distintas poblaciones de microalgas en cultivo y las poblaciones bacterianas asociadas a cada especie microalgal. Se ha ensayado el efecto del tamaño de inóculo inicial y la edad del cultivo origen desde el cual se realiza la siembra. Asimismo se ha comprobado el consumo de nutrientes a lo largo del desarrollo de los cultivos.

Tetraselmis suecica (Kyllin) Butcher

Esta microalga, como se puede apreciar en la tabla 2.1 (Material y Métodos), es una de las de mayor tamaño entre las estudiadas. En la figura 3.1 se muestran las curvas de crecimiento de la microalga, de la población total de bacterias asociadas y de las distintas subpoblaciones bacterianas consideradas. En la tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos para los distintos parámetros que caracterizan el crecimiento de los cultivos de la especie microalgal y en la tabla 3.5 los correspondientes a las poblaciones bacterianas.

La tasa de crecimiento exponencial de *T. suecica* es significativamente mayor en los cultivos con bajo inóculo ($2 \cdot 10^4$ cel/mL) frente a los de alto inóculo ($2 \cdot 10^6$ cel/mL), aunque el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria en el primer caso es mayor que en el segundo, debido a una mayor duración de la fase de retardo. Para ambas condiciones, las densidades celulares finales alcanzadas y los rendimientos totales obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, el rendimiento óptimo fué menor en cultivos con bajo inóculo. Así pues, los datos indican que la población de microalgas crece más rápido con inóculo menor, aunque el periodo de crecimiento se prolonga durante más tiempo, para alcanzar la misma densidad celular.

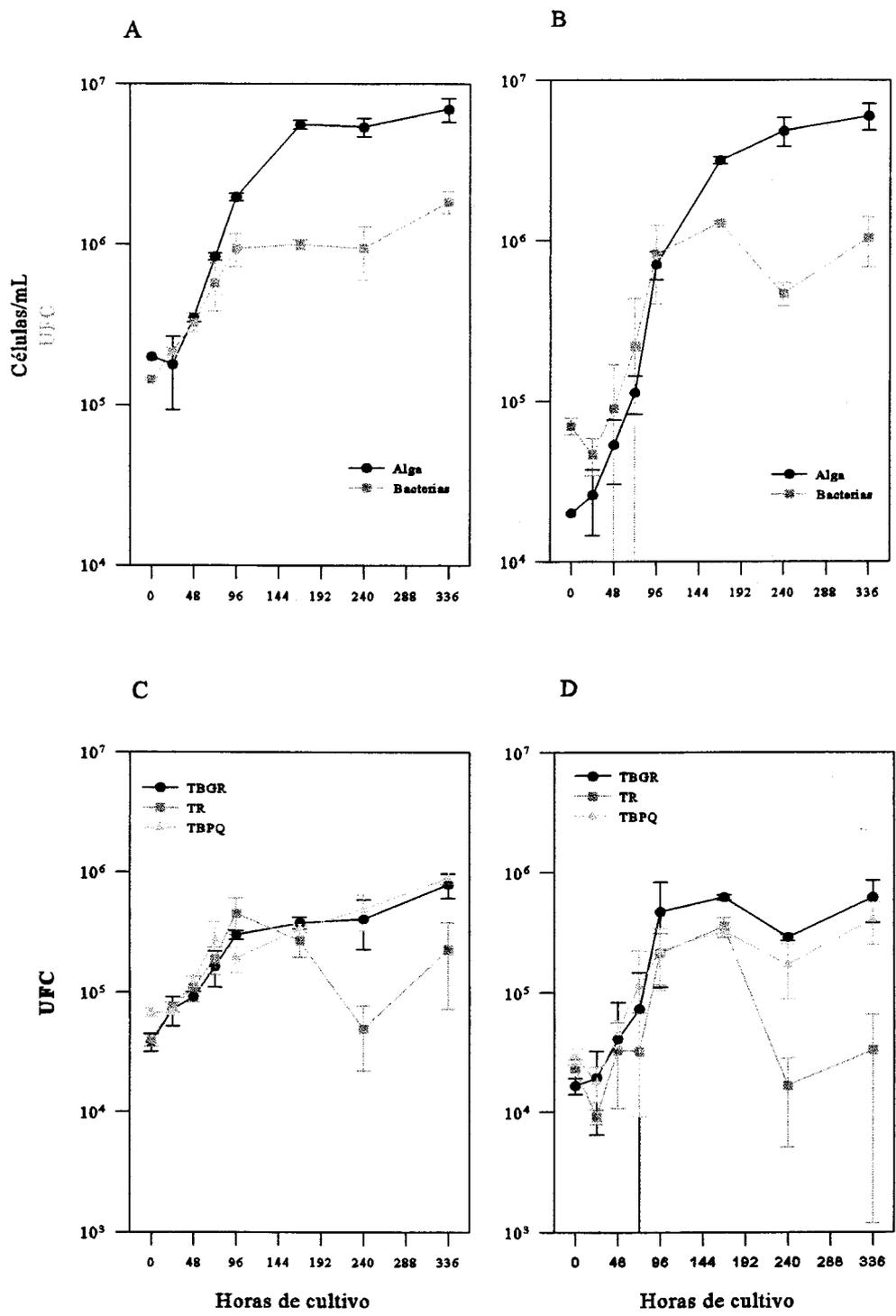


Figura 3.1: A,B curvas de crecimiento del alga *T. suecica* y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células diferentes. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de microalgas.

Tabla 3.4.: Parámetros que definen el crecimiento del microalga *T. suecica* en cultivo a partir de dos densidades celulares iniciales diferentes

	Densidad inicial (células / mL)	Densidad final (células / mL)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células / h)	Momento de rendimiento óptimo
Alto inóculo	$2 \cdot 10^5 \pm 0$	$6,94 \cdot 10^6 \pm 1,15 \cdot 10^6$	$0,022 \pm 1,43 \cdot 10^{-3}$	$30,91 \pm 2,04$	96	$4,5 \cdot 10^8 \pm 7,94 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^8 \pm 4,75 \cdot 10^7$	168 h
Bajo inóculo	$2 \cdot 10^4 \pm 0$	$6,03 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$	$0,030 \pm 5,02 \cdot 10^{-4}$	$22,82 \pm 0,38$	96	$4,29 \cdot 10^8 \pm 7,9 \cdot 10^7$	$4,52 \cdot 10^8 \pm 2,26 \cdot 10^8$	168 h

Tabla 3.5.: Parámetros que definen el crecimiento de las poblaciones parciales y población total, de las bacterias asociadas a los cultivos de *T. suecica*. (A): alto inóculo; (B): bajo inóculo

	Densidad inicial (UFC)	Densidad final (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)
TBG(A)	$3,9 \cdot 10^4 \pm 6,6 \cdot 10^3$	$7,90 \cdot 10^5 \pm 1,80 \cdot 10^5$	$0,02 \pm 4,1 \cdot 10^{-3}$	$35,05 \pm 6,76$	96
TBG(B)	$1,6 \cdot 10^4 \pm 2,5 \cdot 10^3$	$6,16 \cdot 10^5 \pm 2,30 \cdot 10^5$	$0,031 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$23,4 \pm 5,74$	96
TR(A)	$3,9 \cdot 10^4 \pm 4,42 \cdot 10^3$	$2,26 \cdot 10^5 \pm 1,54 \cdot 10^5$	$0,023 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	$30,24 \pm 2,38$	96
TR(B)	$2,3 \cdot 10^4 \pm 4,1 \cdot 10^3$	$3,33 \cdot 10^4 \pm 3,21 \cdot 10^4$	$0,021 \pm 8 \cdot 10^{-3}$	$35 \pm 11,1$	96
TBPQ(A)	$6,7 \cdot 10^4 \pm 5,6 \cdot 10^3$	$8,90 \cdot 10^5 \pm 9,37 \cdot 10^4$	$0,027 \pm 8 \cdot 10^{-3}$	$26,8 \pm 7,7$	96
TBPQ(B)	$2,9 \cdot 10^4 \pm 4,57 \cdot 10^3$	$4,05 \cdot 10^5 \pm 1,56 \cdot 10^5$	$0,033 \pm 2,3 \cdot 10^{-3}$	33 ± 28	96
Bacterias Totales (A)	$1,45 \cdot 10^5 \pm 3,15 \cdot 10^3$	$1,84 \cdot 10^6 \pm 2,90 \cdot 10^5$	$0,019 \pm 3,1 \cdot 10^{-3}$	$37,08 \pm 5$	96
Bacterias Totales (B)	$6,98 \cdot 10^4 \pm 8,4 \cdot 10^3$	$1,046 \cdot 10^6 \pm 3,5 \cdot 10^5$	$0,025 \pm 7,9 \cdot 10^{-3}$	$29,26 \pm 8,42$	96

Respecto a la población total de bacterias, la tasa de crecimiento exponencial también es significativamente mayor en cultivos con bajo inóculo y no se aprecia apenas una fase de retardo, alcanzando durante la fase estacionaria el mismo nivel de densidad celular. Existe, asimismo, una sincronía entre la duración de la fase exponencial de la población bacteriana y algal (figura 3.1), aunque las densidades celulares finales en el primer caso se mantienen muy por debajo que en el segundo (tablas 3.4 y 3.5). De las tres subpoblaciones bacterianas estudiadas, las cepas TBGR y TBPQ muestran un comportamiento similar al de la población total, mientras que en la cepa TR, una vez finalizada la fase exponencial, se inicia una fase de declive que es más pronunciada en cultivos con inóculo bajo.

Los consumos de fósforo y de nitrógeno en ambos tipos de cultivo siguen un patrón similar, siendo muy rápido durante los primeros días de cultivo, aunque con un lógico desfase en el tiempo debido a la diferencia del número inicial de células (figura 3.2). El carbono orgánico disuelto (COD), por el contrario, aumenta progresivamente a lo largo del tiempo, sin apreciarse una diferencia clara entre ambos tipos de cultivo.

La figura 3.3 y la tabla 3.6, muestran las curvas de crecimiento y los parámetros de las mismas, respectivamente, de cultivos con bajo inóculo de *T. suecica* en ausencia de medio enriquecido en nutrientes, y de cultivos con alto inóculo de un cultivo envejecido durante 14 días. Asimismo, se muestra la evolución en cada caso de la población bacteriana asociada.

En medio sin abonar, el crecimiento de la microalga es mucho menor, alcanzando en la fase estacionaria una densidad de células un orden de magnitud menor que en cultivos abonados. La población bacteriana total también crece menos, pero en este caso supera ampliamente a la de *T. suecica* (figura 3.3A; tabla 3.6). En cultivos con inóculo envejecido, pero con medio de cultivo completo, el crecimiento de la microalga es similar al presentado con inóculos de menor edad pero, al igual que en el caso anterior, la población bacteriana supera a la de la microalga y alcanza niveles muy superiores (10^8 bacterias/mL) frente a los obtenidos en cultivos con inóculos jóvenes (10^6 bacterias/mL) (figura 3.3B; tabla 3.6). En este caso la tasa de crecimiento exponencial de la población bacteriana es mayor y la fase estacionaria tarda más en alcanzarse.

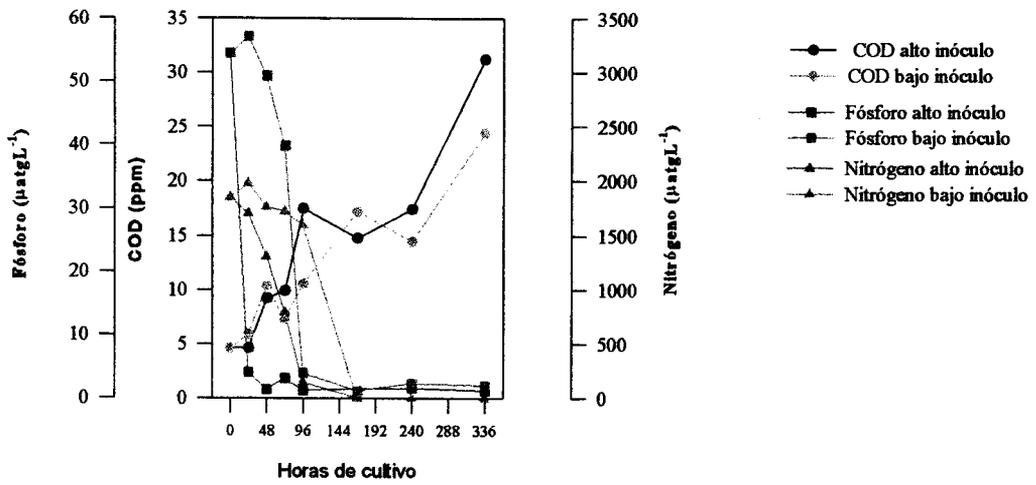


Figura 3.2: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), en dos cultivos, a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *T. suecica*.

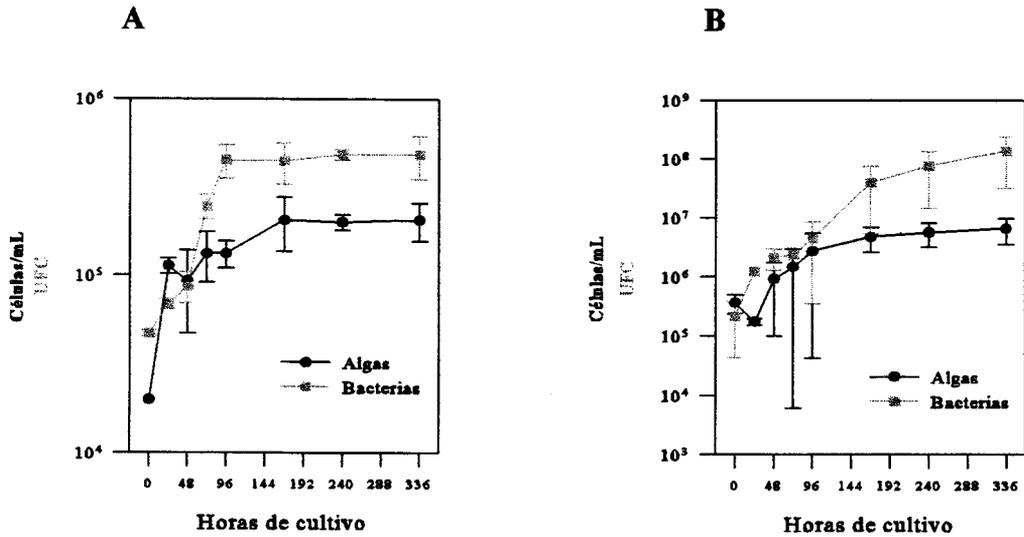


Figura 3.3: A; Curva de crecimiento de un cultivo de *T. suecica* sin abonar. B; Crecimiento de la microalga y de la población bacteriana total asociada, en cultivos sembrados a partir de inóculos envejecidos.

Tabla 3.6.: Parámetros que definen el crecimiento del microalga *T. suecica* y la población bacteriana total, en un cultivo sin abonar y en cultivos realizados a partir de inóculos de 14 días.

	Densidad inicial (células / mL) (UFC)	Densidad final (células / mL) (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
<i>T. suecica</i> Cultivo sin abonar	$2 \cdot 10^4 \pm 0$	$2 \cdot 10^5 \pm 5,03 \cdot 10^4$	$0,021 \pm 4,7 \cdot 10^{-3}$	$33 \pm 6,58$	72	$1,33 \cdot 10^7 \pm 3,6 \cdot 10^6$	$9,33 \cdot 10^7 \pm 1,01 \cdot 10^6$	48 h
<i>T. suecica</i> Inóculo de 14 días	$3,70 \cdot 10^5 \pm 1,27 \cdot 10^5$	$6,48 \cdot 10^6 \pm 2,8 \cdot 10^6$	$0,022 \pm 8,26 \cdot 10^{-3}$	$33,5 \pm 12,4$	96	$4,72 \cdot 10^8 \pm 2,4 \cdot 10^8$	$7,63 \cdot 10^8 \pm 4,76 \cdot 10^8$	144 h \pm 34
Bacterias Totales cultivo sin abonar	$4,72 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$4,84 \cdot 10^5 \pm 1,34 \cdot 10^5$	$0,023 \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$	$30 \pm 15,75$	96			
Bacterias Totales inóculo de 14 días	$1,69 \cdot 10^5 \pm 2,12 \cdot 10^5$	$1,24 \cdot 10^8 \pm 1,1 \cdot 10^8$	$0,027 \pm 0,023$	$25,67 \pm 30,13$	168			

Nannochloropsis gaditana Lubian

Esta microalga es la de menor tamaño de las estudiadas (tabla 2.1; apartado 2.1.2. de Material y Métodos). En las figuras 3.4 se representan las curvas de crecimiento de la microalga, de la población total de bacterias asociadas y de las distintas subpoblaciones bacterianas consideradas. En la tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos para los distintos parámetros que caracterizan el crecimiento de la especie microalgal y en la tabla 3.8 los correspondientes a las poblaciones bacterianas.

Como se puede apreciar, durante el periodo estudiado, en ningún caso *N. gaditana* alcanza la fase estacionaria, por lo que la diferencia encontrada en los valores de los distintos parámetros de crecimiento no deben ser tenidos en consideración, excepto lo que se refiere a la tasa de crecimiento exponencial, la cual muestra una diferencia estadísticamente diferente, siendo en este caso ligeramente más alta en cultivos con alto inóculo.

La población bacteriana al igual que en el caso de *T. suecica*, alcanza la fase estacionaria al cabo de 96 horas, manteniéndose a un nivel muy por debajo del que es alcanzado por la microalga. La tasa de crecimiento exponencial a bajo inóculo (10^5 células/mL) es ligeramente superior, aunque estadísticamente significativa, respecto a los cultivos con alto inóculo (10^6 células/mL). Las dos subpoblaciones bacterianas estudiadas muestran un comportamiento similar a la población total.

Respecto al consumo de nutrientes, figura 3.5, también existe un lógico desfase entre cultivos a bajo y alto inóculo, aunque en ambos casos se produce de manera más lenta de lo que ocurría en *T. suecica*. Por otro lado, los niveles alcanzados de carbono orgánico disuelto son bastante inferiores a los de todas las algas estudiadas. En esta microalga ha sido el único caso donde no se ha ensayado el efecto de la edad del inóculo.

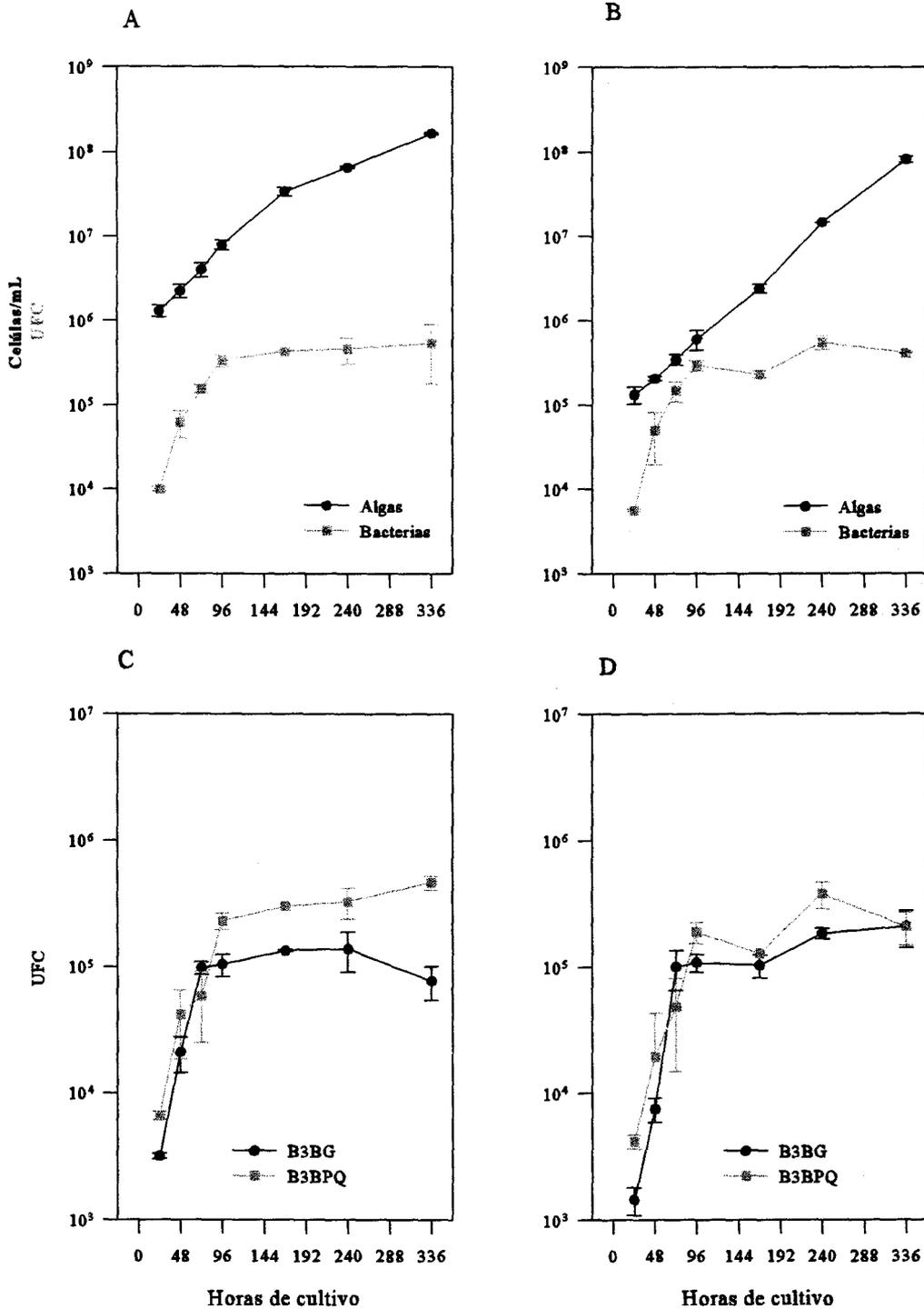


Figura 3.4: A,B curvas de crecimiento del alga *N. gaditana* y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de microalgas.

Tabla 3.7.:Parámetros que definen el crecimiento del microalga *N. gaditana* en cultivo a partir de dos densidades iniciales de inóculo diferentes

	Densidad inicial (células / mL)	Densidad final (células / mL)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
Alto inóculo	$10^6 \pm 0$	$164,8 \cdot 10^6 \pm 3,8 \cdot 10^6$	$0,022 \pm 1,5 \cdot 10^{-3}$	$30,16 \pm 2,11$	168	$1,17 \cdot 10^{10} \pm 2,3 \cdot 10^8$	$1,17 \cdot 10^{10} \pm 2,3 \cdot 10^8$	336 h
Bajo inóculo	$10^5 \pm 0$	$82,6 \cdot 10^6 \pm 6,72 \cdot 10^6$	$0,020 \pm 2,99 \cdot 10^{-4}$	$33,80 \pm 0,49$	240	$5,89 \cdot 10^9 \pm 4,8 \cdot 10^8$	$5,89 \cdot 10^9 \pm 4,8 \cdot 10^8$	336 h

Tabla 3.8.:Parámetros que definen el crecimiento de las poblaciones parciales y población total, de las bacterias asociadas a los cultivos de *N. gaditana*. (A): alto inóculo; (B): bajo inóculo.

	Densidad inicial (UFC)	Densidad final (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)
B3BG(A)	$6,41 \cdot 10^2 \pm 93,5$	$7,7 \cdot 10^4 \pm 2,34 \cdot 10^4$	$0,071 \pm 3,34 \cdot 10^{-3}$	$9,70 \pm 0,46$	72
B3BG(B)	$78,3 \cdot 10^2 \pm 7,63$	$2,07 \cdot 10^5 \pm 6,7 \cdot 10^4$	$0,087 \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$10,74 \pm 0,90$	72
B3BPQ(A)	$9,81 \cdot 10^2 \pm 50$	$4,65 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^5$	$0,064 \pm 5,7 \cdot 10^{-3}$	$15,13 \pm 0,49$	96
B3BPQ(B)	$1,93 \cdot 10^2 \pm 66,5$	$2,07 \cdot 10^5 \pm 6 \cdot 10^4$	$0,053 \pm 6 \cdot 10^{-3}$	$15,46 \pm 4,50$	96
Bacterias Totales (A)	$1,62 \cdot 10^3 \pm 96$	$5,43 \cdot 10^5 \pm 3,6 \cdot 10^5$	$0,048 \pm 9,7 \cdot 10^{-4}$	$14,44 \pm 0,29$	96
Bacterias Totales (B)	$2,71 \cdot 10^2 \pm 72,1$	$4,15 \cdot 10^5 \pm 7 \cdot 10^5$	$0,057 \pm 4,78 \cdot 10^{-3}$	$12,05 \pm 0,96$	96

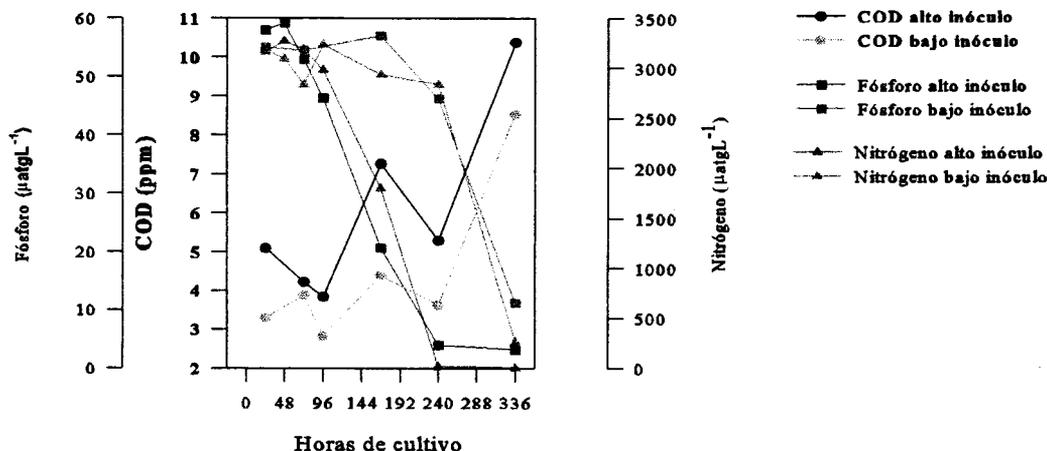


Figura 3.5: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), en dos cultivos, a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *N. gaditana*.

***Isochrysis galbana* Parke**

Esta microalga, como se puede apreciar en la tabla 2.1 (Material y Métodos), posee un tamaño relativamente pequeño entre las estudiadas. En las figuras 3.6 se representan las curvas de crecimiento de la microalga, de la población total de bacterias asociadas y de las distintas subpoblaciones bacterianas consideradas. En la tabla 3.9 se muestran los resultados obtenidos para los distintos parámetros que caracterizan el crecimientos de los cultivos de la especie microalgal y en la tabla 3.10 los correspondientes a las poblaciones bacterianas.

La tasa de crecimiento exponencial de *I. galbana* no muestra diferencias estadísticamente significativas en cultivos con alto inóculo ($2 \cdot 10^5$ cel/mL) y con bajo inóculo ($2 \cdot 10^4$ cel/mL), aunque el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria es mayor en el segundo caso, debido a una mayor duración de la fase de retardo. Para ambas condiciones, las densidades celulares finales alcanzadas y los rendimientos totales obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, el rendimiento óptimo fué menor en cultivos con bajo inóculo.

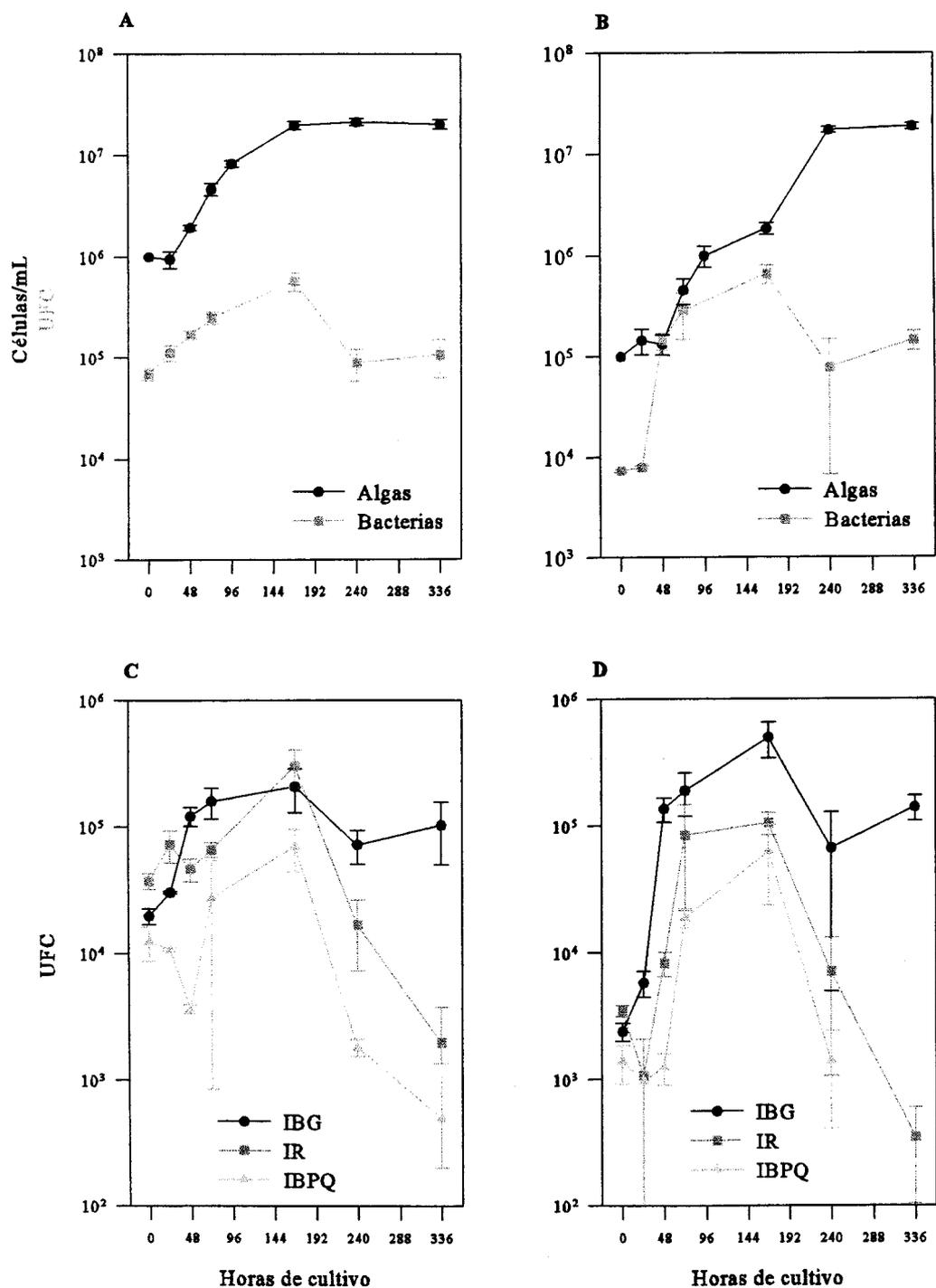


Figura 3.6: A,B curvas de crecimiento del alga *I. galbana* (T-Iso) y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células diferentes. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de microalgas.

Respecto a la población total de bacterias (figura 3.6 A y B), la tasa de crecimiento exponencial es significativamente mayor en cultivos con bajo inóculo. En las dos condiciones de cultivo, no se aprecia una fase estacionaria pasándose directamente de la fase de retardo a una fase de declive con un patrón muy similar en ambos casos. Las subpoblaciones bacterianas tienen un comportamiento similar al de la población bacteriana total (figura 3.6. C y D), excepto la cepa IBG cuya fase de declive es menos pronunciada que la de las otras dos.

Los consumos de nitrógeno y fósforo y aparición de carbono orgánico disuelto (figura 3.7), en ambos tipos de cultivo, siguen un patrón similar al descrito para las microalgas anteriores.

La figura 3.8 y la tabla 3.11., muestran las curvas de crecimiento y los parámetros de las mismas, respectivamente, de cultivos de bajo inóculo de la microalga procedente de un cultivo envejecido durante 14 días. Asimismo se muestra la evolución de la población bacteriana. Las características del crecimiento, tanto de la población de la microalga como de la de bacterias, son similares a las de los cultivos realizados con inóculos jóvenes, si bien la densidad celular alcanzada por la población bacteriana es muy superior.

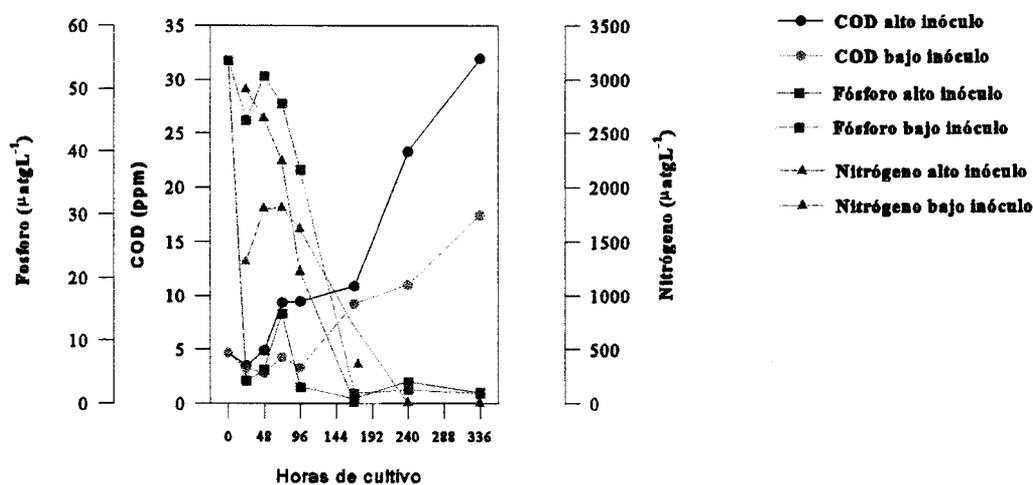


Figura 3.7: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), en dos cultivos, a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *I. galbana* (T-Iso).

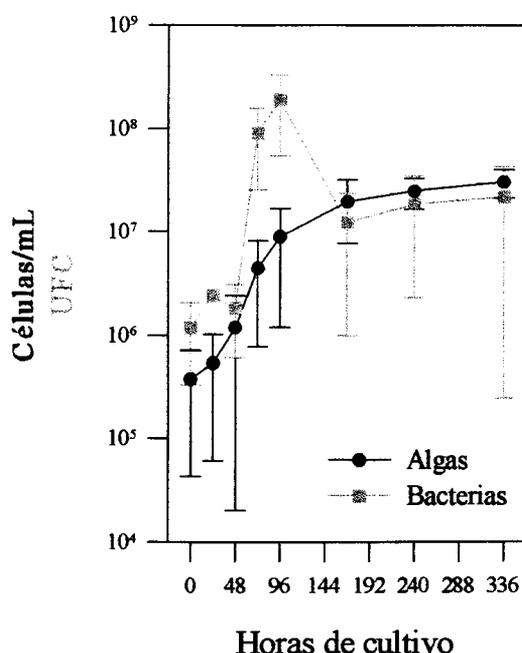


Figura 3.8: Crecimiento de *I. galbana* (T-Iso) y de la población bacteriana total asociada, en cultivos sembrados a partir de inóculos envejecidos.

***Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill & Wetherbee**

Este alga es la de mayor tamaño de las estudiadas durante el desarrollo de este trabajo (tabla 2.1; Material y Métodos). En las figuras 3.9 A y B se representan las curvas de crecimiento de algas y bacterias a alto (10^5 cel/mL) y bajo inóculo (10^4 cel/mL), respectivamente. En este caso la población bacteriana total supera, en número, a la de microalgas, a diferencia de lo que sucede en las microalgas vistas hasta este momento. En las figuras 3.9 C y D se muestran las curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones presentes en el cultivo.

La tabla 3.12 muestra los distintos parámetros que caracterizan el crecimiento de *R. salina*. Como se puede apreciar, no existen diferencias significativas entre los valores de la tasa

de crecimiento con alto y bajo inóculo, aunque la duración de la fase exponencial es mayor en este último caso. Asimismo, no existen diferencias en las densidades de células finales alcanzadas ni en el rendimiento total de los cultivos. Sin embargo el rendimiento óptimo de los cultivos es estadísticamente menor con bajos inóculos.

La población total bacteriana (tabla 3.13) se comporta de un modo diferente al de las ya que las tasas de crecimiento exponencial son estadísticamente diferentes siendo ligeramente mayor en bajo inóculo, aunque la densidad final de bacterias alcanzada es igual en ambas condiciones de cultivo. En cuanto a las dos subpoblaciones bacterianas, se comportan de manera similar a la población total, aunque el nivel de la cepa RBG permanece siempre por debajo de la cepa RBPQ.

Respecto al consumo de nutrientes y la evolución del carbono orgánico disuelto (figura 3.10), también existe un lógico desfase entre cultivos a bajo y alto inóculo, de manera similar a la de las demás microalgas estudiadas.

En los cultivos sembrados con inóculos de 14 días (figura 3.11) se observó un descenso de la población bacteriana en los últimos tramos del crecimiento de la microalga. Es de destacar que el número final de bacterias es un orden de magnitud menor que el alcanzado en los cultivos con inóculos de 7 días (tabla 3.14). La población de microalgas sufre a su vez el mismo efecto, es decir, el crecimiento, la densidad final alcanzada y el rendimiento total son menores, mientras que el rendimiento óptimo es similar a los cultivos con inóculos de 7 días. Estos resultados sugieren que la edad del inóculo es importante para determinados parámetros del crecimiento en esta microalga.

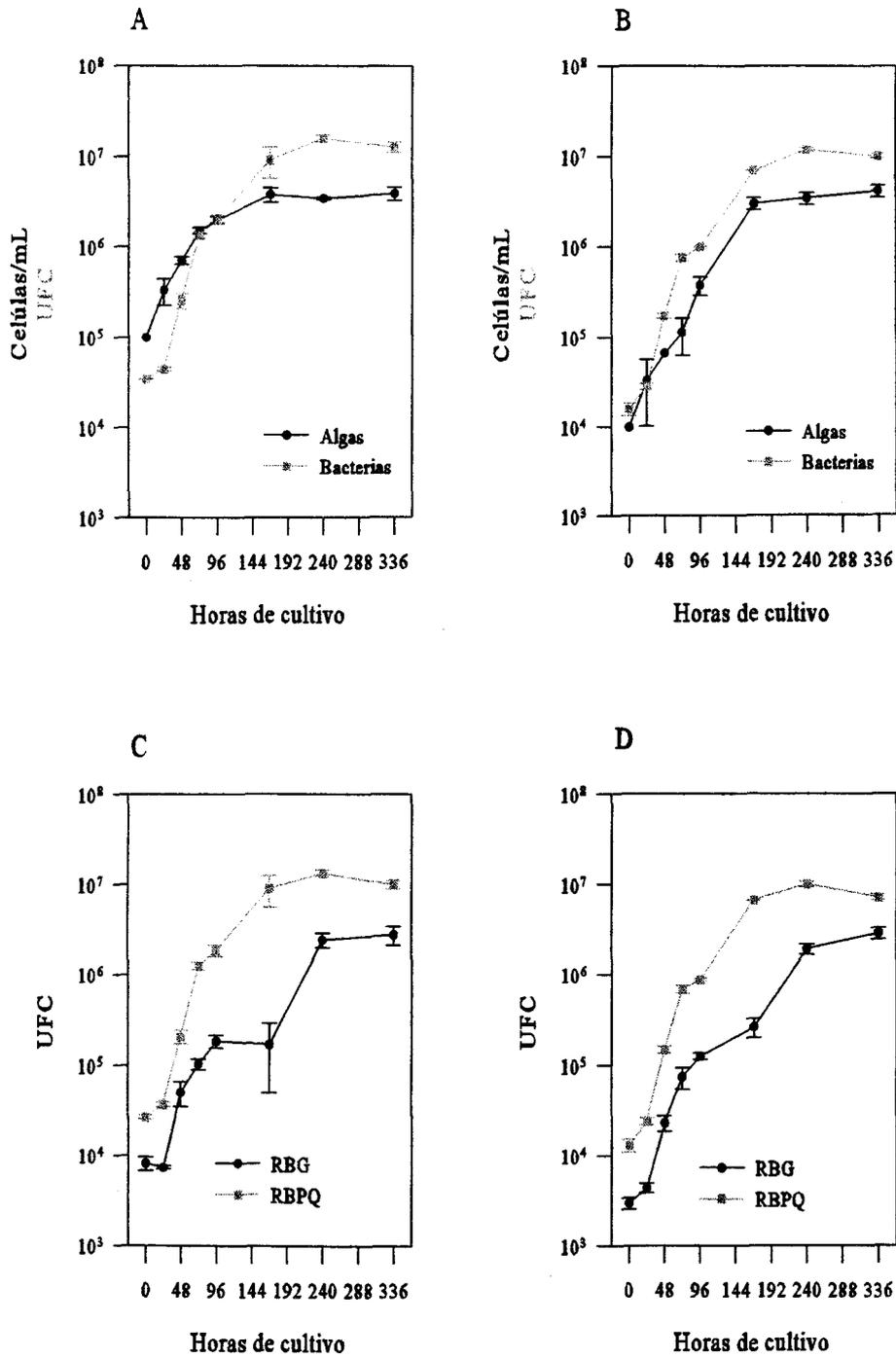


Figura 3.9: A,B curvas de crecimiento del alga *R. salina* y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células diferentes. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de microalgas.

Tabla 3.9.:Parámetros que definen el crecimiento del microalga *I. galbana* en cultivo a partir de dos densidades celulares iniciales diferentes

	Densidad inicial (células / mL)	Densidad final (células / mL)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células / h)	Rendimiento óptimo (células / h)	Momento de rendimiento óptimo
Alto inóculo	$10^6 \pm 0$	$20,2 \cdot 10^6 \pm 2,1 \cdot 10^6$	$0,024 \pm 7,7 \cdot 10^{-4}$	$28,65 \pm 0,9$	96	$1,37 \cdot 10^9 \pm 1,51 \cdot 10^8$	$2,66 \cdot 10^9 \pm 3,93 \cdot 10^8$	168 h
Bajo inóculo	$10^5 \pm 0$	$18,86 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$	$0,022 \pm 1,1 \cdot 10^{-3}$	$30,75 \pm 1,5$	96	$1,34 \cdot 10^9 \pm 9,89 \cdot 10^7$	$1,72 \cdot 10^9 \pm 1,13 \cdot 10^8$	240 h

Tabla 3.10.:Parámetros que definen el crecimiento de las poblaciones parciales y población total, de las bacterias asociadas a los cultivos de *I. galbana*.(A): alto inóculo; (B): bajo inóculo

	Densidad inicial (UFC)	Densidad final (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)
IBG(A)	$1,96 \cdot 10^4 \pm 2,8 \cdot 10^3$	$1,03 \cdot 10^5 \pm 5,3 \cdot 10^4$	$0,037 \pm 5,26 \cdot 10^{-3}$	$18,56 \pm 2,42$	48
IBG(B)	$2,40 \cdot 10^3 \pm 3,9 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^5 \pm 3,1 \cdot 10^4$	$0,083 \pm 1,06 \cdot 10^{-3}$	$8,26 \pm 0,10$	48
IR(A)	$3,70 \cdot 10^4 \pm 5,4 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^5$	$0,009 \pm 2,72 \cdot 10^{-3}$	$81,2 \pm 23,3$	168
IR(B)	$3,48 \cdot 10^4 \pm 3,4 \cdot 10^2$	$2,50 \cdot 10^2 \pm 3,5 \cdot 10^2$	$0,093 \pm 4,15 \cdot 10^{-2}$	$8,20 \pm 3,63$	72
IBPQ(A)	$1,24 \cdot 10^4 \pm 3,7 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2 \pm 8,6 \cdot 10^2$	$0,071 \pm 4 \cdot 10^{-2}$	$11,61 \pm 5,12$	120
IBPQ(B)	$1,39 \cdot 10^3 \pm 4,6 \cdot 10^2$	$10^3 \pm 1,4 \cdot 10^3$	$0,110 \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	$6,19 \pm 1,03$	120
Bacterias Totales (A)	$6,92 \cdot 10^4 \pm 9,6 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^5 \pm 4,5 \cdot 10^4$	$0,017 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$	$40,26 \pm 9,1$	72
Bacterias Totales (B)	$7,17 \cdot 10^3 \pm 2,6 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^5 \pm 3,1 \cdot 10^4$	$0,057 \pm 6,47 \cdot 10^{-3}$	$12,12 \pm 1,36$	72

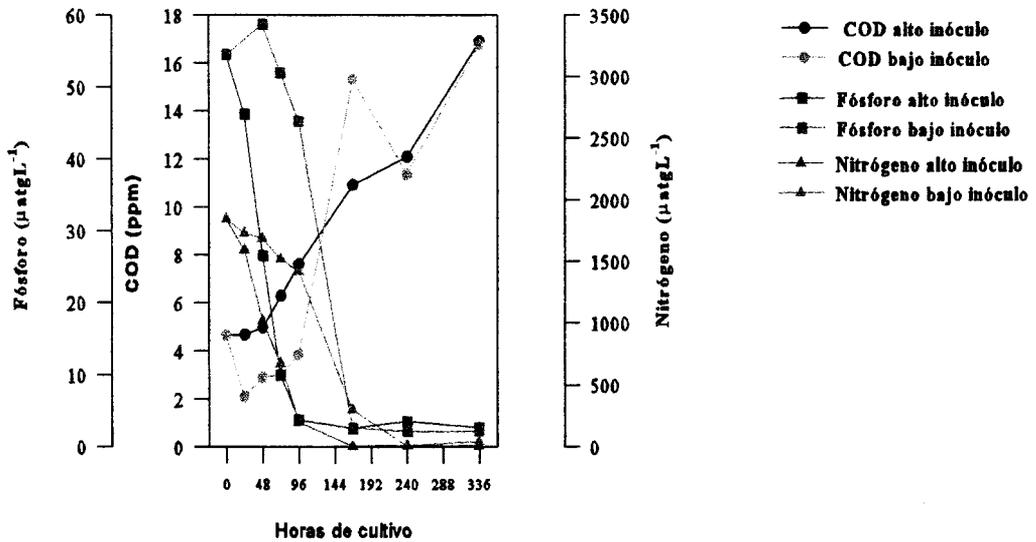


Figura 3.10: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), en dos cultivos, a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *R. salina*.

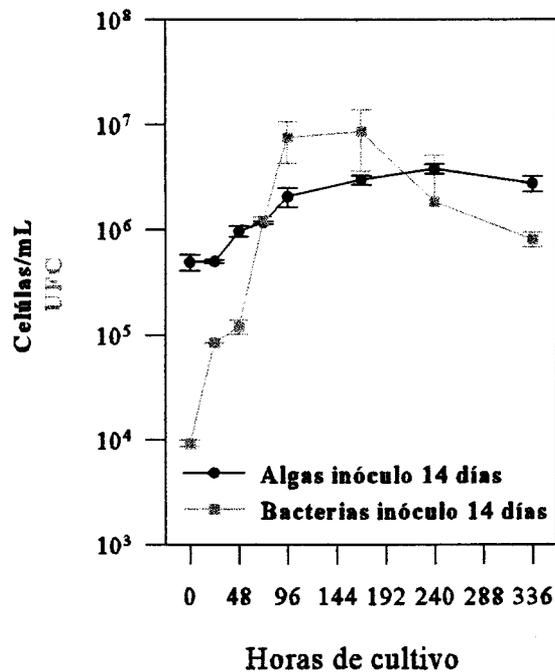


Figura 3.11: Crecimiento de *R. salina* y de la población bacteriana total asociada, en cultivos sembrados a partir de inóculos envejecidos.

Tabla 3.11.: Parámetros que definen el crecimiento del microalga *I. galbana* y la población bacteriana total, en cultivos realizados a partir de inóculos de 14 días.

	Densidad inicial (células / mL) (UFC)	Densidad final (células / mL) (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_r (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
<i>I. galbana</i> Inóculo de 14 días	$3,7 \cdot 10^5 \pm 3,34 \cdot 10^5$	$30,5 \cdot 10^6 \pm 9,2 \cdot 10^6$	$0,029 \pm 4,2 \cdot 10^{-3}$	$24,16 \pm 3,53$	96	$2,29 \cdot 10^9 \pm 7,77 \cdot 10^8$	$2,85 \cdot 10^9 \pm 1,48 \cdot 10^9$	204 ± 51 h
Bacterias Totales inóculo de 14 días	$8,57 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^6$	$2,57 \cdot 10^7 \pm 2,72 \cdot 10^7$	$0,043 \pm 2,26 \cdot 10^{-2}$	$18,7 \pm 9,84$	96			

***Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano**

Este alga es de un tamaño medio, dentro de los tamaños de las algas que hemos estudiado (tabla 2.1; Material y Métodos). En la figura 3.12 A y B se muestran las curvas de crecimiento del alga y de la población de bacterias totales asociadas, según las dos densidades de inóculo inicial empleadas, 10^6 cel/mL y 10^5 cel/mL. En este caso también se observa un paralelismo entre las curvas de crecimiento de las poblaciones de microalgas y bacterias. Las figuras 3.12 C y D muestran las curvas de crecimiento de las subpoblaciones bacterianas, donde se distinguen dos poblaciones principales y dos poblaciones minoritarias.

En la tabla 3.15 se muestran los parámetros obtenidos que definen el crecimiento de las diferentes poblaciones en las distintas condiciones de cultivo estudiadas. En este caso no ha sido posible calcular de manera fiable la tasa de crecimiento exponencial en cultivos a alto inóculo, pero en cualquier caso la fase exponencial en cultivos a bajo inóculo tiene una mayor duración. Las densidades finales alcanzadas y los rendimientos totales de los cultivos son estadísticamente iguales, mientras que el rendimiento óptimo de los cultivos a bajo inóculo es significativamente menor.

Respecto a la población total de bacterias (tabla 3.16), no hay diferencias significativas entre las tasas de crecimiento exponencial y las densidades finales en ambas condiciones de cultivo. Las subpoblaciones bacterianas asociadas al alga presentan un comportamiento similar al de otras especies vistas anteriormente, aunque la subpoblación denominada CAM parece que tiene una tendencia a aumentar en mayor grado durante la fase estacionaria de la población algal, y que se pone especialmente de manifiesto en cultivos con bajo inóculo (figura 3.12 C y D).

En la figura 3.13 se muestra el consumo de nitrógeno y fósforo y la aparición de carbono orgánico disuelto en ambos tipos de cultivo, en este caso también se aprecia un desfase entre los cultivos de alto y bajo inóculo al igual que en el resto de cultivos estudiados.

En la figura 3.14 y tabla 3.17, se muestran las curvas de crecimiento y los parámetros de las mismas, respectivamente, de cultivos con alto y bajo inóculo procedente de un cultivo envejecido durante 14 días. Se aprecia un comportamiento similar de las características de crecimiento de los cultivos con inóculos de 7 días en el caso de las algas. Sin embargo, las bacterias alcanzan densidades mucho más altas en los cultivos con inóculos de 14 días.

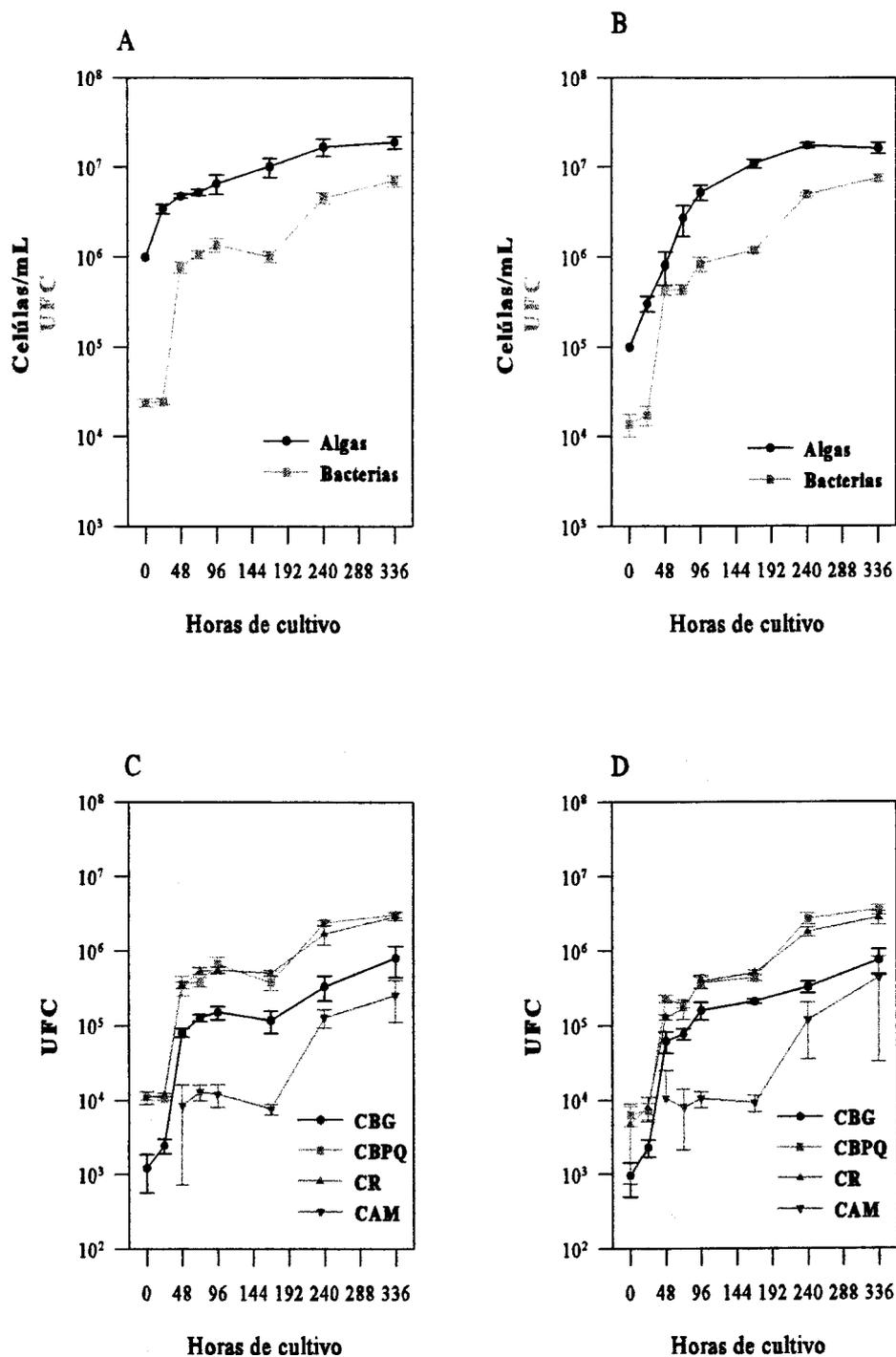


Figura 3.12: A,B curvas de crecimiento del alga *C. calcitrans* y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células diferentes. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de microalgas.

Tabla 3.12.:Parámetros que definen el crecimiento del microalga *R. salina* en cultivo a partir de dos densidades iniciales de inóculo diferentes

	Densidad inicial (células / mL)	Densidad final (células / mL)	μ (h ⁻¹)	t_g (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
Alto inóculo	$10^5 \pm 0$	$3,94 \cdot 10^6 \pm 6,60 \cdot 10^5$	$0,037 \pm 2,3 \cdot 10^{-3}$	$18,69 \pm 1,22$	72	$2,74 \cdot 10^8 \pm 4,75 \cdot 10^7$	$5,34 \cdot 10^8 \pm 9,8 \cdot 10^7$	168 h
Bajo inóculo	$10^4 \pm 0$	$4,20 \cdot 10^6 \pm 6,41 \cdot 10^5$	$0,034 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$19,93 \pm 1,24$	168	$2,99 \cdot 10^8 \pm 4,6 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^8 \pm 6,43 \cdot 10^7$	168 h

3.13.:Parámetros que definen el crecimiento de las poblaciones parciales y población total, de las bacterias asociadas a los cultivos de *R. salina*. (A): alto inóculo; (B): bajo inóculo.

	Densidad inicial (UFC)	Densidad final (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_g (h)	Duración de la fase exponencial (h)
RBG(A)	$8,17 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^6 \pm 6,6 \cdot 10^5$	$0,039 \pm 4,7 \cdot 10^{-3}$	$16,65 \pm 0,82$	72
RBG(B)	$2,96 \cdot 10^3 \pm 4,4 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^6 \pm 4,04 \cdot 10^5$	$0,047 \pm 3,53 \cdot 10^{-3}$	$14,71 \pm 1,22$	72
RBPQ(A)	$2,67 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^3$	$10^7 \pm 1,12 \cdot 10^6$	$0,055 \pm 1,10 \cdot 10^{-3}$	$12,55 \pm 0,22$	72
RBPQ(B)	$1,3 \cdot 10^4 \pm 2,1 \cdot 10^3$	$7,33 \cdot 10^6 \pm 1,6 \cdot 10^6$	$0,057 \pm 7,4 \cdot 10^{-4}$	$12,10 \pm 0,15$	72
Bacterias Totales (A)	$3,49 \cdot 10^4 \pm 2,7 \cdot 10^2$	$1,28 \cdot 10^7 \pm 1,6 \cdot 10^6$	$0,053 \pm 5,9 \cdot 10^{-4}$	$13,07 \pm 0,14$	72
Bacterias Totales (B)	$1,59 \cdot 10^4 \pm 2,6 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^7 \pm 5,4 \cdot 10^5$	$0,055 \pm 8,68 \cdot 10^{-4}$	$12,38 \pm 0,19$	72

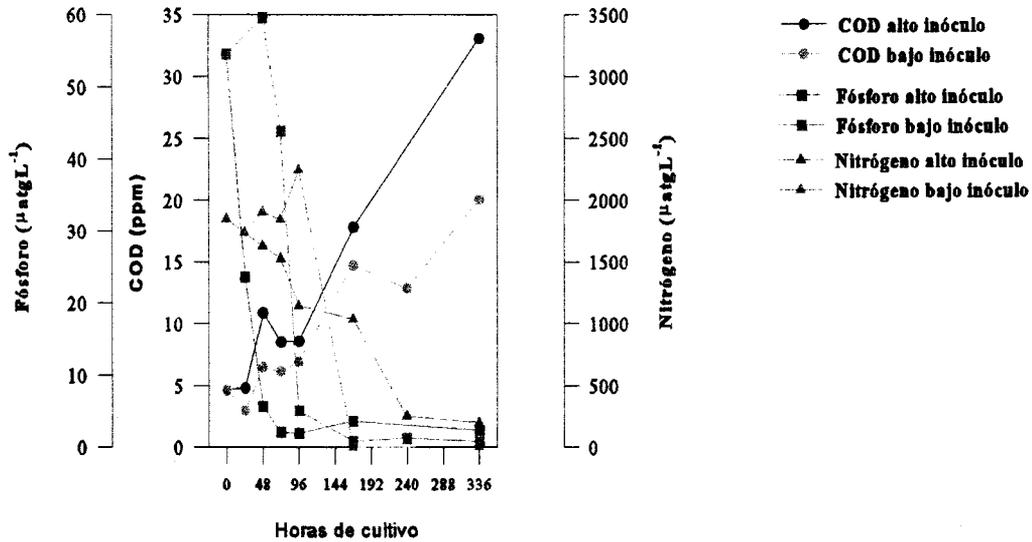


Figura 3.13: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), en dos cultivos, a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *C. calcitrans*.

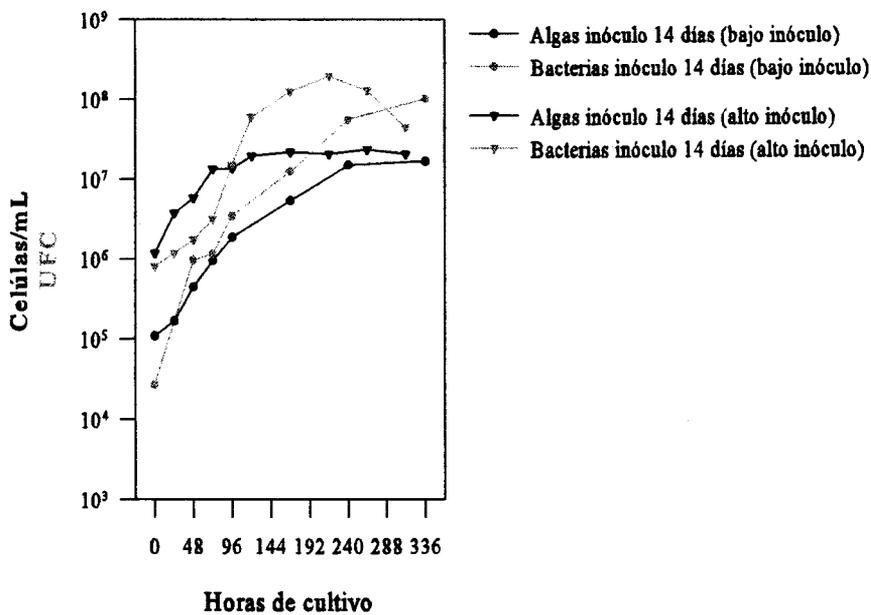


Figura 3.14: Crecimiento de *C. calcitrans* y de la población bacteriana total asociada, en cultivos sembrados a partir de dos inóculos, a dos densidades iniciales de células diferentes, envejecidos.

Tabla 3.14.: Parámetros que definen el crecimiento del microalga *R. salina* y la población bacteriana total, en un cultivo realizado a partir de un inóculo de 14 días.

	Densidad inicial (células / mL) (UFC)	Densidad final (células / mL) (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
<i>R. salina</i> Inóculo de 14 días	9,7·10 ⁵ ± 8,08·10 ⁴	2,8·10 ⁶ ± 4,75·10 ⁵	0,018± 1,7·10 ⁻³	38,5± 3,52	72	1,64·10 ⁸ ± 3,4·10 ⁷	3,96·10 ⁸ ± 8,6·10 ⁷	96 h
Bacterias Totales inóculo de 14 días	9,24·10 ³ ± 6,5·10 ²	8,15·10 ⁵	0,066± 3,4·10 ⁻³	10,51± 0,57	96			

***Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Näg**

Este alga es una de las de mayor tamaño de las que se han estudiado (tabla 2.1; Material y Métodos). Además, este alga se caracteriza por la abundante producción de mucopolisacáridos, como se indica en el capítulo de material y métodos. En la figura 3.15 A y B se muestran las curvas de crecimiento de la microalga y las bacterias totales asociadas a dos densidades de inóculo inicial, alto (10^6 cel/mL) y bajo (10^5 cel/mL). En este caso también se aprecia un paralelismo en las curvas de crecimiento de ambas poblaciones. En la figura 3.15 C y D se muestran las curvas de crecimiento de distintas subpoblaciones bacterianas presentes en el cultivo.

En la tabla 3.18 se encuentran los parámetros característicos que definen el crecimiento de *P. cruentum*. La tasa de crecimiento exponencial de los cultivos con alto y bajo inóculo son estadísticamente iguales. La densidad final alcanzada es estadísticamente igual en ambas condiciones de cultivo. La duración de la fase exponencial en bajo inóculo es más prolongada. El rendimiento total del cultivo es estadísticamente igual en las dos condiciones de cultivo, al igual que sucede con el rendimiento óptimo.

La subpoblación mayoritaria fue PBG y las subpoblaciones PAM y PBPQ fueron minoritarias, figura 3.15 C y D y tabla 3.19. Las tres subpoblaciones estudiadas presentan un crecimiento similar en las dos condiciones de cultivo, aunque la cepa PAM alcanza una mayor densidad de células en bajo inóculo.

En la figura 3.16, se muestra el consumo de nitrógeno y fósforo y la aparición de carbono orgánico disuelto, como se puede apreciar, una vez más, el comportamiento es similar al del resto de las microalgas estudiadas.

Se observó que los cultivos obtenidos con inóculos envejecidos durante 14 días se comportaron de un modo similar a los cultivos con inóculos de 7 días, con la única salvedad de un mayor crecimiento bacteriano, figura 3.17 y tabla 3.20.

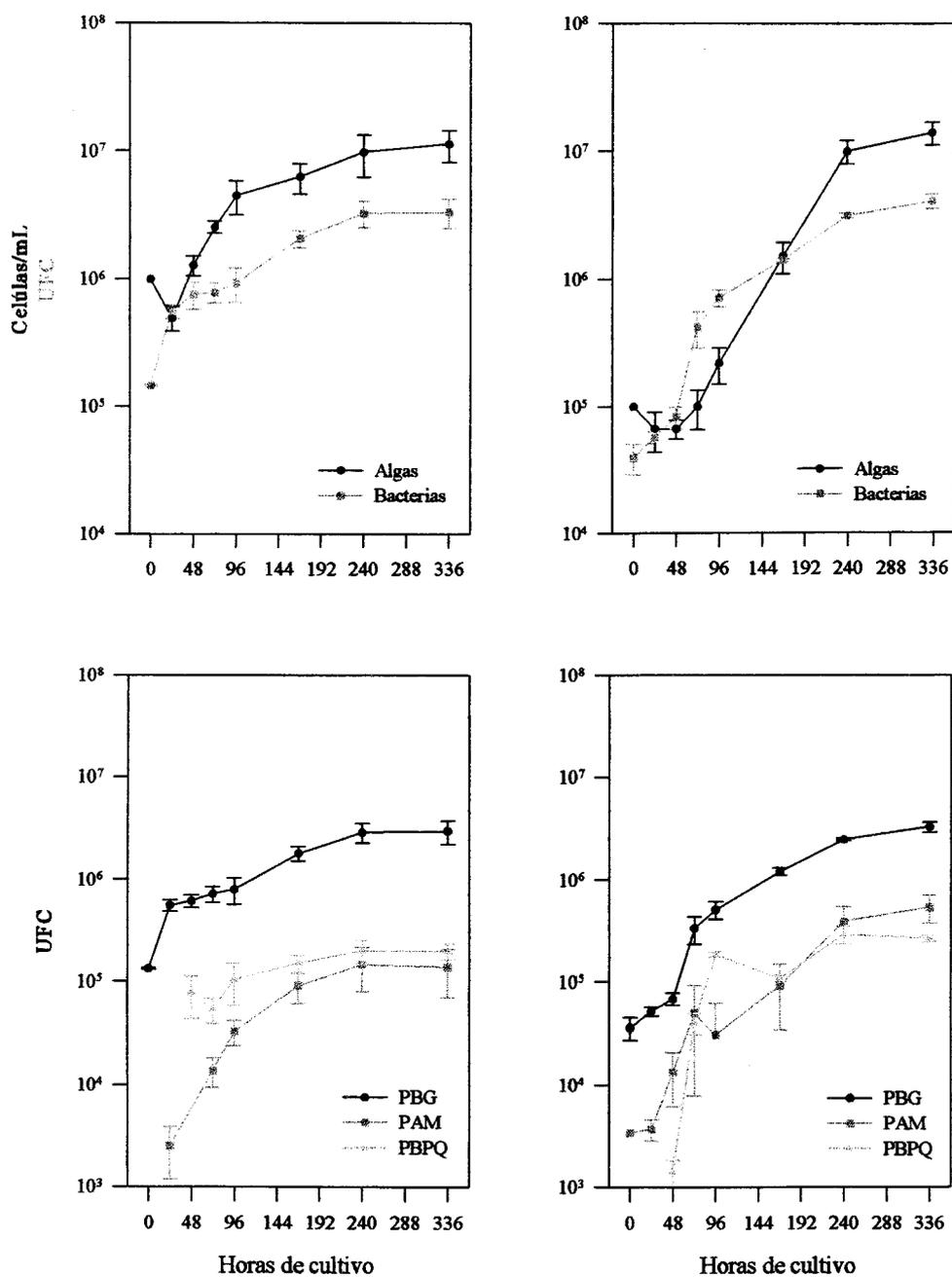


Figura 3.15: A,B curvas de crecimiento del alga *P. cruentum* y de la población bacteriana total asociada, a dos densidades iniciales de células diferentes. C y D, curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones bacterianas asociadas al cultivo de la microalga.

Tabla 3.15.:Parámetros que definen el crecimiento del microalga *Ch. calcitrans* en cultivo a partir de dos densidades iniciales de inóculo diferentes

	Densidad inicial	Densidad final	μ	t_d	Duración de la fase exponencial	Rendimiento total	Rendimiento óptimo	Momento de rendimiento óptimo
	(células / mL)	(células / mL)	(h ⁻¹)	(h)	(h)	(células L / h)	(células L / h)	óptimo
Alto inóculo	10 ⁶ ± 0	19,2·10 ⁶ ± 2,9·10 ⁶	nd	nd	-	1,3·10 ⁹ ± 2,1·10 ⁸	2,4·10 ⁹ ± 4,2·10 ⁸	48 h
Bajo inóculo	10 ³ ± 0	16,4·10 ⁶ ± 2,4·10 ⁶	0,041 ± 2,8·10 ⁻³	16,81 ± 1,2	96	1,16·10 ⁹ ± 1,7·10 ⁸	1,75·10 ⁹ ± 1,15·10 ⁸	240 h

3.16.:Parámetros que definen el crecimiento de las poblaciones parciales y población total, de las bacterias asociadas a los cultivos de *Ch. calcitrans*. (A): alto inóculo; (B): bajo inóculo

	Densidad inicial	Densidad final	μ	t_d	Duración de la fase exponencial
	(células / mL)	(células / mL)	(h ⁻¹)	(h)	(h)
CBG(A)	1,21·10 ³ ± 6,4·10 ²	8,06·10 ⁵ ± 3,6·10 ⁵	0,089 ± 1,2·10 ⁻²	7,79 ± 1,1	48 h
CBG(B)	9,60·10 ² ± 4,6·10 ²	7,53·10 ⁵ ± 2,8·10 ⁵	0,073 ± 2·10 ⁻³	9,46 ± 0,2	48 h
CBPQ(A)	1,16·10 ⁴ ± 1,4·10 ³	3,10·10 ⁶ ± 2,8·10 ⁵	0,070 ± 7,4·10 ⁻³	9,80 ± 1	48 h
CBPQ(B)	6,25·10 ³ ± 1,9·10 ³	3,56·10 ⁶ ± 5,3·10 ⁵	0,075 ± 8,4·10 ⁻³	9,18 ± 0,9	48 h
CR(A)	1,09·10 ⁴ ± 2,1·10 ³	2,93·10 ⁶ ± 3,1·10 ⁵	0,072 ± 5·10 ⁻³	9,46 ± 0,6	48 h
CR(B)	4,77·10 ³ ± 4·10 ³	2,793·10 ⁶ ± 5,8·10 ⁵	0,062 ± 8,7·10 ⁻³	11,18 ± 1,5	48 h
CAM(A)	8,5·10 ³ ± 7,7·10 ³	2,55·10 ⁵ ± 1,4·10 ⁵	nd	nd	-
CAM(B)	1,05·10 ³ ± 1,4·10 ⁴	4,31·10 ⁵ ± 3,9·10 ⁵	nd	nd	-
Bacterias Totales (A)	2,37·10 ⁴ ± 2,5·10 ³	7,09·10 ⁶ ± 10 ⁶	0,072 ± 4·10 ⁻³	9,59 ± 0,56	48 h
Bacterias Totales (B)	1,37·10 ⁴ ± 3,9·10 ³	7,57·10 ⁶ ± 7,5·10 ⁵	0,072 ± 4·10 ⁻³	9,63 ± 0,52	48 h

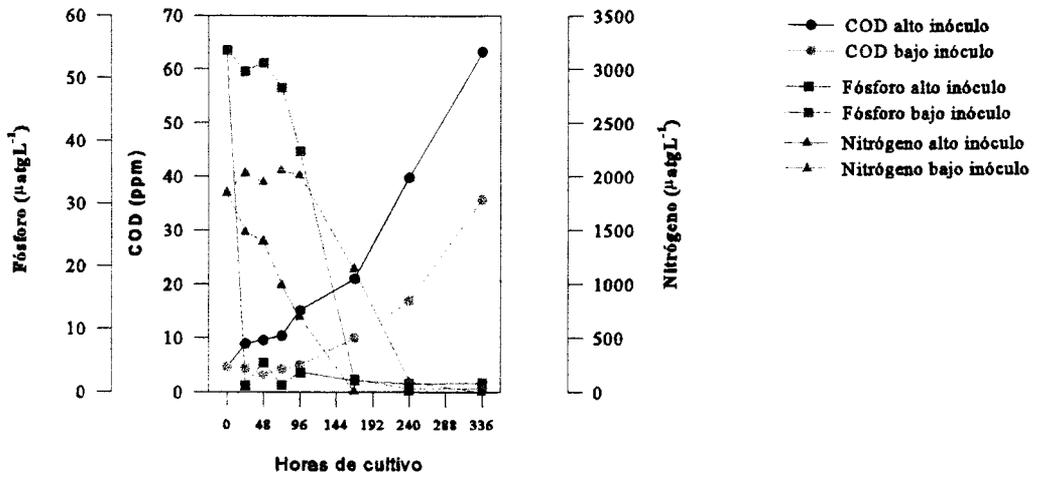


Figura 3.16: Consumo de fósforo y nitrógeno, y evolución del carbono orgánico disuelto (COD), a distinta densidad celular inicial, en cultivos de *P. cruentum*.

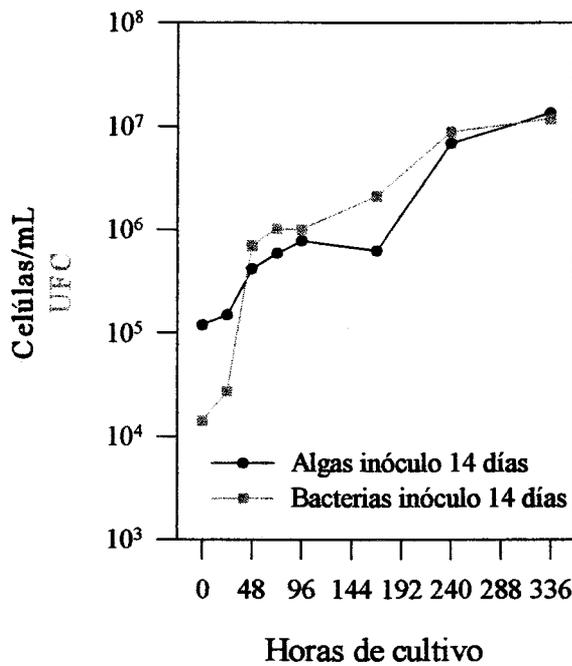


Figura 3.17: crecimiento de *P. cruentum* y de la población bacteriana total asociada, en cultivos sembrados a partir de inóculos envejecidos.

Tabla 3.17.: Parámetros que definen el crecimiento del microalga *C. calcitrans* y la población bacteriana total, en cultivos realizados a partir de inóculos de 14 días. (A): alto inóculo; (B): bajo inóculo.

	Densidad inicial (células / mL) (UFC)	Densidad final (células / mL) (UFC)	μ (h ⁻¹)	t_g (h)	Duración de la fase exponencial (h)	Rendimiento total (células L / h)	Rendimiento óptimo (células L / h)	Momento de rendimiento óptimo
<i>C. calcitrans</i> Inóculo de 14 días (A)	5,8·10 ⁶	25·10 ⁶	0,032	21,6	72	1,49·10 ⁹	4·10 ⁹	72 h
Inóculo de 14 días (B)	4,5·10 ⁵	16,8·10 ⁶	0,033	21	72	1,19·10 ⁹	1,5·10 ⁹	240 h
Bacterias Totales Inóculo de 14 días (A)	8·10 ⁵	4,5·10 ⁷	0,049	14	96			
Bacterias Totales Inóculo de 14 días (B)	2,7·10 ⁴	1,02·10 ⁸	0,028	24,3	96			

3.2.2.-Comportamiento de cultivos axénicos

Los resultados obtenidos a partir de los distintos cultivos de microalgas tratados con antibióticos fueron dependientes del alga y del tratamiento aplicado. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada caso estudiado.

Los cultivos de *R. salina* tratados con distintas soluciones antibióticas se colapsaron en todos los tratamientos, y se observó al microscopio lisis celular.

En los tratamientos aplicados a *T. suecica* se apreciaron diferentes resultados dependiendo del tratamiento antibiótico aplicado. De este modo, los cultivos tratados con la solución antibiótica de Guillard (Sigma Chemical Co.) se colapsaron, mientras que los tratados con la solución antibiótica de Provasoli (Sigma Chemical Co.) crecieron de modo similar al control (figura 3.18A). Sin embargo, el efecto sobre la población bacteriana fue el mismo en ambos tratamientos (figura 3.18B) produciéndose un claro descenso de la población bacteriana. A pesar de esto no se logra axenificar el cultivo completamente, puesto que tras un periodo de 14 días de cultivo aun queda un número significativo de bacterias en el cultivo de microalgas (figura 3.18B).

La axenificación completa se consiguió en cultivos de *N. gaditana* con el tratamiento antibiótico en medio sólido descrito en el capítulo del material y métodos. Sin embargo, las células presentaban un gran número de alteraciones morfológicas, que pueden ser debidas al tratamiento empleado. Tres cultivos de este microalga, previamente axenificados, se re infectaron con las cepas bacterianas *Alcaligenes sp.*, *Alteromonas sp.*, aisladas todas ellas a partir de cultivos de *N. gaditana*, y con una bacteria contaminante externa sin identificar. En los tres casos el crecimiento de la microalga es inferior al crecimiento de un cultivo estandar que no ha sido sometido a tratamiento con antibióticos (control) (figura 3.19A). No se realizaron estudios con mezclas de bacterias, ya que para poder determinar el efecto en conjunto de las distintas poblaciones es necesario conocer previamente la relación específica de cada cepa bacteriana con la microalga en el cultivo, así como las posibles relaciones que se pudiesen establecer entre las distintas poblaciones bacterianas. De los experimentos realizados aquí solamente pueden destacarse las diferencias observadas en el crecimiento de las poblaciones bacterianas utilizadas, no apreciándose ninguna diferencia significativa en el crecimiento del alga en los cultivos previamente axenificados. Así, *Alteromonas sp.* muestra un crecimiento superior a *Alcaligenes sp.*, mientras que el crecimiento de la bacteria contaminante sin identificar es intermedio al de las dos anteriores y superior al de la población bacteriana total del control.

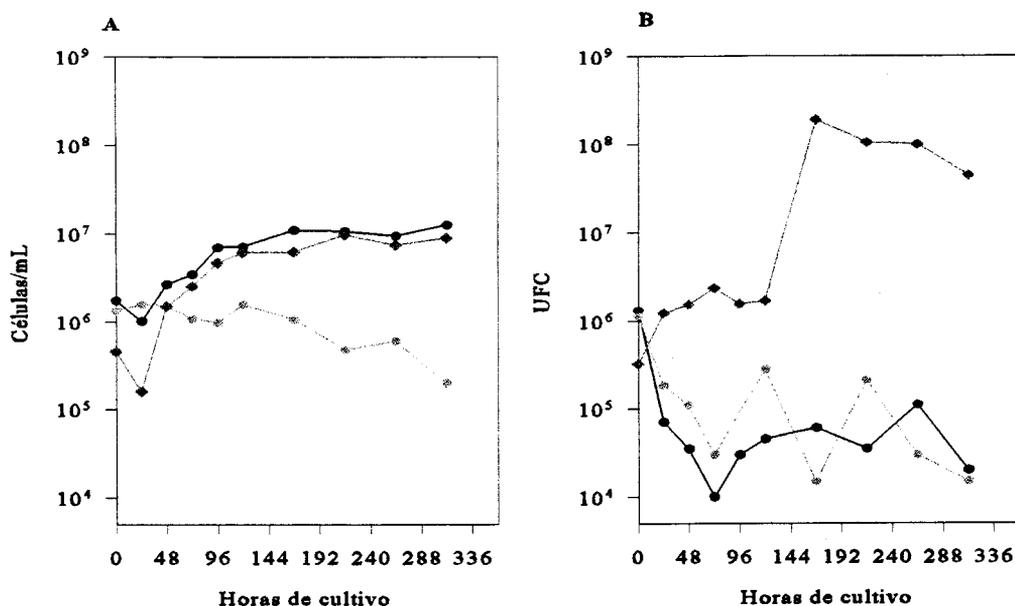


Figura 3.18: A Curva de crecimiento de la microalga *T. suecica* sin tratar (en azul) y tratadas con las soluciones antibióticas de Guillard (SIGMA) (en rojo) y Provasoli (SIGMA) (en negro). B; Evolución de las poblaciones bacterianas totales asociadas.

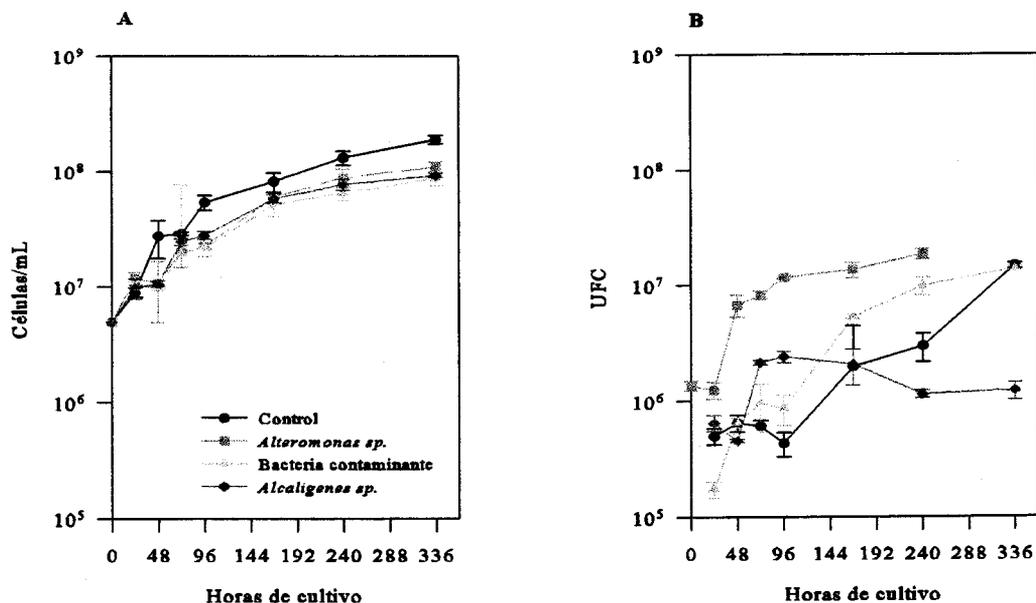


Figura 3.19: A; Crecimiento de la microalga *N. gaditana* control y de cultivos axénicos reinfectados con distintas cepas bacterianas. B; Evolución de las poblaciones bacterianas en el cultivo de la microalga.

3.3.- ANÁLISIS DE PIGMENTOS DE LA CEPA BACTERIANA *Alteromonas* sp. AISLADA A PARTIR DE CULTIVOS DE MICROALGAS.

3.3.1.-Descripción de la cepa bacteriana

Como se ha dicho anteriormente, a partir de una serie de cultivos de microalgas se aisló un grupo de bacterias que mostraban un intenso color rojo; estas cepas se han nombrado como TSHR2, TSHR3, PR1, MacuAR1, CalFR1, B3R1, IR1 y STIGR1, y todas ellas han sido identificadas a nivel presuntivo como *Alteromonas* sp. Mediante análisis cromatográfico se ha comprobado que todas estas cepas poseen una composición pigmentaria similar.

Este grupo bacteriano se encuentra ampliamente distribuido entre los distintos cultivos de microalgas de la colección del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). En algunas ocasiones representa a una de las subpoblaciones principales asociadas a las microalgas, como en el caso de *T. suecica*, en otras ocasiones, sin embargo, como por ejemplo en cultivos de *N. gaditana*, es una población minoritaria que no se detecta en un estudio como el del apartado anterior, aunque si aparece si se realiza una siembra sin dilución.

Los representantes de este grupo se pueden describir como un bacilo móvil Gram negativo- oxidasa negativo que requieren para su crecimiento una salinidad superior al 0.5% e inferior al 16%. Es a su vez muy sensible a la composición de sales del medio de cultivo, ya que en medios con la misma salinidad pero con deficiencias en Calcio y Magnesio no es capaz de crecer. En general se puede decir que en composiciones de sales desviadas del agua de mar no crece y, por ello, se la puede considerar una bacteria netamente marina.

Otra característica importante que presenta esta bacteria es la producción de una gran cantidad de exopolímero, de composición desconocida, que difunde por el medio de cultivo líquido y que forma una capa viscosa alrededor de la bacteria en medio sólido. Mediante un análisis de composición elemental, CNH, se ha determinado que está compuesto en un $78 \pm 2\%$ de proteína, lo que hace pensar que se trata de un exopolímero de composición compleja.

3.3.2.-Análisis espectrofotométrico y cromatográfico del perfil pigmentario

Sobre el extracto pigmentario total de *Alteromonas* sp., obtenido mediante el procedimiento descrito en el capítulo de Material y Métodos, se han determinado el espectro y máximo de absorción, del mismo. Las medidas se han realizado en los disolventes más frecuentes descritos en la bibliografía, y los resultados se muestran en la tabla 3.21. El máximo de absorción oscila entre 470 y 500 nm dependiendo del disolvente empleado. El espectro obtenido es similar a los espectros de carotenoides.

Tabla 3.21: Máximos de absorción en distintos disolventes del extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3 .

Solvente	Extracto total
Metanol	475
Triclorometano	484
Eter de petróleo	474
Eter dietílico	472
n-Hexano	474
Benceno	488
Sulfuro decarbono	368/ 510
Piridina	493

A través de un análisis cromatográfico mediante HPLC, se determinó que la composición pigmentaria de la bacteria en estudio posee tres grupos de pigmentos principales (figura 3.20). Un primer grupo compuesto por los picos 1, 2a, 2b y 3, con tiempos de retención entre los minutos 12 a 16, que se perciben de color rojo intenso (este grupo es el principal responsable de la pigmentación roja de la bacteria, y sobre él, por tanto, se centraron los estudios posteriores). Otro alrededor del minuto 18, compuesto por los picos 4 y 4a, que se perciben de color amarillo y, finalmente, el último grupo entre los minutos 20 a 25, picos 5, 6 y 7, que son pigmentos minoritarios de color rojizo y cuyo estudio no se abordó. En la tabla 3.22 se muestran los máximos de absorción obtenidos para cada pico cromatográfico, junto con los tiempos de retención en columna.

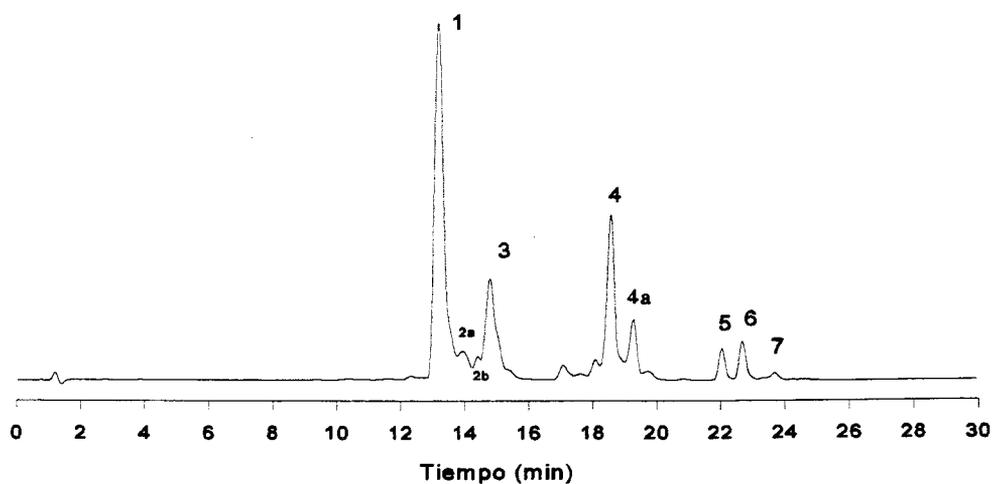


Figura 3.20: Cromatograma obtenido, mediante HPLC, a partir de un extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3 (*Alteromonas* sp.).

Tabla 3.22: Máximos de absorción obtenidos a partir del HPLC y tiempos de retención de los pigmentos del extracto total de la cepa bacteriana TSHR3.

	Tiempos de retención (min) en el HPLC	λ^{nm} máximas obtenidas en HPLC
Pico1 (Rojo)	13.20	485
Pico 2a (Rojo)	14.00	474
Pico 2b (Rojo)	14.50	368/ 474
Pico 3 (Rojo)	14.83	481
Pico 4 (Amarillo)	18.61	447/ 474/ 507
Pico5	22.08	444/ 474/ 504
Pico 6	22.72	412/ 438/ 471
Pico7	23.68	372/ 393/ 417

El grupo de pigmentos entre los minutos 12 a 16 presenta cuatro picos cuyos espectros y máximos de absorción se muestran en la figura 3.21. El pico 1 es el mayoritario y principal responsable del color rojo. El pico 3 posee un espectro de absorción muy similar al del pico 1, siendo la diferencia el máximo de absorción con un desplazamiento de 4nm, esta similitud y la proximidad de los tiempos de elución sugiere que este compuesto puede ser muy similar al pico 1. Los picos 2a y 2b podrían ser isómeros *cis* del pico 1 ó 3 ya que la aparición de un segundo máximo a 368 nm en el caso del pico 2b y el desplazamiento del máximo del pico 2a respecto a los picos 1 ó 3 (Goodwin, 1976), podría corresponder a este tipo de isómero.

En la figura 3.22 se muestran los espectros y máximos de absorción, para los pigmentos con tiempos de retención entre los minutos 18 a 25. Los espectros obtenidos son muy similares a los de las xantofilas en su forma, sin embargo los máximos de absorción se encuentran en algunos casos muy desplazados hacia longitudes de onda más largas (picos 4 y 5) o más cortas (picos 6 y 7).

Para purificar y obtener cantidades suficientes de las fracciones a estudiar con mayor detalle, se utilizaron tanto técnicas de TLC como de HPLC, siendo esta la más eficaz. En la tabla 3.23 se presentan los máximos de absorción en distintos disolventes de las dos fracciones mayoritarias purificadas, que corresponden a los picos cromatográficos 1 y 4.

Tabla 3.23: Máximos de absorción en distintos disolventes de los picos 1 y 4.

Solvente	Pico 1	Pico 4
Triclorometano	488	nd
Eter dietílico	476	444/470/502
n-Hexano	476	nd
Benceno	491	nd
Acetona	477	448/473/505
etanol	477	442/472/503
Metanol	475	446/469/500

nd: no determinado

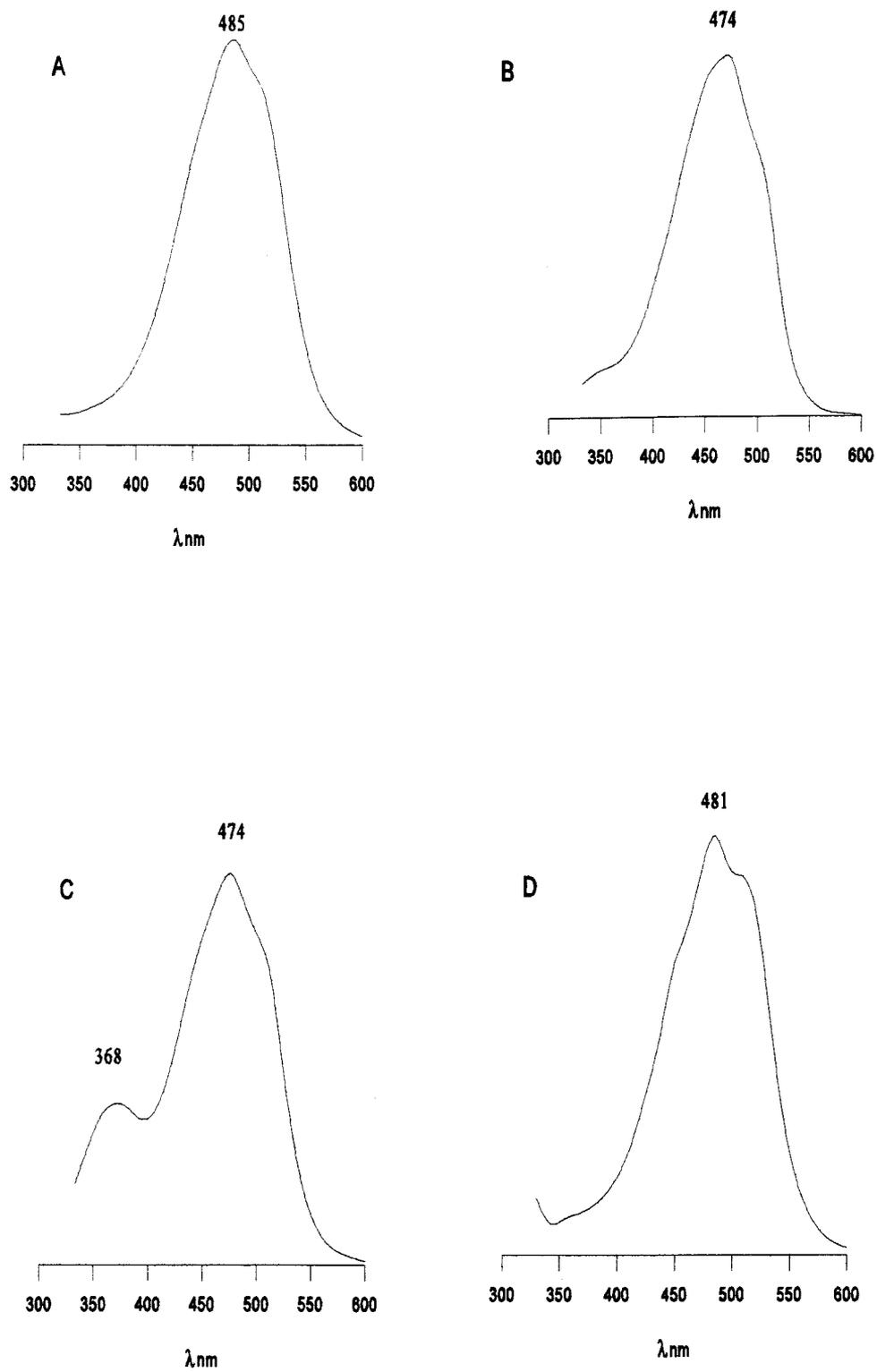


Figura 3.21: Espectros correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2a, 2b y 3; A, B, C y D respectivamente

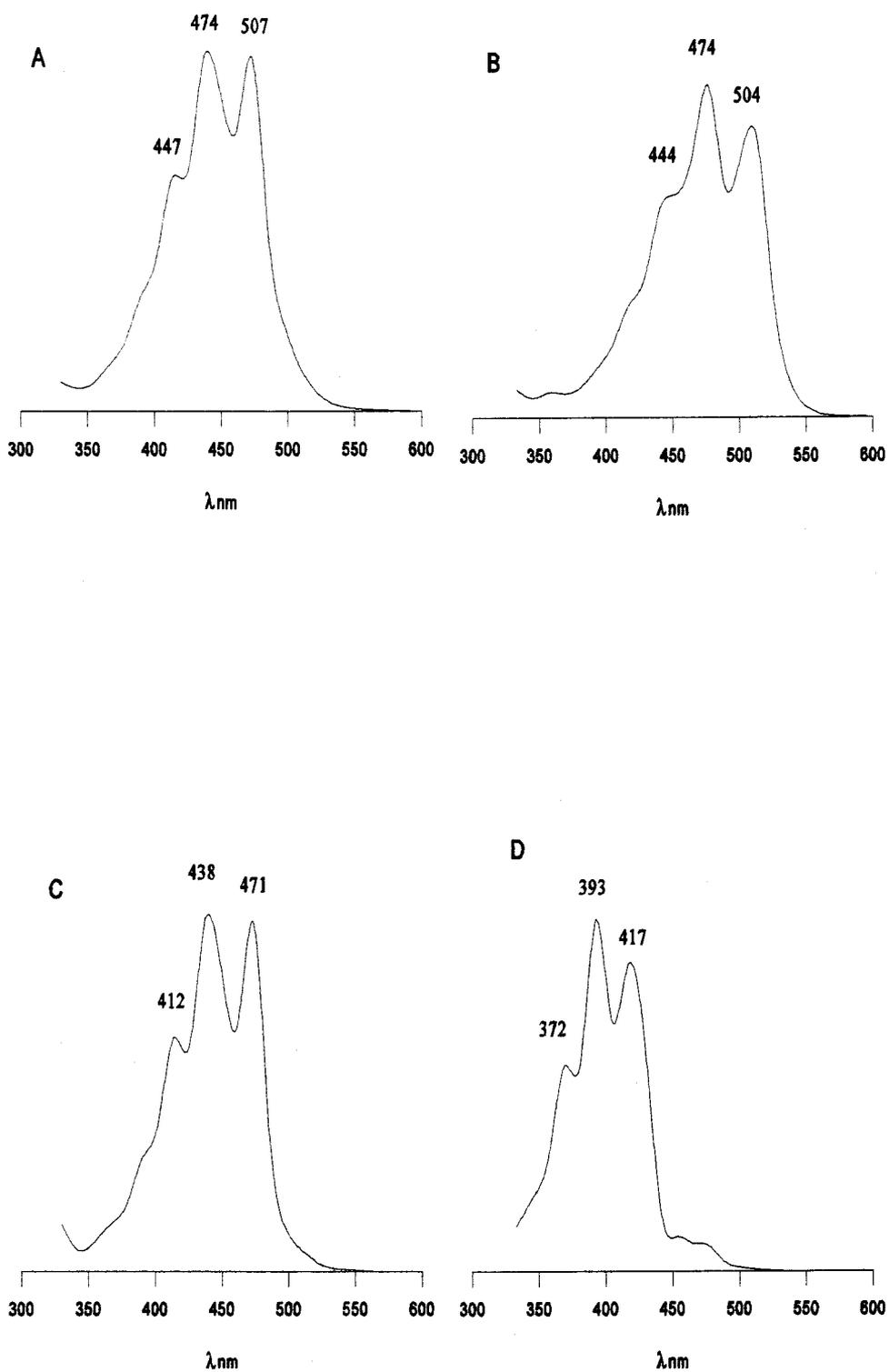


Figura 3.22: Espectros correspondientes a los picos cromatográficos 4,5,6 y 7; A, B, C y D respectivamente.

Los picos 1 y 3 no han mostrado similitud con ninguno de los pigmentos descritos en la bibliografía (Foppen, 1971; Bauernfeind, 1981). Existen numerosas referencias a bacterias halófilas que son de un intenso color rojo (Kelly *et al*, 1970, Singh & Caplan, 1980, Stoeckenius, 1976), esta coloración característica es debida a la bacteriorrubrina, que es un compuesto capaz de captar energía solar y transformarla en un gradiente de protones, transformando de este modo la energía solar en energía química (Singh & Caplan, 1980, Stoeckenius, 1976). La bacteriorrubrina está formada por una proteína, la bacteriorrodopsina, que se encuentra unida a un cofactor, el retinal. El retinal es un aldehído de la vitamina A, que se encuentra también entre los pigmentos visuales. Debido al origen halófilo del grupo bacteriano aislado, uno de los primeros ensayos consistió en comprobar si podía tratarse de retinal. Para ello se compararon los máximos de absorción y tiempos de retención de las distintas formas de retinal, all-trans, 9-cis y 15-cis, de patrones de Sigma, con los máximos de absorción y tiempos de retención de las distintas fracciones de pigmentos producidos por este grupo bacteriano. Finalmente se pudo concluir que ninguno de los pigmentos se corresponden con el retinal, pues no coinciden ni los máximos de absorción ni los tiempos de retención.

El pico 4 sin embargo, coincide en sus máximos de absorción con la 3,4,3',4'-tetrahidrobisnhydrobacterioruberina, 3,4,3',4'-tetrahidrospirilloxantina, lycoxantina, lycopeno y lycofila (Foppen, 1971; Bauernfeind, 1981). La 3,4,3',4'-tetrahidrobisnhydrobacterioruberina es un carotenoide de origen bacteriano, aislado a partir de *Corynebacterium poissentiae*. Según Norgard *et al* (1970), éste carotenoide y la lycoxantina son compuestos iguales o muy similares, pero al carecer de patrones de estos pigmentos no se pudieron comprobar ni los tiempos de retención, ni los espectros de estos compuestos, para compararlos con el pigmento correspondiente al pico 4. El único carotenoide que se puede descartar de todos los citados es el lycopeno, ya que se comprobó que su desplazamiento en una cromatografía en capa fina (Eter de petróleo:Acetona:Dietilamina, 10:4:1) es distinto al pigmento del pico 4.

3.3.3.-Caracterización química de los grupos funcionales de las principales fracciones

Para la identificación de los grupos funcionales de los distintos pigmentos se realizó una primera aproximación empleando una serie de pruebas químicas, desarrolladas por diversos autores para este fin.

Reducción con Borohidruro : El resultado obtenido se muestra en el cromatograma de la figura 3.23, en el que se puede comprobar como no hay cambios en los tiempos de retención de los distintos picos, después del tratamiento . Sin embargo, los espectros de absorción (figura 3.24) indican que en los picos 1, 2a, 2b y 3 se produce un aumento en la estructura fina y un desplazamiento en los máximos de absorción, lo cual indica la posible presencia de grupos ceto en estos pigmentos. El pico 4 también se ve afectado por un desplazamiento en los máximos de absorción, pero como se podrá comprobar más adelante en este caso quizás se debe a la presencia de epoxidos más que de grupos ceto.

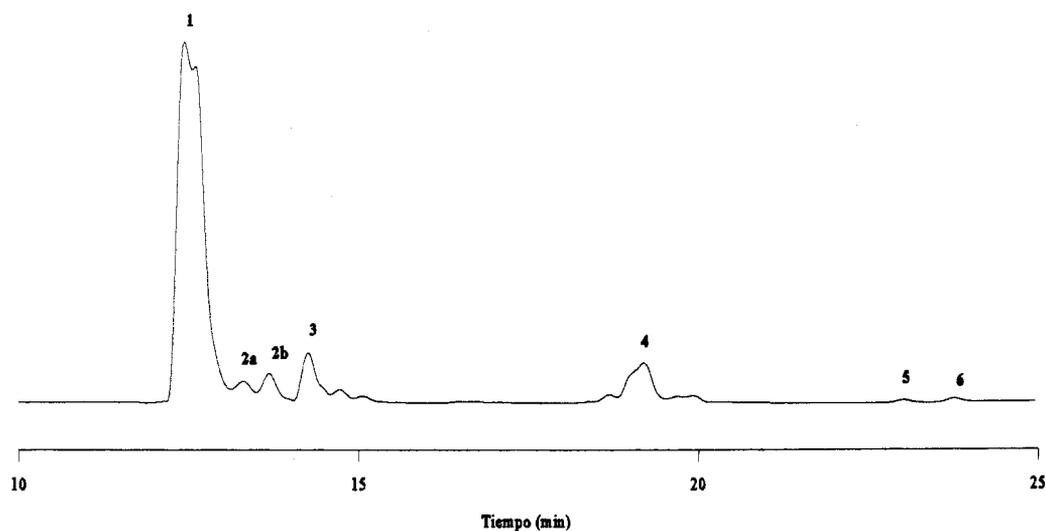


Figura 3.23: Cromatograma del extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3, tratado con borohidruro

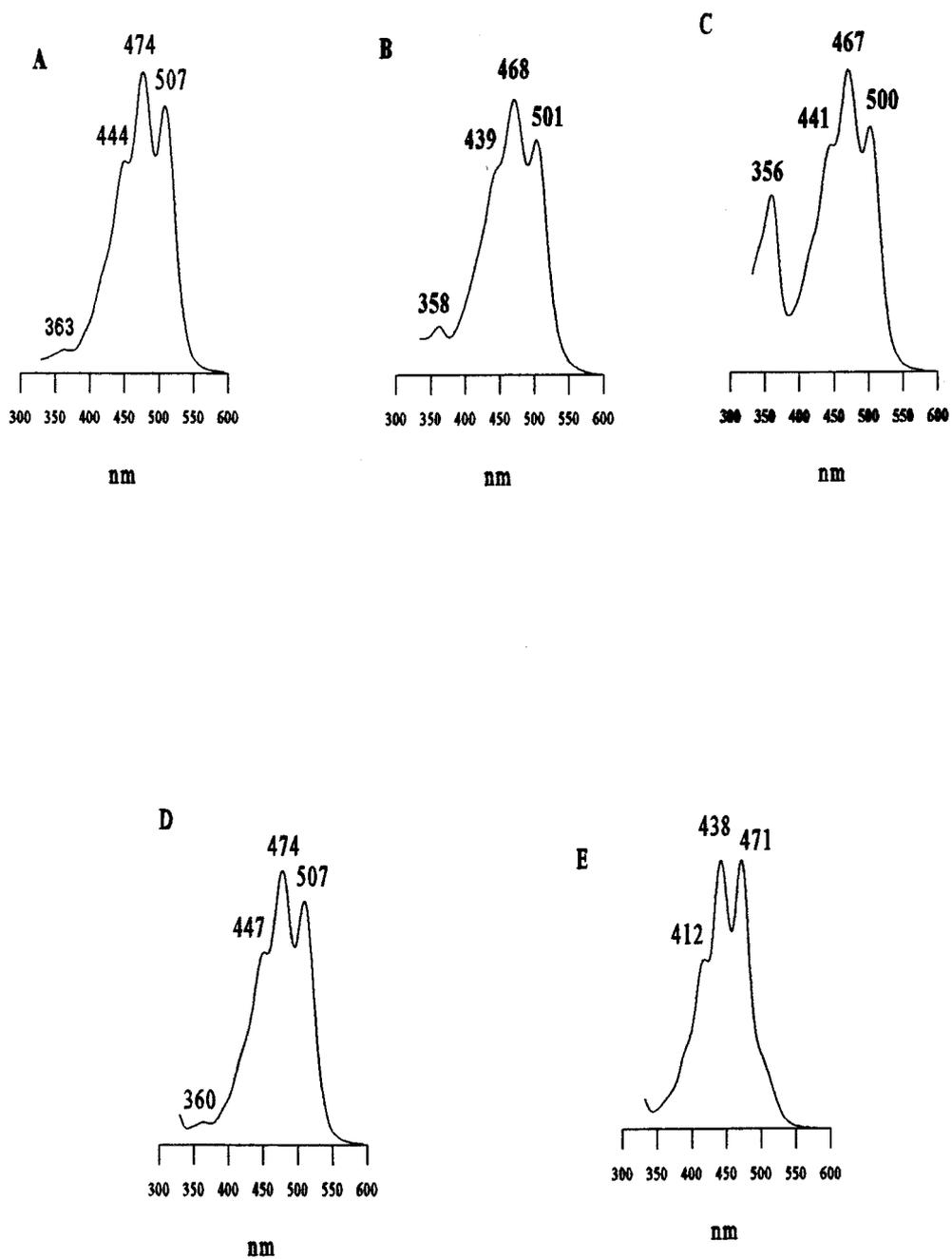


Figura 3.24: Espectros correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2a, 2b, 3 y 4 (A, B, C y D, respectivamente), después del tratamiento con borohidruro

Tratamiento ácido suave: El cromatograma obtenido después de este tratamiento se muestra en la figura 3.25, en el que destaca la desaparición del pico 2a. En la figura 3.26 se muestran los espectros de absorción obtenidos después del tratamiento. En este caso el único espectro que se modifica es el del pico 4, que sufre el mismo desplazamiento que con el tratamiento de reducción (figura 3.24), por ello se puede afirmar que el desplazamiento del máximo en la reducción con borohidruro se debe a la presencia de grupos epoxido y no a grupos ceto. La presencia de epoxidos se comprobó posteriormente mediante ensayo en TLC una vez purificado el pico 4.

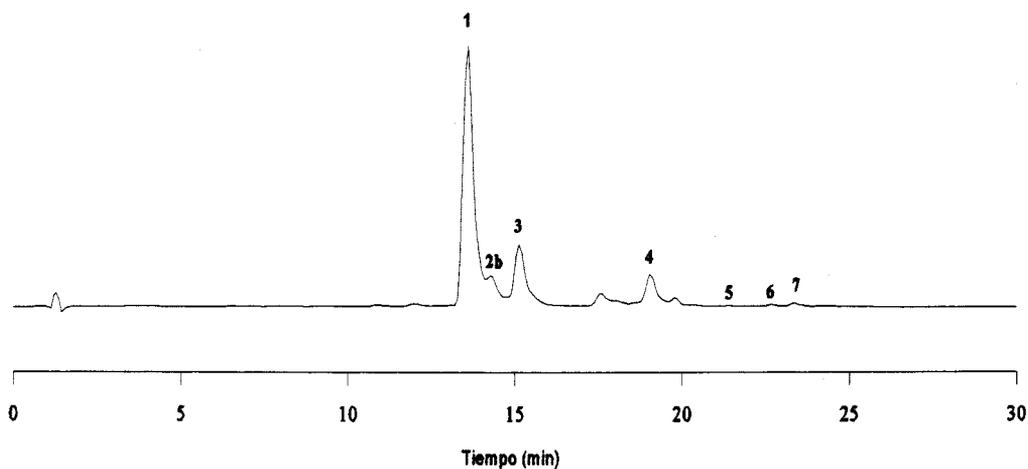


Figura 3.25: Cromatograma obtenido al realizar un tratamiento ácido suave sobre un extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3.

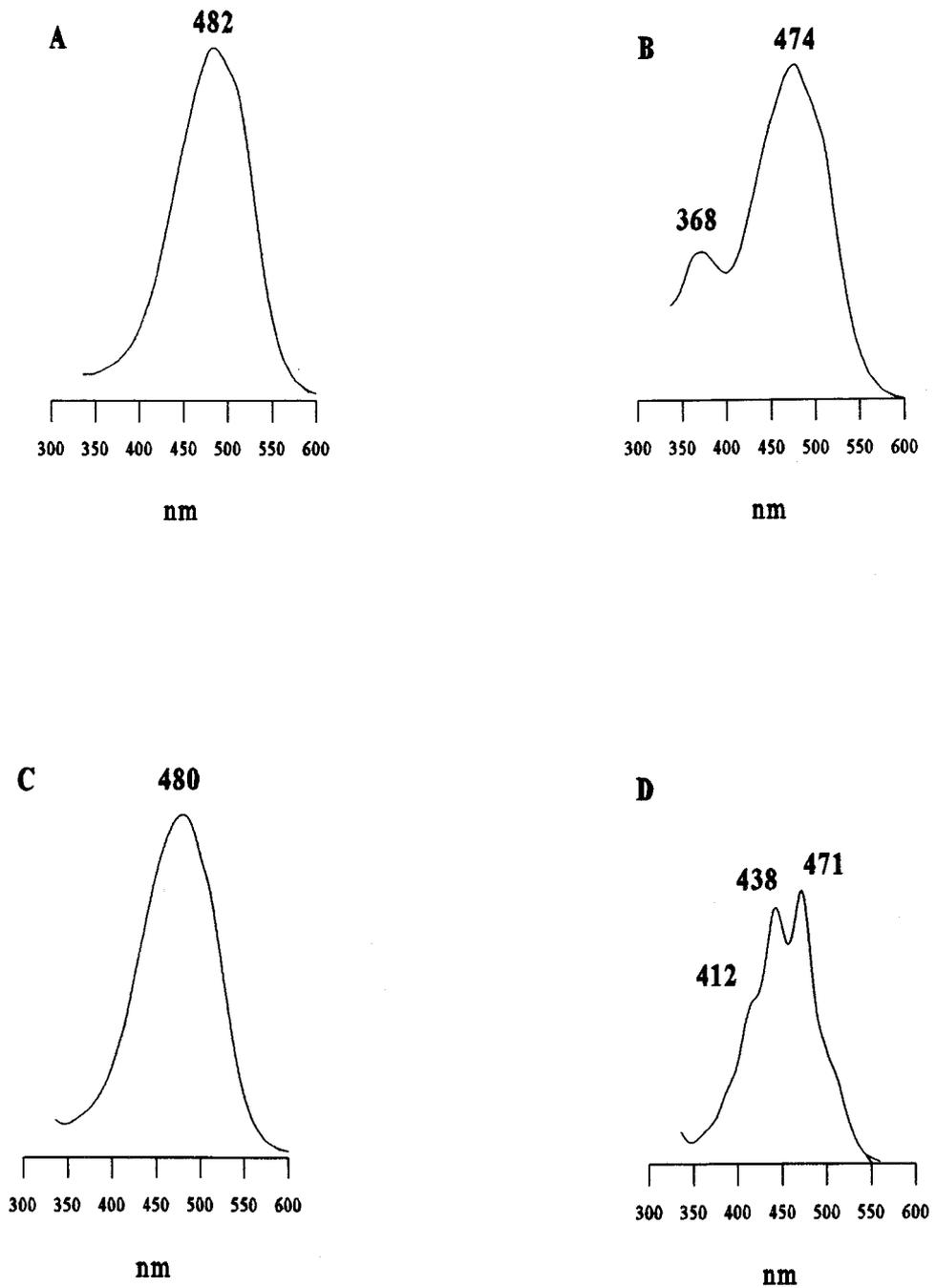


Figura 3.26: Espectros correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2b, 3 y 4 (A,B,C y D, respectivamente), de un extracto de pigmentos que ha sufrido una acidificación suave.

Tratamiento ácido fuerte: Como puede verse en el cromatograma de la figura 3.27, los pigmentos se ven muy dañados por el tratamiento. Sin embargo, se puede comprobar que no se produce ninguna modificación en los espectros y máximos de absorción del grupo de pigmentos con tiempo de retención entre los minutos 12 a 16 (figura 3.28) que son los únicos que se aprecian con cierta nitidez. Por ello se puede suponer que no hay hidroxilos alílicos en este grupo de pigmentos. Los restantes pigmentos no se detectaron con la suficiente nitidez.

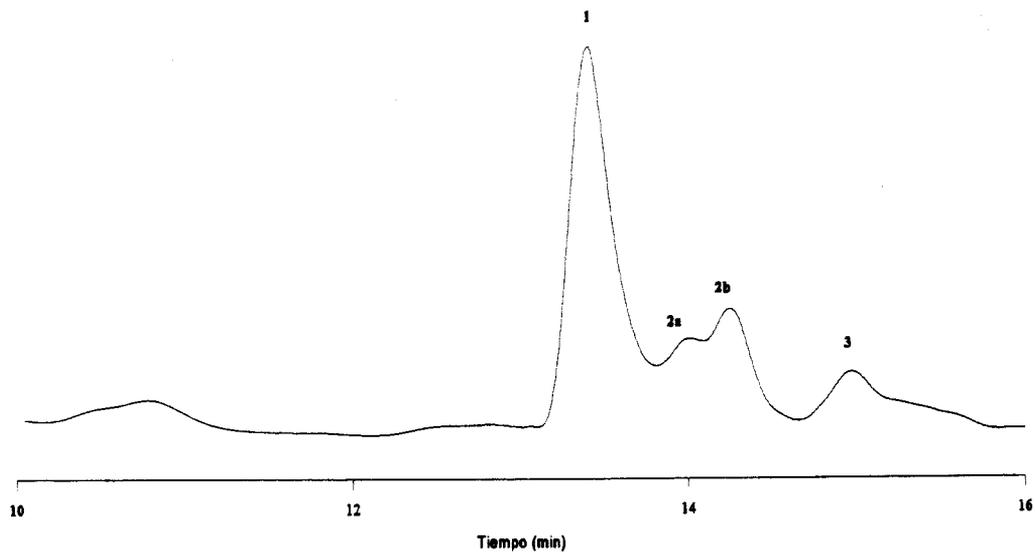


Figura 3.27: Cromatograma obtenido al someter a un tratamiento ácido fuerte, a un extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3

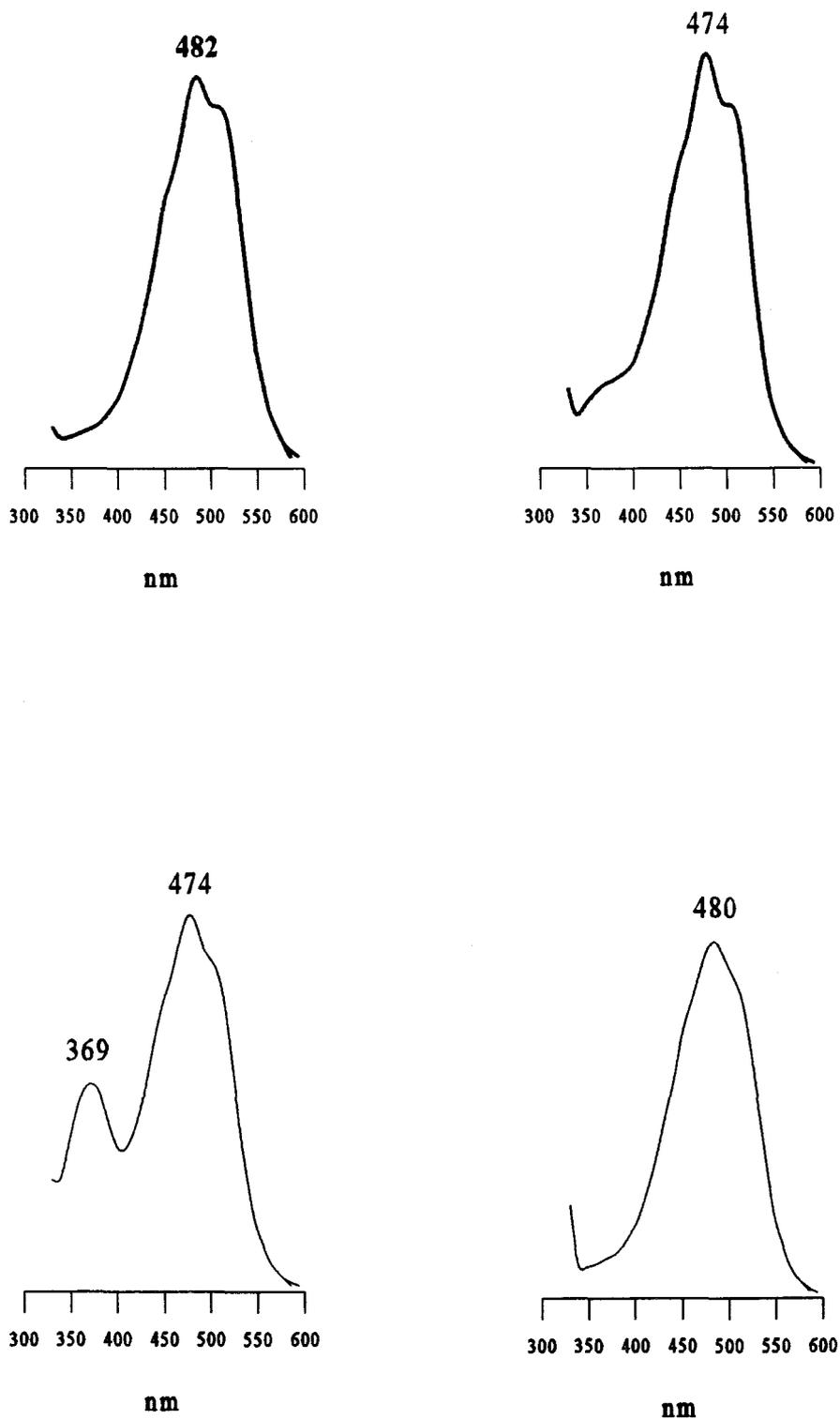


Figura 3.28: Espectros correspondientes a los pico cromatográficos 1, 2a, 2b y 3 (A, B, C y D respectivamente), después de un tratamiento ácido fuerte sobre un extracto total de pigmentos.

Saponificación del extracto crudo: En este tratamiento, el pico 1 desaparece totalmente al saponificar, como puede verse en la figura 3.29, y los picos 2a y 2b se ven muy afectados, en lo que a cantidad se refiere. Los demás picos sin embargo no se ven afectados. Además de desaparecer con este tratamiento el pico 1, se produce una modificación en los espectros de los picos 2a, 2b, 3 y 6 (figura 3.30). La modificación del pico 3 es la menos significativa, pues lo que se produce es un desplazamiento de 2 nm, de tal modo que coincide con el máximo del pico 1, sin embargo no se produce un cambio en el tiempo de retención.

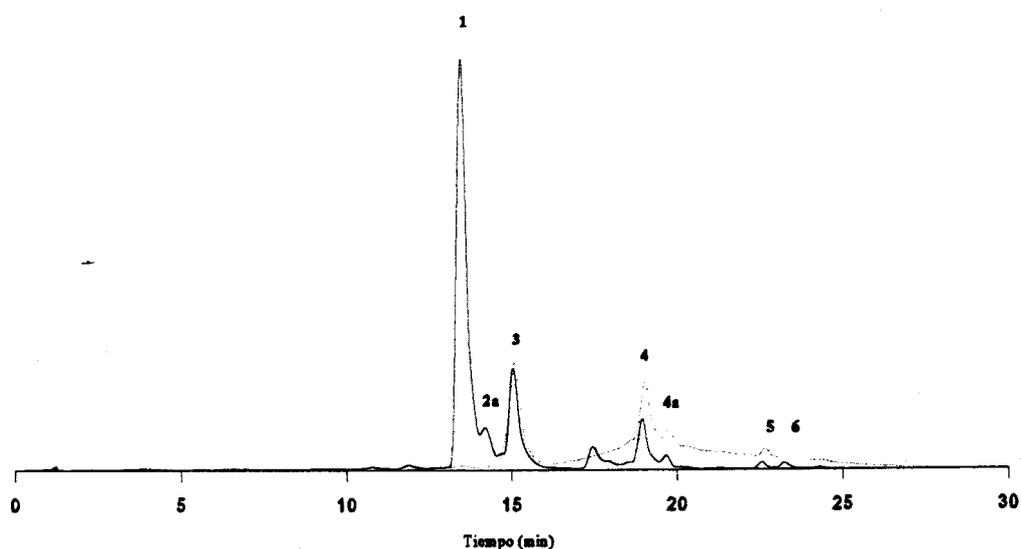


Figura 3.29: Comparación entre cromatogramas saponificado y normal de un extracto total de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3.

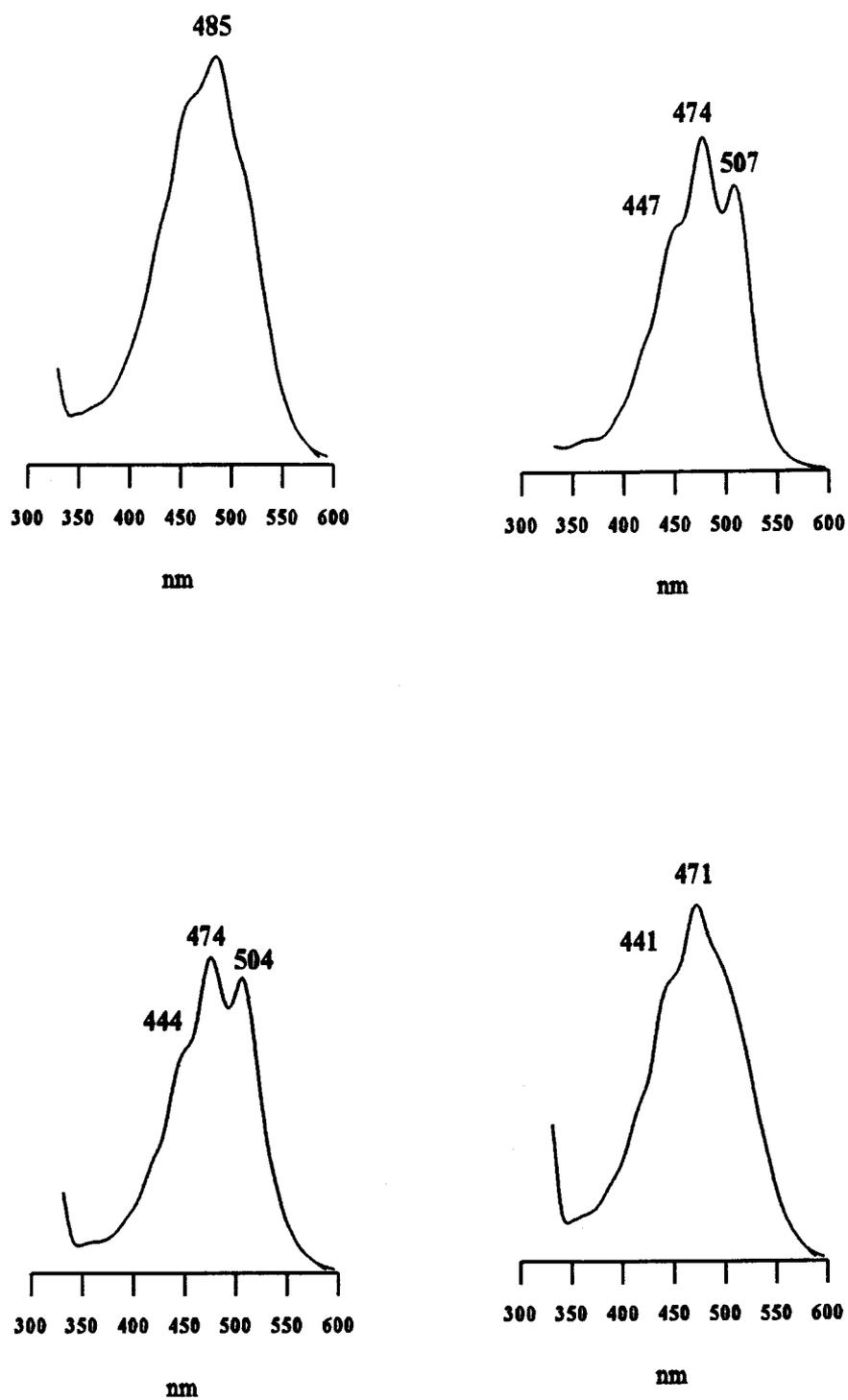


Figura 3.30: Espectros correspondientes a los picos cromatográficos 3, 4, 5 y 6 (A, B, C y D respectivamente) después de saponificar un extracto total de pigmentos.

En la tabla 3.24 se muestra un cuadro resumen de las variaciones en los máximos de absorción con los distintos tratamientos. De este modo se puede indicar la presencia de grupos ceto en los picos 1, 2a, 2b y 3, de epoxidos en el pico 4 y la no presencia de grupos hidroxilos alílicos en todos ellos. Las fracciones 5 y 6 son lo suficientemente pequeñas como para determinar con fiabilidad los cambios que sufren en todos los tratamientos.

Tabla 3.24: Máximos de absorción, obtenidos en HPLC, de los pigmentos del extracto total de la cepa bacteriana TSHR3, tratados de diversas formas. nd:no determinado. ----: desaparece

	Normal	Reducción con Borohidruro	Acidificación suave	Acidificación fuerte	Saponificación
Pico 1	482	444/474/507	482	482	----
Pico 2a	474	439/468/501	474	474	447/474/507
Pico2b	369/474	356/441/467/500	369/474	369/474	447/472/502
Pico 3	480	447/474/507	480	480	482
Pico 4	447/474/507	412/438/471	412/438/471	nd	447/474/507
Pico 5	444/474/504	nd	nd	nd	444/474/504
Pico 6	412/438/471	nd	nd	nd	441/471

3.3.4.- Identificación del pigmento mayoritario (Pico 1)

Espectroscopía de Infrarrojos

El espectro obtenido se muestra en la figura 3.31. En el se puede observar la presencia de grupos hidroxilo, probablemente intramoleculares, en la frecuencia de 3368 cm^{-1} , y la presencia de grupos ceto en la frecuencia de 1740 cm^{-1} . Se detecta la presencia de dobles enlaces entre carbonos a 1657 cm^{-1} , y a su vez estos dobles enlaces no se encuentran conjugados, puesto que no aparece un doblete en las frecuencias de $1600\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. En resumen la información obtenida mediante esta técnica permite afirmar la presencia de grupos ceto, de dobles enlaces entre carbonos y que estos no se encuentran conjugados. Y sin poder afirmarlo de forma concluyente se detectan grupos hidroxilo.

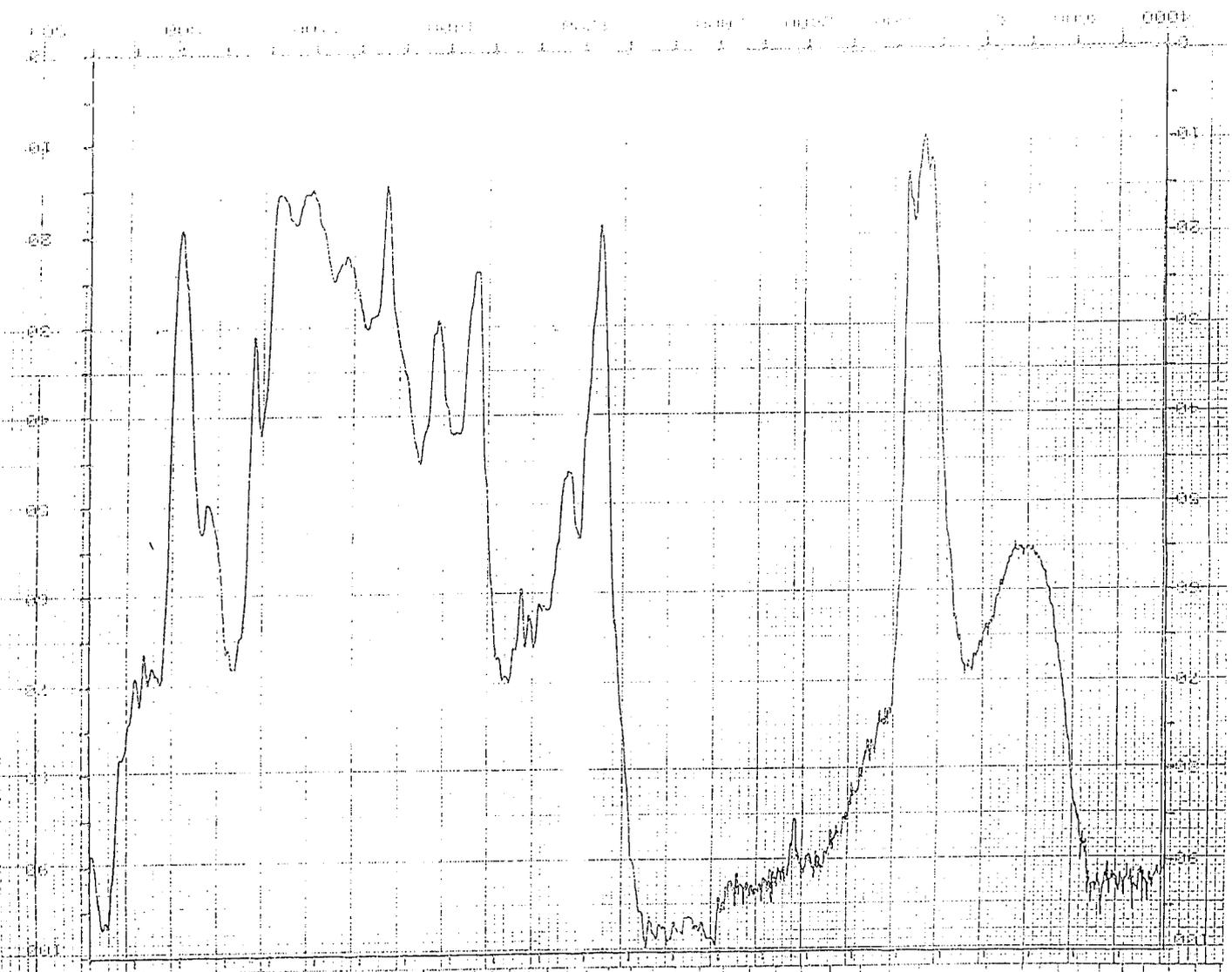


Figura 3.31: Espectro de infrarrojo obtenido para el pigmento mayoritario purificado.

Resonancia magnética nuclear

Se ha utilizado la técnica de RMN de protón y de carbono 13 para determinar, en lo posible, la estructura del esqueleto molecular del pigmento principal y a su vez se han aplicado las técnicas del COSY (espectroscopía de correlación) (figura 3.33) y APT (Attach to Proton Test) (figura 3.33), para facilitar la labor.

En el RMN de protón (figura 3.34) se han obtenido una serie de señales entre las que son de destacar, un pico muy pronunciado que se obtiene a 1,24 ppm que al resolverse es un triplete que corresponde a un radical alquilo largo. A 0,87 ppm aparece un triplete, que se asigna a un protón metílico (-CH₃) unido a un grupo (-CH-), y a 1 ppm otro que puede corresponder a un protón de metilo terminal. Alrededor de 1,45 ppm aparece un cuadruplete que corresponde a dos grupos (-CH-) unidos a un metilo (-CH₃) o a un (-CH₂-).

En el RMN de carbono 13 (figura 3.35) entre 0 y 20 ppm aparece una serie de señales que corresponden a distintos tipos de metilos, entre 20 y 30 ppm hay otra serie de señales que se asimilan como distintos tipos de (-CH₂), entre 30 y 40 ppm aparecen una serie de señales que corresponde a grupos (-CH-) y finalmente alrededor de 60 ppm aparecen unas señales que podrían corresponder a hidroxilos. En la tabla 3.25 se muestran las principales señales y los grupos funcionales a los que pueden corresponder.

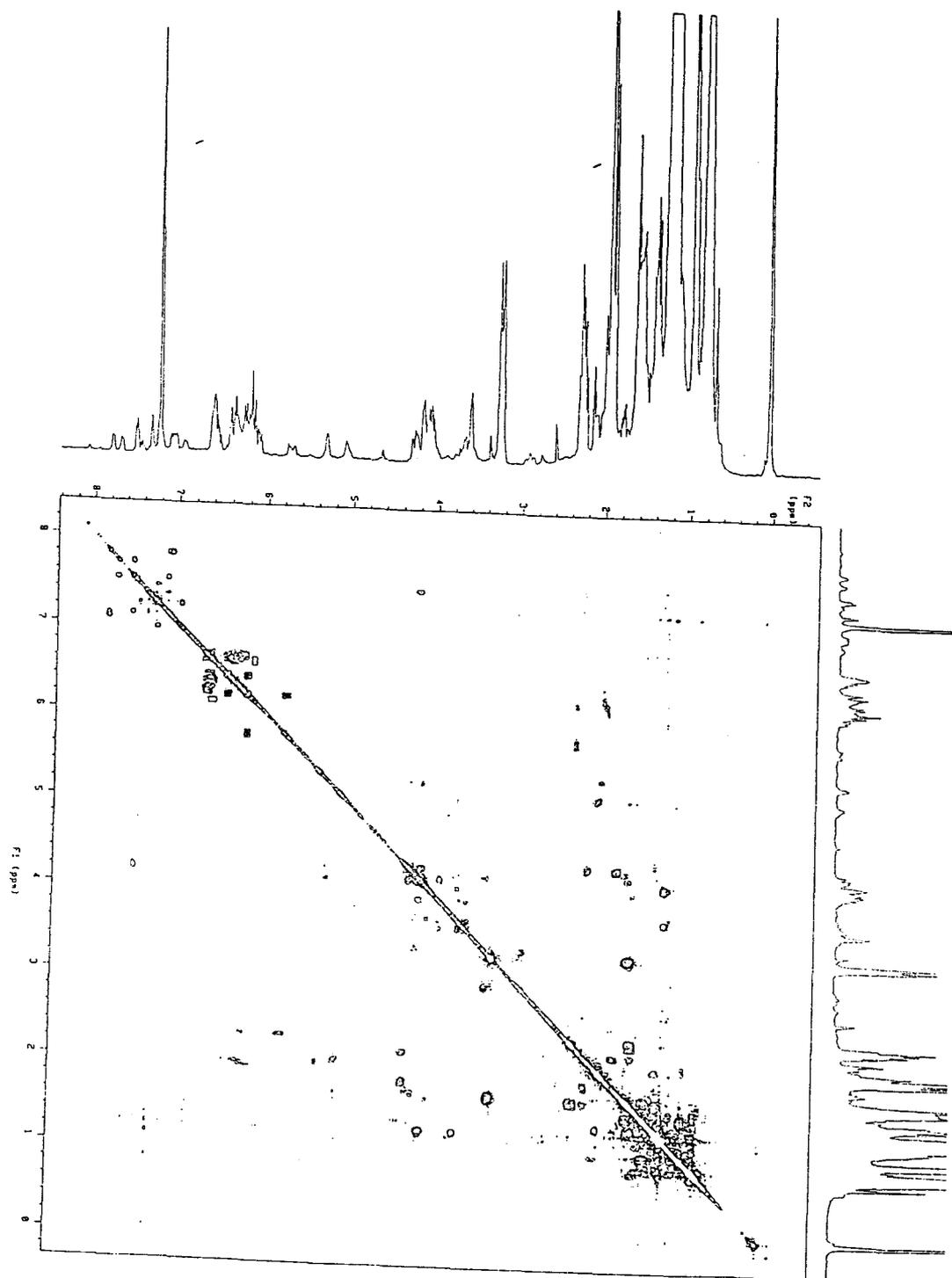


Figura 3.32: Espectro de correlación (COSY) obtenido a partir del pigmento mayoritario de la cepa bacteriana TSHR3.

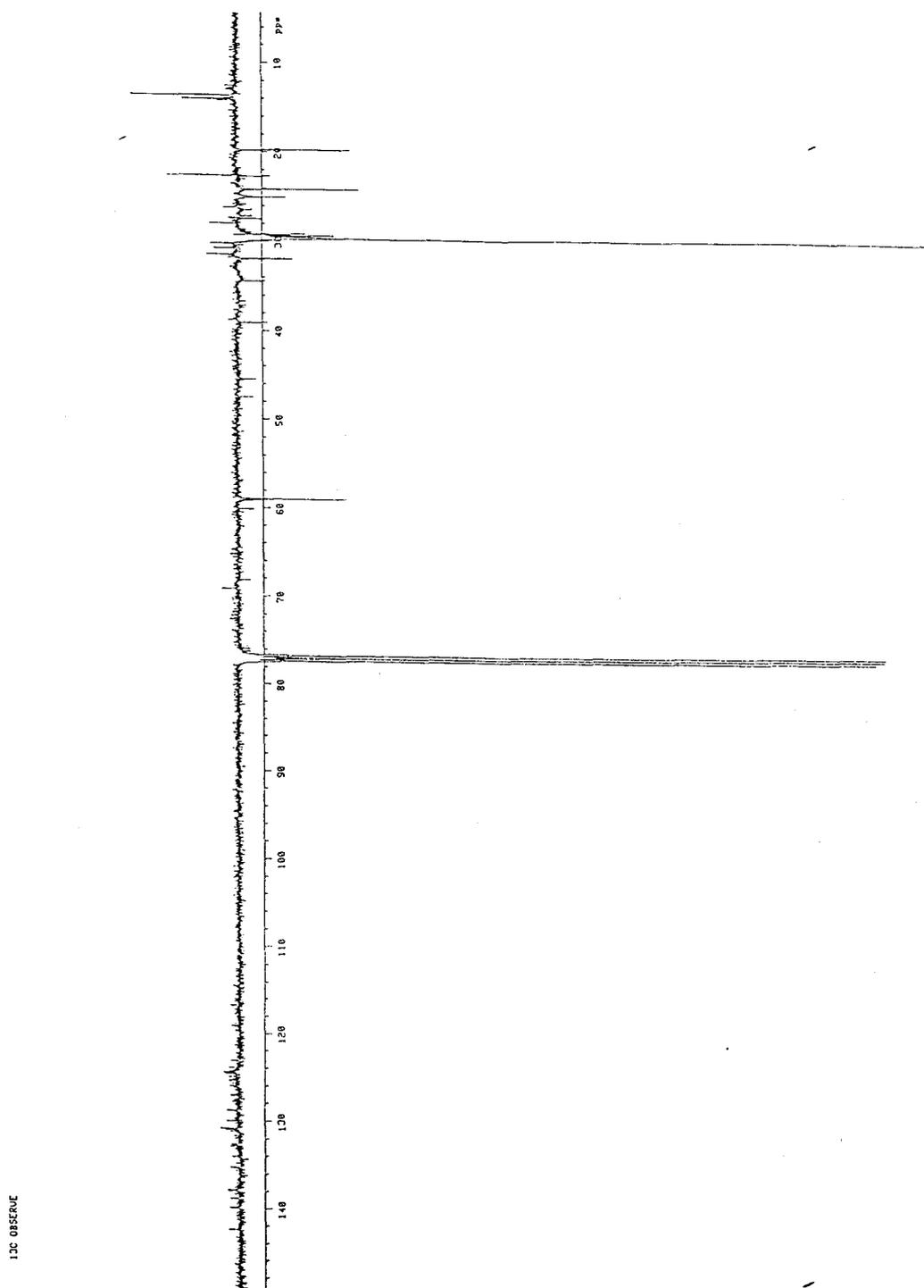


Figura 3.33: APT (Attach to Proton Test) obtenido a partir del pigmento mayoritario de la cepa bacteriana TSHR3.

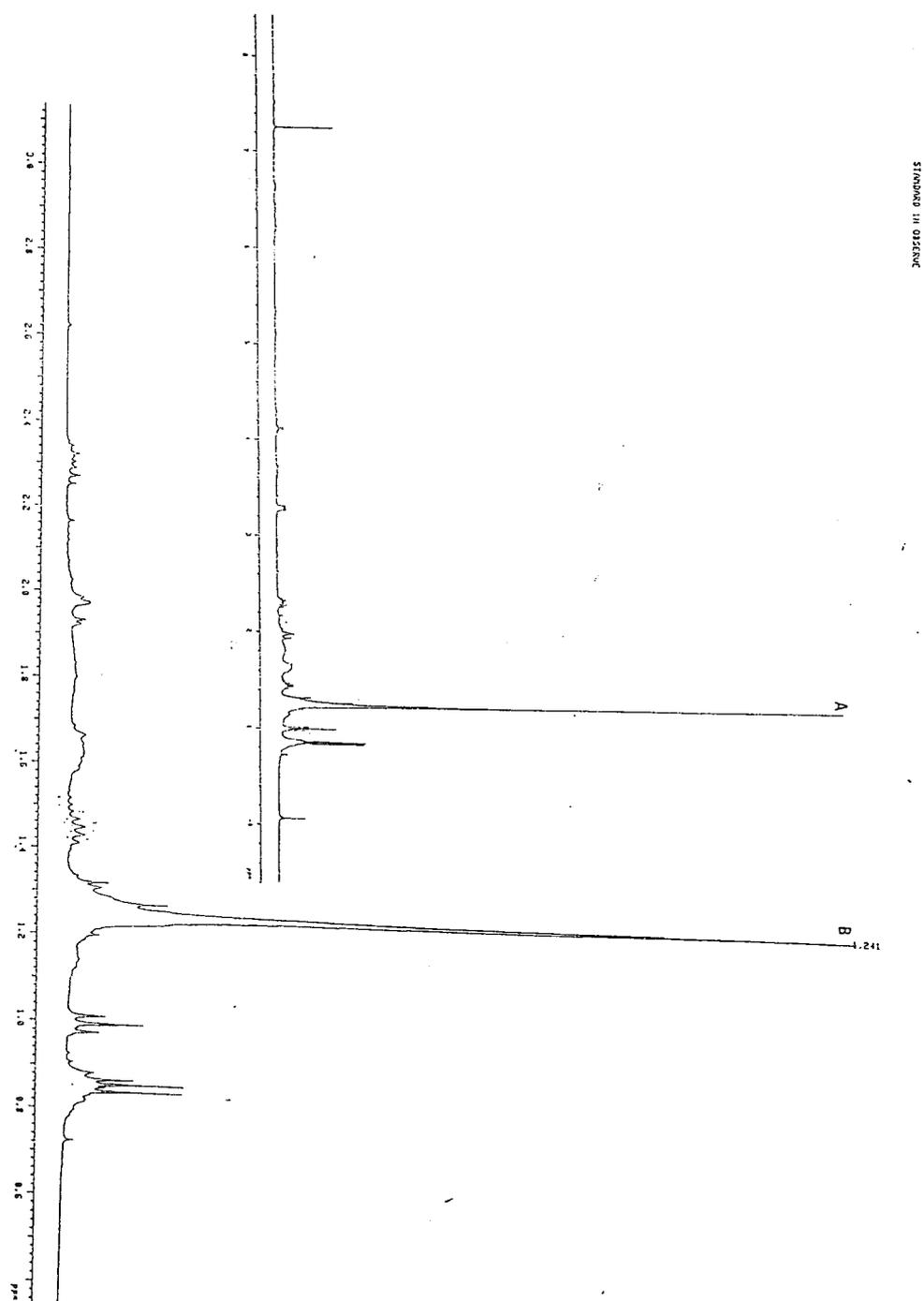


Figura 3.34: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón del pigmento mayoritario de la cepa bacteriana TSHR3. A; detalle del area con mayor respuesta. B; RMN completo.

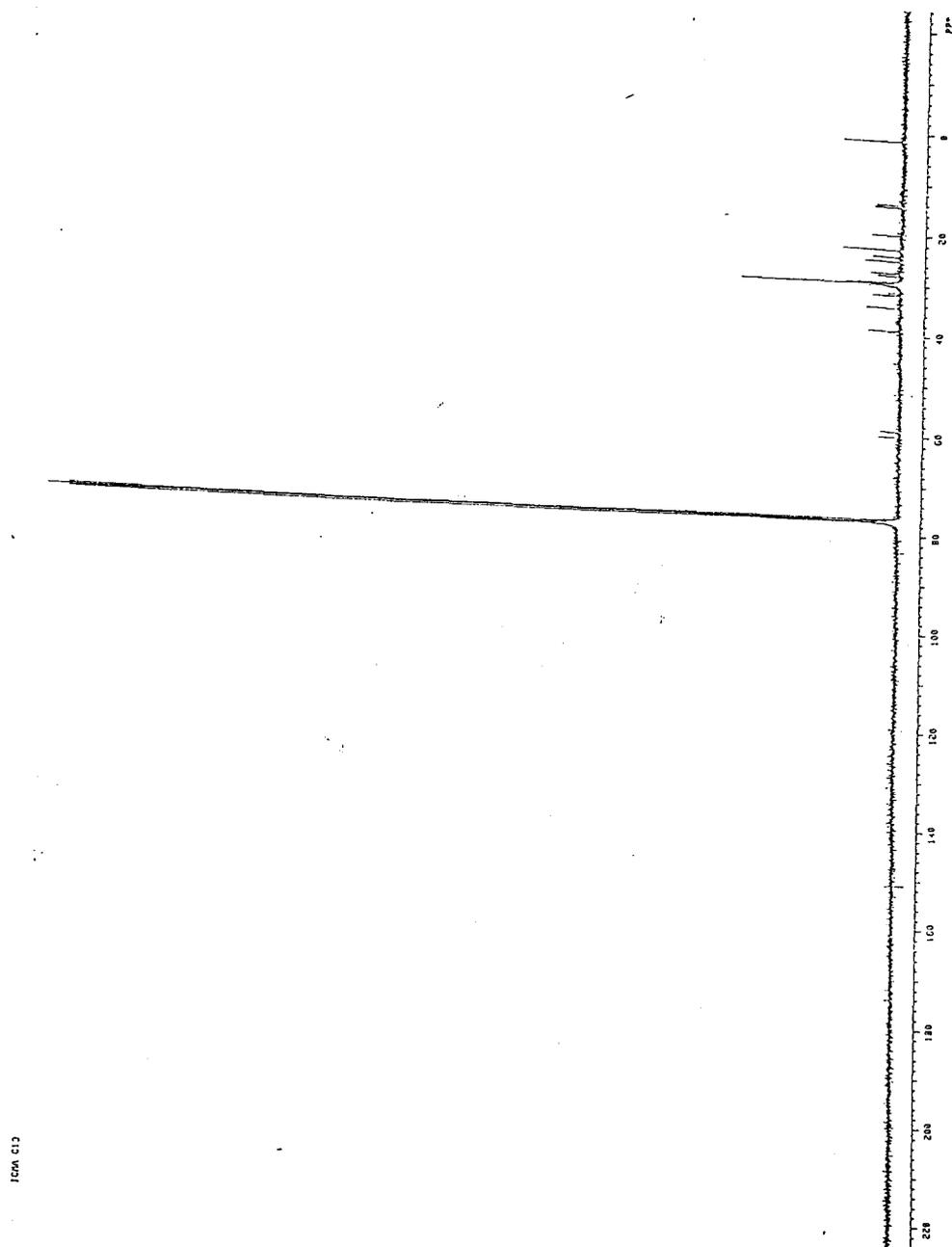


Figura 3.35: RMN de carbono 13 del pigmento mayoritario de la cepa bacteriana TSHR3.

Tabla 3.25: ^{13}C -Resonancia Magnética nuclear (RMN) del pico principal en DCCl_3

Señal	Grupo funcional	Cadena	Desplazamiento
			químico δ (ppm)
1	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	R_1	13,66
2	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$	R_1	14,11
3	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	R_2	14,25
4	$(\text{CH}_3\text{CH})_n$	R_2	19,73
5	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})$	R_2	22,6
6	$\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$	R_1	24,07
7	$\text{CH}_3\text{CHCH}(\text{OH})$	R_2	24,99
8	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$	R_2	27,40
9	$=\text{CCH}_2\text{CH}(\text{OH})$	R_2	27,97
10	$=\text{CCH}_3\text{CHC}=\text{CH}$	anillo	29,15
11	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHCH}_3$	R_1	29,26
12	$\text{CH}_3\text{CHCH}(\text{CH}_3)=$	R_1	29,35
13	$=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{O}-$	R_1	29,45
14	$(\text{CHCH}_3)_n$	R_2	29,59
15	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{OH})$	R_2	29,70
16	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{O}-$	R_1	29,93
17	$\text{COCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$	R_1	31,43
18	$\text{COCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$	R_1	31,92
19	$\text{CHC}=\text{CH}$	anillo	34,41
20	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{O}-$	R_1	39,06
21	$\text{CH}(\text{OH})$	R_2	58,93 60,14
22	$\text{CH}\equiv$	---	68,14
23	$\text{C}\equiv$	---	68,17

Espectroscopía de Masas

Mediante este método se ha podido determinar el peso molecular del pico 1, obteniendo el ion molecular. De este modo resulta que el peso molecular es de $P_m = 666$.

El espectro de masas obtenido se muestra en la figura 3.36., así se conocen los pesos de los fragmentos de la molécula en estudio, que junto con los datos obtenidos anteriormente nos permite proponer una serie de estructuras. De este modo el peso de 149 que junto al fragmento de masa 75, pueden corresponder a una cadena larga de alquilos (figura 3.37A), el fragmento de 313 a otra cadena de alquilos más larga que la anterior (figura 3.37B), y la diferencia resultante entre la masa 429 y 313, que resulta de 116, puede corresponder al cromóforo (figura 3.37C), el fragmento de masa 503 se obtiene sumando un fragmento de masa 74 al de 429, es decir sería añadir al cromóforo con la cadena más larga de alquilos y el fragmento pequeño de la siguiente cadena de alquilos. Los fragmentos de 57, 83, 97 y 111 corresponderían a fragmentos de las cadenas de alquilos y el cromóforo. La masa de 651 corresponde al compuesto completo menos un metilo.

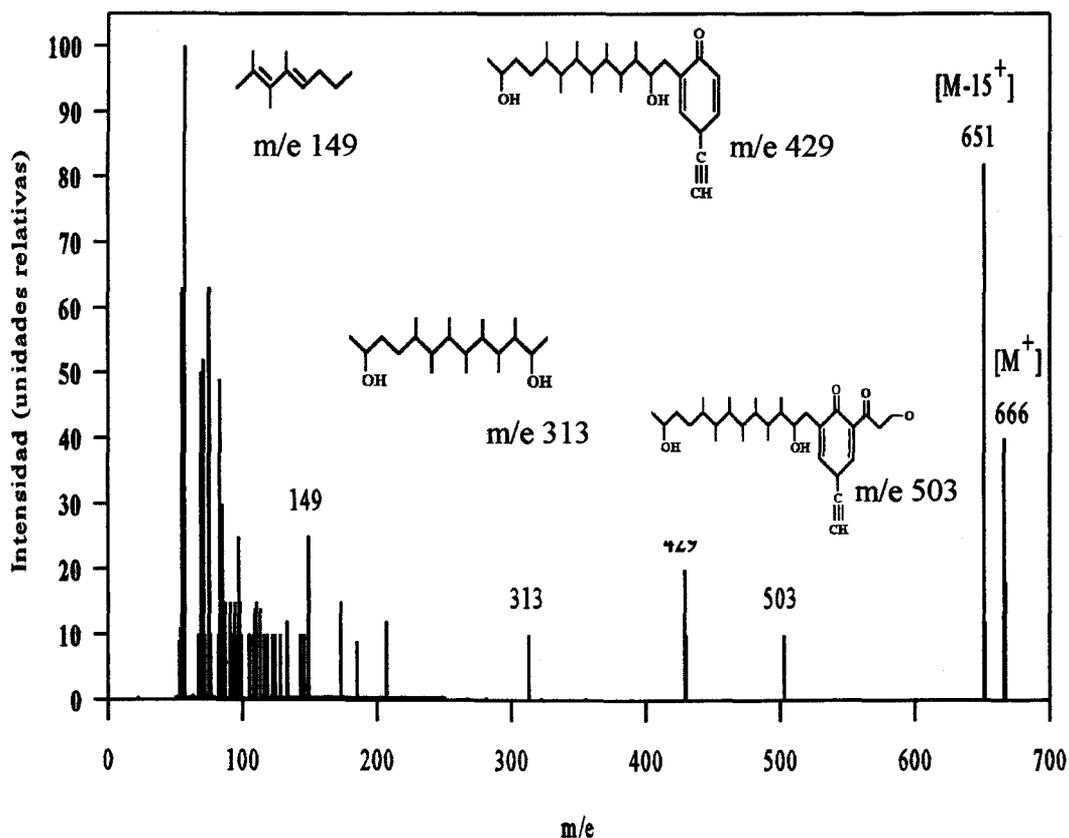
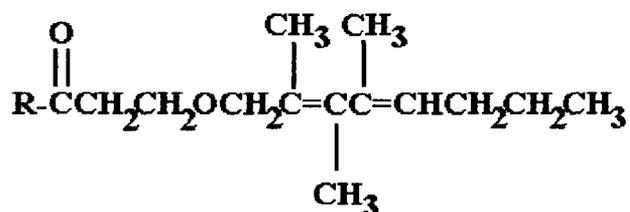
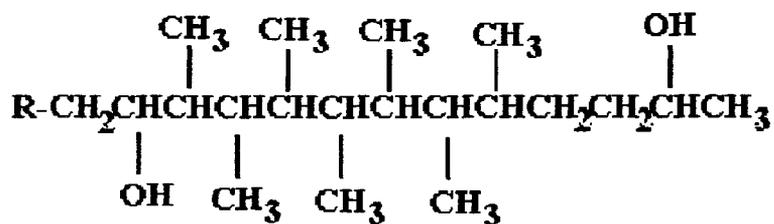


Figura 3.36: Espectro de masas obtenido del pigmento principal de la cepa bacteriana TSHR3, a su vez se muestran los posibles fragmentos a los que corresponden las masas principales.

A



B



C

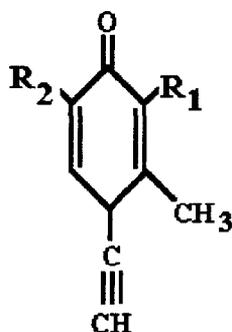


Figura 3.37: Cadenas principales (A y B) y cromóforo (C), propuestos para el pigmento principal de la cepa bacteriana TSHR3

Estructura propuesta

Reuniendo todos los datos de las distintas pruebas a las que hemos sometido al pigmento proponemos la estructura que se muestra en la figura 3.38, ya que con esta se justifican correctamente los distintos resultados obtenidos a lo largo del proceso de identificación.

Como conclusión se puede decir, que el cromóforo de este compuesto es una estructura similar a una quinona, con dos largas cadenas. De este modo posee una zona polar y una zona apolar con lo que se justifica la liposolubilidad del compuesto. El nombre químico resultante es :2-(1'oxo-3'hexa-5',7',8',trimetil-nonanil)-2,5-dien-3-metil-4-etinil-6-(2'',12''-dihidroxy-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9''-heptametil-tridecanil)-ciclohexanona.

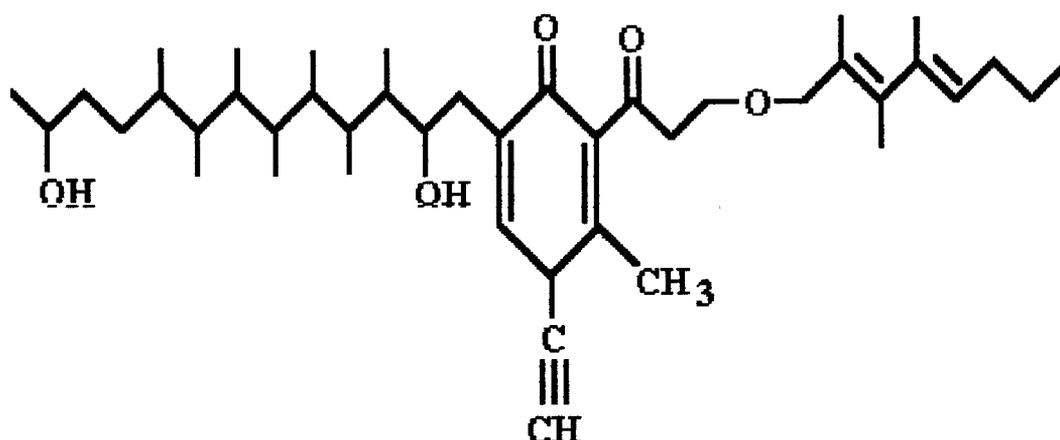


Figura 3.38: Estructura propuesta para el pigmento principal de la cepa bacteriana TSHR3 (*Alteromonas sp.*)

Determinación del coeficiente de extinción específico y molar

Los coeficientes de extinción específico y molar permiten determinar la concentración de un compuesto mediante un análisis espectrofotométrico.

El coeficiente de extinción específico ($E_{\lambda}^{1\%}$) se calculó aplicando la fórmula descrita por

Goodwin (1976):

$$E_{\lambda}^{1\%} = A/([] \times 100)$$

El cálculo se hizo para distintas concentraciones y finalmente se promedió. Las medidas de absorbancia se obtuvieron en acetona y a 477nm de longitud de onda, de este modo se obtuvo un coeficiente de extinción específico $E_{\lambda}^{1\%} = 124,68$

El coeficiente de extinción molar (ϵ) se calculó a partir de la conversión descrita por Goodwin (1976), el Pm aplicado fue el obtenido mediante la espectrometría de masas:

$$\epsilon = E_{\lambda}^{1\%} \times [(\text{mol} \times \text{g})/10]$$

ó

$$\epsilon = E_{\lambda}^{1\%} \times (\text{Pm}/10)$$

De este modo se obtuvo un valor de $\epsilon = 8303,68$

3.3.5.-Producción de pigmentos

Influencia de la fuente de carbono en el perfil pigmentario

Las fuentes de carbono que se ensayaron fueron citrato férrico, citrato sódico, glucosa y glucosa más hierro. En la figura 3.39 se muestran los cromatogramas obtenidos con las distintas fuentes de carbono ensayadas. El perfil pigmentario no varía con la fuente de carbono, sin embargo, si varía la producción de los distintos pigmentos dependiendo de la fuente de carbono y de la presencia del hierro, figura 3.40 donde se pueden apreciar claras diferencias en la producción de los distintos pigmentos en función de la fuente de carbono empleada. La fuente de carbono, por contra, no afecta al crecimiento de la población bacteriana, como se puede ver claramente en la figura 3.41.

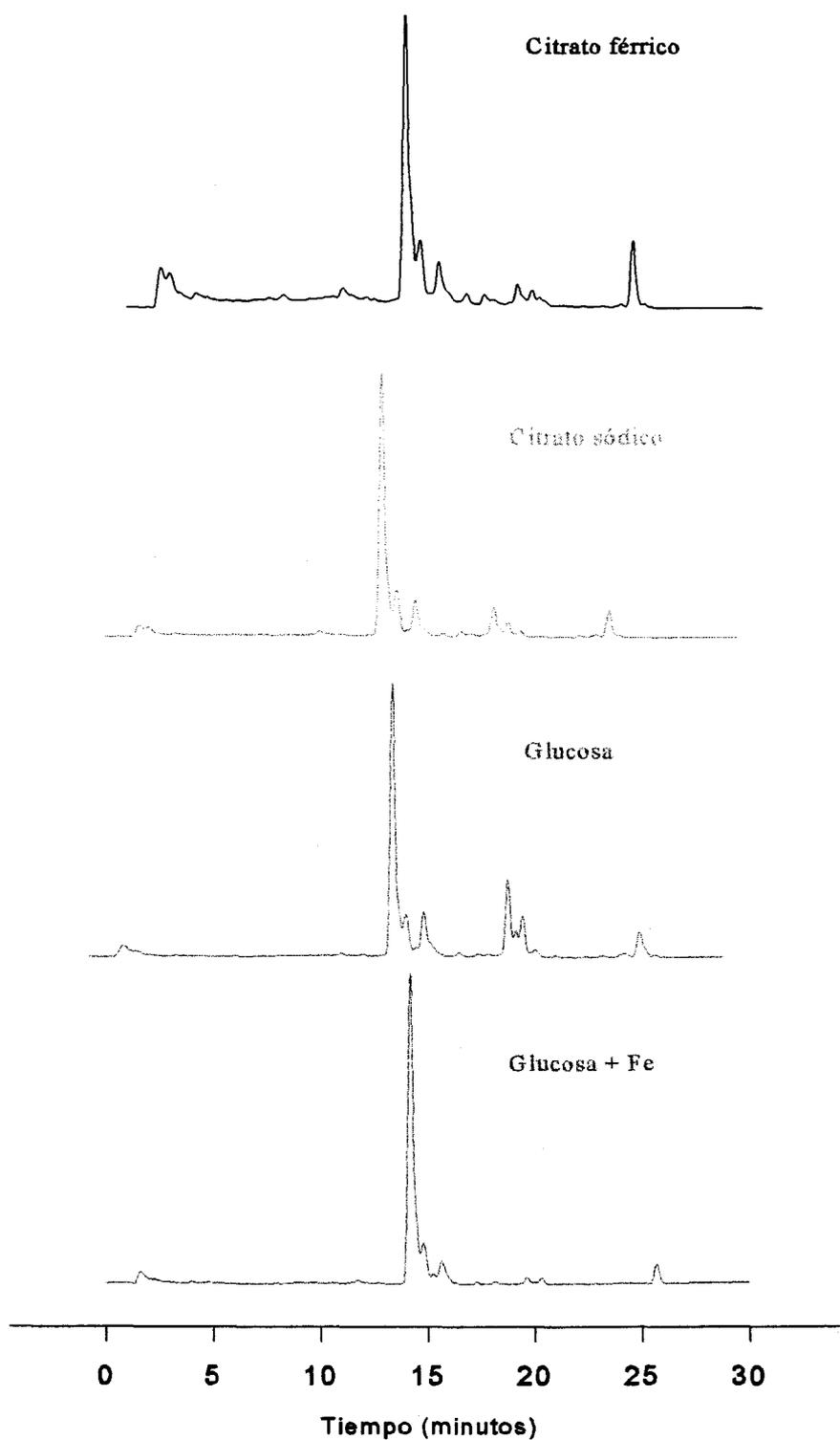


Figura 3.39: Composición de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3 en diferentes fuentes de carbono.

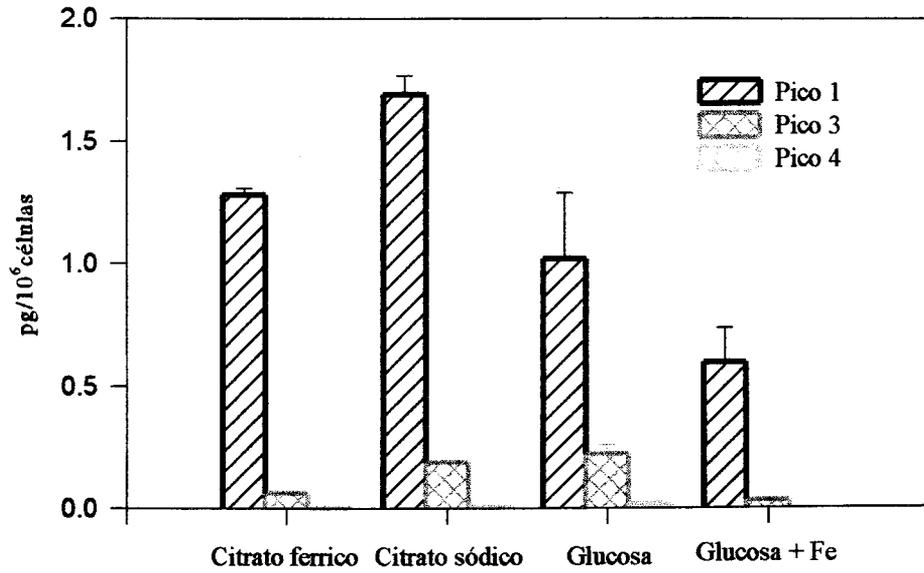


Figura 3.40: Producción de pigmentos, expresada en pg 10⁶células, por la cepa TSHR3 dependiendo de la fuente de carbono.

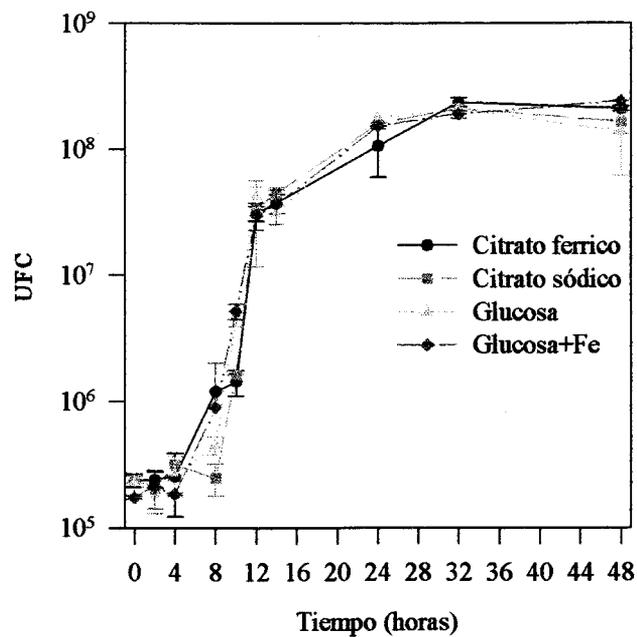


Figura 3.41: Curvas de crecimiento de la cepa bacteriana TSHR3 en distintas fuentes de carbono.

Influencia de la agitación-aireación sobre la producción del pigmento mayoritario.

Durante el cultivo en medio líquido de esta cepa bacteriana se observó que la agitación provocaba cambios en las cantidades relativas de pigmentos, aumentando la coloración roja del mismo. Para comprobar su efecto, se diseñó un experimento en el que se realizaron combinaciones de distintas velocidades de agitación (mediante paletas) y distintos caudales de inyección de aire, utilizando para ello un fermentador Biostat B de Braun Biotech, con una cubeta de 2L de capacidad.

Los flujos de aire empleados fueron, 0 mL/min (sin aireación), 0.5 mL/min (aireación suave) y 5 mL/min (aireación fuerte). La agitación empleada fue de 0 rpm (sin agitación), 50 rpm (agitación suave) y 500 rpm (agitación fuerte). A partir de estos factores se generaron las siguientes combinaciones: sin agitación-sin aireación (SASA), agitación suave-sin aireación (ASSA), agitación suave-aireación suave (ASAS), agitación fuerte-sin aireación (AFSA), sin agitación-aireación suave (SAAS), sin agitación-aireación fuerte (SAAF), agitación fuerte-aireación fuerte (AFAF). Todos estos cultivos se realizaron con citrato férrico como fuente de carbono.

Una vez obtenidos los extractos totales de pigmentos a partir de cada uno de estos cultivos, se cuantificaron los pigmentos comprendidos entre los tiempos de retención de 12 y 16 min, expresando los resultados en tanto por ciento de la suma total del área de los picos del cromatograma a la longitud de onda medida, mg/L de pigmento en el cultivo y pg de pigmento/ 10^6 cel. Las cantidades de pigmento se determinaron utilizando la fórmula descrita en el apartado de material y métodos dedicado a la cuantificación de pigmentos. El coeficiente de extinción específico que se empleó fue el obtenido para el pico 1.

En la figura 3.42 se muestran las proporciones relativas de los distintos picos responsables del color rojo. El pico 1 siempre fue el mayoritario, además de que su proporción aumenta en condiciones de fuerte aireación. Por el contrario, el porcentaje del pico 3 aumenta cuando la aireación es suave. El pico 2, que corresponde a la suma de los picos 2a y 2b, fue siempre minoritario.

Estas diferencias se ponen más claramente de manifiesto al representar el contenido de los pigmentos tanto por volumen de cultivo (figura 3.43) como por célula (figura 3.44). La combinación AFAF es la que proporciona una coloración roja más intensa del cultivo, debido al mayor contenido del pico 1.

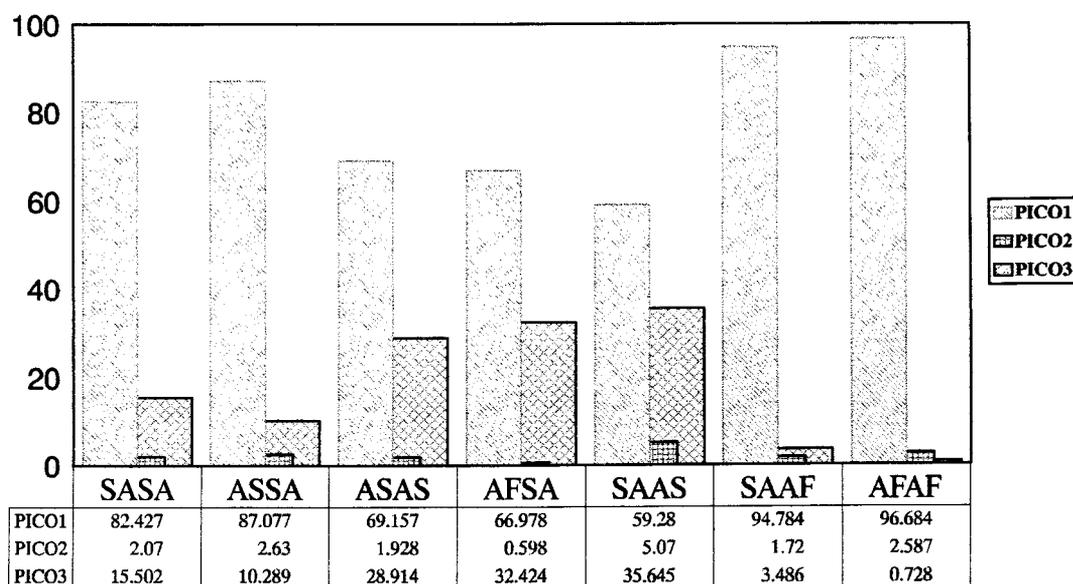


Figura 3.42: Proporciones relativas de los distintos picos responsables del color rojo, dependiendo de las condiciones de agitación y aireación establecidas en el cultivo (ver texto).

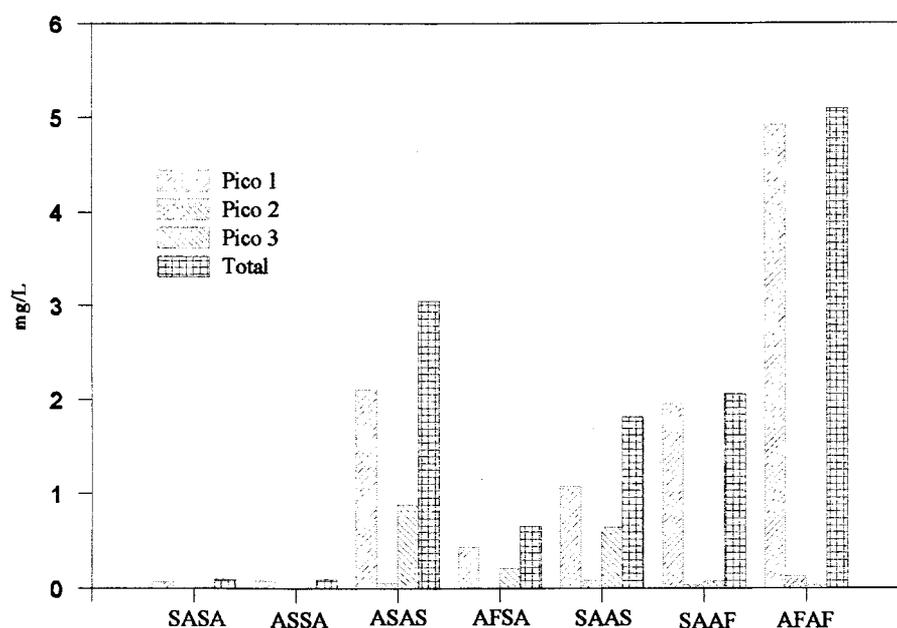


Figura 3.43: Contenido en mg/L de pigmento en los cultivos correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2 (suma de los picos 2a y 2b) y 3, dependiendo de las condiciones de agitación y aireación establecidas en el cultivo (ver texto).

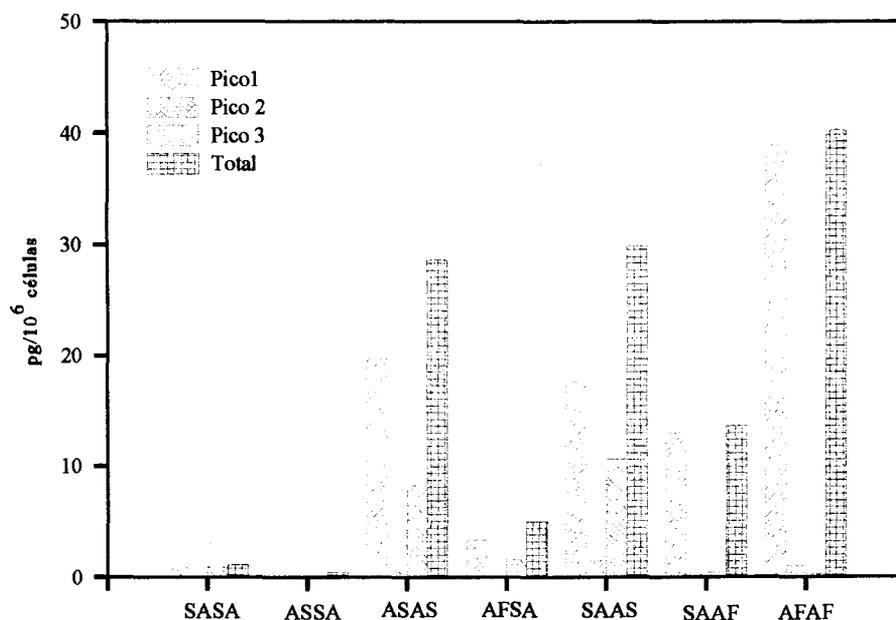


Figura 3.44: Contenido en $\text{pg } 10^{-6}$ células, de pigmento en los cultivos correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2 (suma de los picos 2a y 2b) y 3, dependiendo de las condiciones de agitación aireación establecidas en el cultivo (ver texto).

Efecto de la concentración de oxígeno en el medio.

Para determinar si el efecto que favorece el incremento de producción del pico 1 es el oxígeno que contiene el aire, se sometió al cultivo a una aireación suave sin agitación, durante 24 horas al cabo de las cuales, se retiró la mitad de volumen del cultivo y se extrajeron sus pigmentos. La otra mitad se sometió a una inyección de oxígeno a saturación durante una hora, y pasado este tiempo se extrajeron los pigmentos del cultivo restante. Como puede verse en las figuras 3.45 y 3.46 se produjo un cambio sustancial en la producción de pigmentos, triplicándose la producción celular del pigmento correspondiente al pico 1, poniéndose en evidencia la relación directa entre el oxígeno y la producción del pigmento 1.

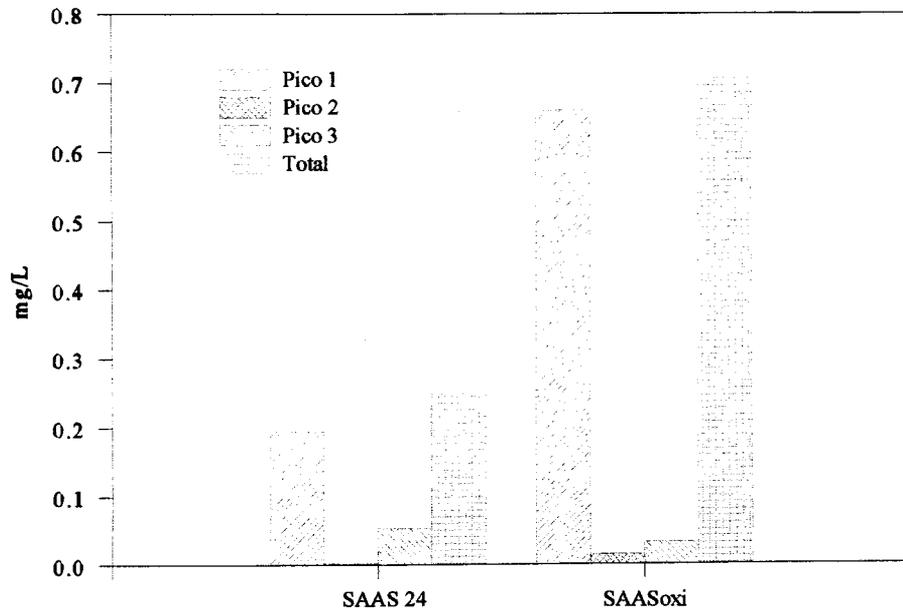


Figura 3.45: Cambio del contenido, en mg/L, de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3, al someter un cultivo de 24 horas (SAAS 24) a saturación de oxígeno durante 1 hora (SAASoxi).

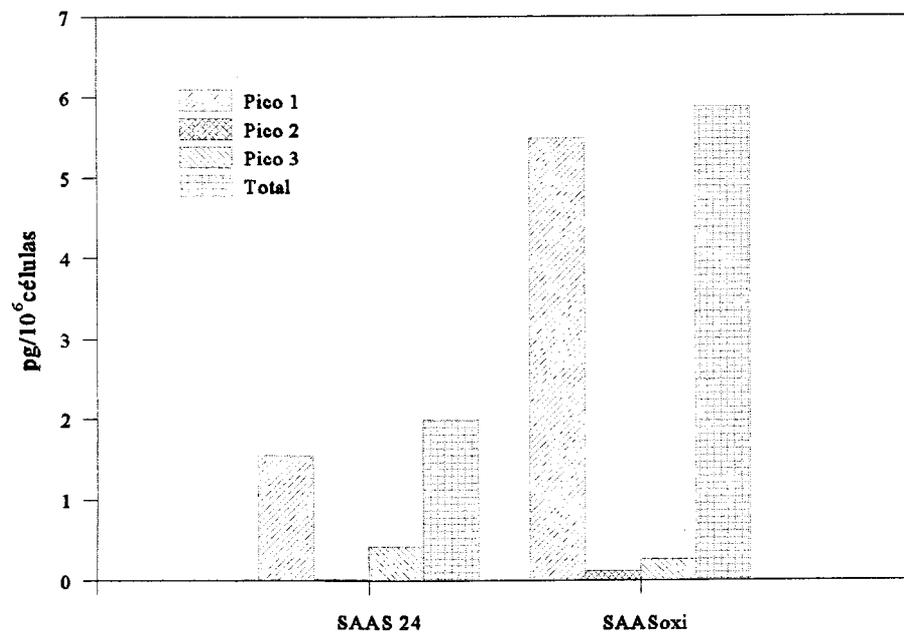
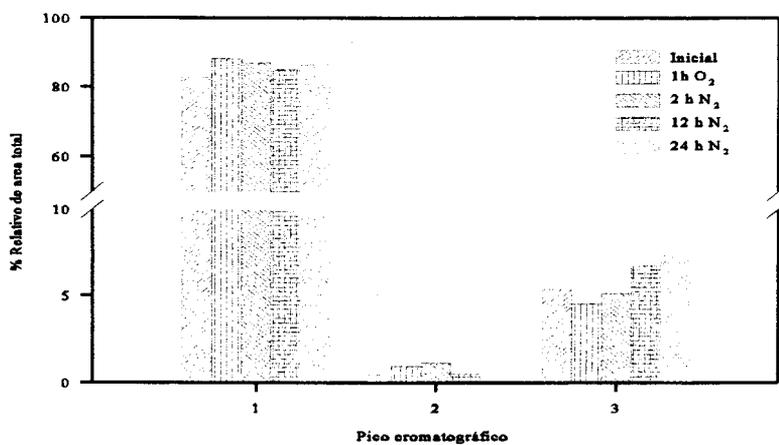


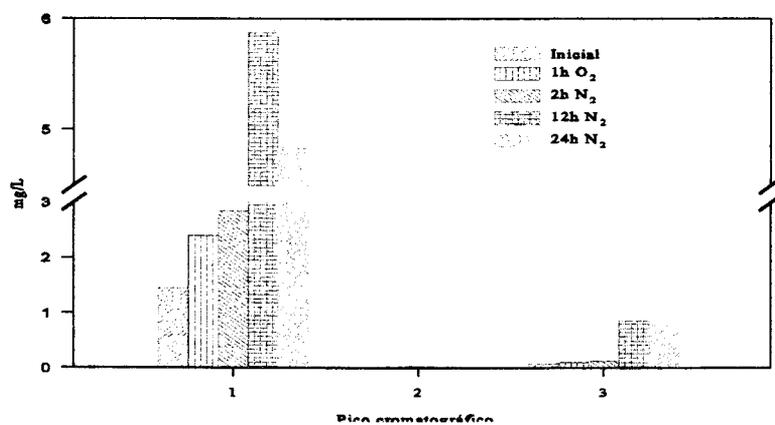
Figura 3.46: Cambio del contenido, en $\text{pg}/10^6$ células, de pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3, al someter un cultivo de 24 horas (SAAS 24) a saturación de oxígeno durante 1 hora (SAASoxi).

No obstante, para comprobar si el incremento del pico 1 revertía, en condiciones de baja o nula concentración de oxígeno en el medio de cultivo, se repitieron las condiciones del experimento anterior y, después de finalizar el periodo de inyección de oxígeno durante una hora, se procedió a burbujear nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto y ver su efecto a lo largo del tiempo. En la figura 3.47 se puede comprobar la variación del contenido de las tres fracciones estudiadas, al cabo de 2, 12 y 24 horas de inyección de nitrógeno. El porcentaje relativo del pico 1 apenas varía, siendo en cualquier caso dominante, mientras que la producción del pico 3, respecto al pico 2, aumenta en condiciones de baja o nula concentración de oxígeno. La variación del contenido de pigmentos, en función del volumen de cultivo, no refleja la disminución que se produce en el pico 1 hasta las 24 horas (figura 3.47 B), dado que la población bacteriana se incrementa notablemente durante las 12 primeras horas, a partir de las cuales apenas existe aumento de la densidad de células al haber alcanzado la población la fase estacionaria. La disminución del contenido de pigmentos y, en particular, del pico 1 como resultado de la inyección de nitrógeno, sí se pone claramente de manifiesto cuando se expresa por célula (figura 3.47 C), aunque no de forma rápida (no se aprecia en las primeras horas). Estos resultados dan a entender, en primer lugar, que existe una relación clara entre el contenido celular de los pigmentos responsables de la coloración roja de la bacteria y la concentración de oxígeno en el medio. En segundo lugar, que la producción de estos pigmentos, como respuesta a concentraciones de oxígeno elevadas, es mucho más rápida que la reversión a los contenidos celulares iniciales de estos pigmentos, al exponer a la población bacteriana a bajas concentraciones de oxígeno.

A



B



C

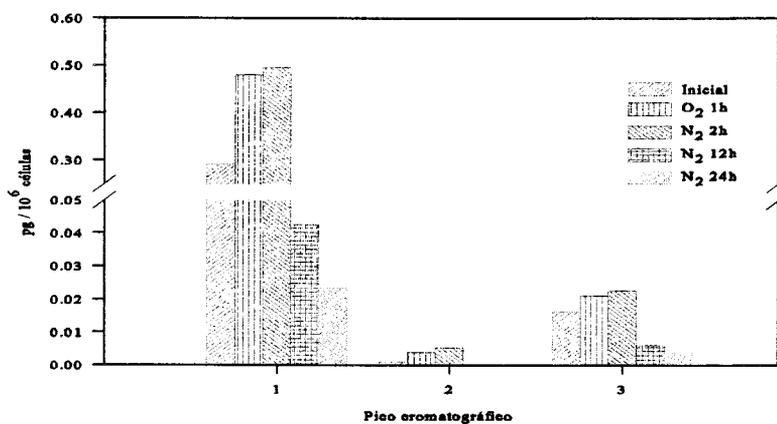


Figura 3.47: Evolución del contenido en pigmentos de la cepa bacteriana TSHR3, al someter un cultivo de 24 horas a saturación de oxígeno y posterior inyección de nitrógeno durante 2, 12 y 24 horas. El resultado para cada una de las fracciones se muestra en A; porcentaje relativo de area de pico, B; mg/L de pigmento en el cultivo y C; pg 10^{-6} células.

3.3.6.- Identificación y determinación de la producción de un tensioactivo producido por una cepa de *P. aeruginosa*

Descripción de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana TCOR3 ha sido identificada como *Pseudomonas aeruginosa* (Schroter, 1872) Migula 1900, 884 (*Bacilarium aeruginosum* Schroeter 1872,126).

Según el Manual Bergey de sistemática, dentro de esta especie bacteriana se pueden observar dos tipos de colonias. Una de ellas corresponde a colonias grandes, lisas, con bordes suaves y centro elevado, y el otro son pequeñas, rugosas y cóncavas. Las colonias del primer tipo son frecuentes en el material clínico, mientras que las colonias pequeñas son más frecuentes en los entornos naturales. El paso de colonias grandes a colonias pequeñas es frecuente, sin embargo lo contrario es extremadamente raro. Además de estos dos tipos de colonias, existe un tercer tipo menos frecuente, que son colonias mucosas, y se suelen aislar a partir de las secreciones del tracto urinario y respiratorio. Este tipo fue observado por primera vez por Sonnershein en 1927. Los mutantes mucosos de *P. aeruginosa* se pueden dividir en dos grupos dependiendo de sí producen la mucosidad (alginato) en un medio químico definido o no. Además de Pyoverdina y Pyocianina, algunas cepas pueden producir otro tipo de pigmentos, incluido uno rojo oscuro.

Se puede aislar de suelos y aguas, y particularmente de medios enriquecidos para bacterias denitrificantes. Se aíslan fácilmente de especímenes clínicos (de heridas, quemaduras e infecciones del tracto urinario). Es el agente causante del “pus azul” origen del sinónimo *pyocianeus*. Ocasionalmente es un patógeno de plantas. La cepa aislada de las hojas de tabaco ha sido llamada *P. polycolor* (Clara, 1930).

La especie se puede subdividir en distintos subgrupos dependiendo de las propuestas epidemiológicas. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y el contenido en G+C del ADN es 67,2 (Bd). La cepa tipo es: ATCC 101455 (NCIB 8295; NCTC 10332).

La cepa TCOR3 es del tipo mucoso, siendo capaz de crecer en un rango de salinidad entre 0% y 8%; así que se la puede considerar una cepa eurihalina según la clasificación de Brisou

(1980), o halotolerante según Kushner (1985). Tanto en medio sólido como líquido colorea el medio de un color verdoso característico, desprendiendo un olor agradable. Excreta un compuesto que se difunde en el medio y es capaz de inhibir el crecimiento de otras cepas bacterianas. En cultivos líquidos, al ser agitados, se produce una abundante cantidad de espuma perdurable. Este último hecho fue el que indujo el estudio del agente causante de la espuma.

En los cultivos de microalgas no es frecuente su presencia y se la puede considerar como un agente contaminante más que como una bacteria acompañante de las microalgas, como ya se ha comentado anteriormente. Aunque se ha detectado que *P. aeruginosa* puede inhibir el crecimiento de algunas microalgas (Dakhama *et al*, 1993), en los cultivos de los que se aisló esta cepa bacteriana no se observó ningún efecto patológico sobre las mismas.

Identificación del tensioactivo

Pseudomonas aeruginosa es un productor de uno de los grupos de biosurfactantes más conocidos, los ramnolipidos (Fleming *et al*, 1994, Guerra-Santos *et al*, 1984, Zhang & Miller, 1995). Estos glicolípidos se dividen en dos grupos principales: el R1, que consiste en dos moléculas de ramnosa y dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico, y el R2, que es igual excepto en que posee solo una molécula de ramnosa (Guerra-Santos *et al*, 1984). Este tipo de compuestos es producido por la bacteria cuando el sustrato es un hidrocarburo, glicerol, glucosa o peptona.

Una vez purificada la fracción mediante el procedimiento descrito por Nakano *et al* (1991), se analizó mediante la técnica de FAB (Fast Atom Bombard) de Espectrometría de Masas. Mediante este procedimiento se determinó la presencia de dos compuestos principales con masas de 647 y 663 (figura 3.48), que coinciden con las masas correspondientes a un ramnolipido, del tipo R1. Según Zhang & Miller (1995), dentro de este tipo de compuestos es frecuente encontrar dos formas: una ácida y otra que es un ester de metilo (figura 3.49), ambas formas son producidas por *P. aeruginosa* en una mezcla. En el caso estudiado parece que encontramos estas dos formas, debido a la diferencia de masa existente entre los picos del espectro de masas que representan el ión molecular.

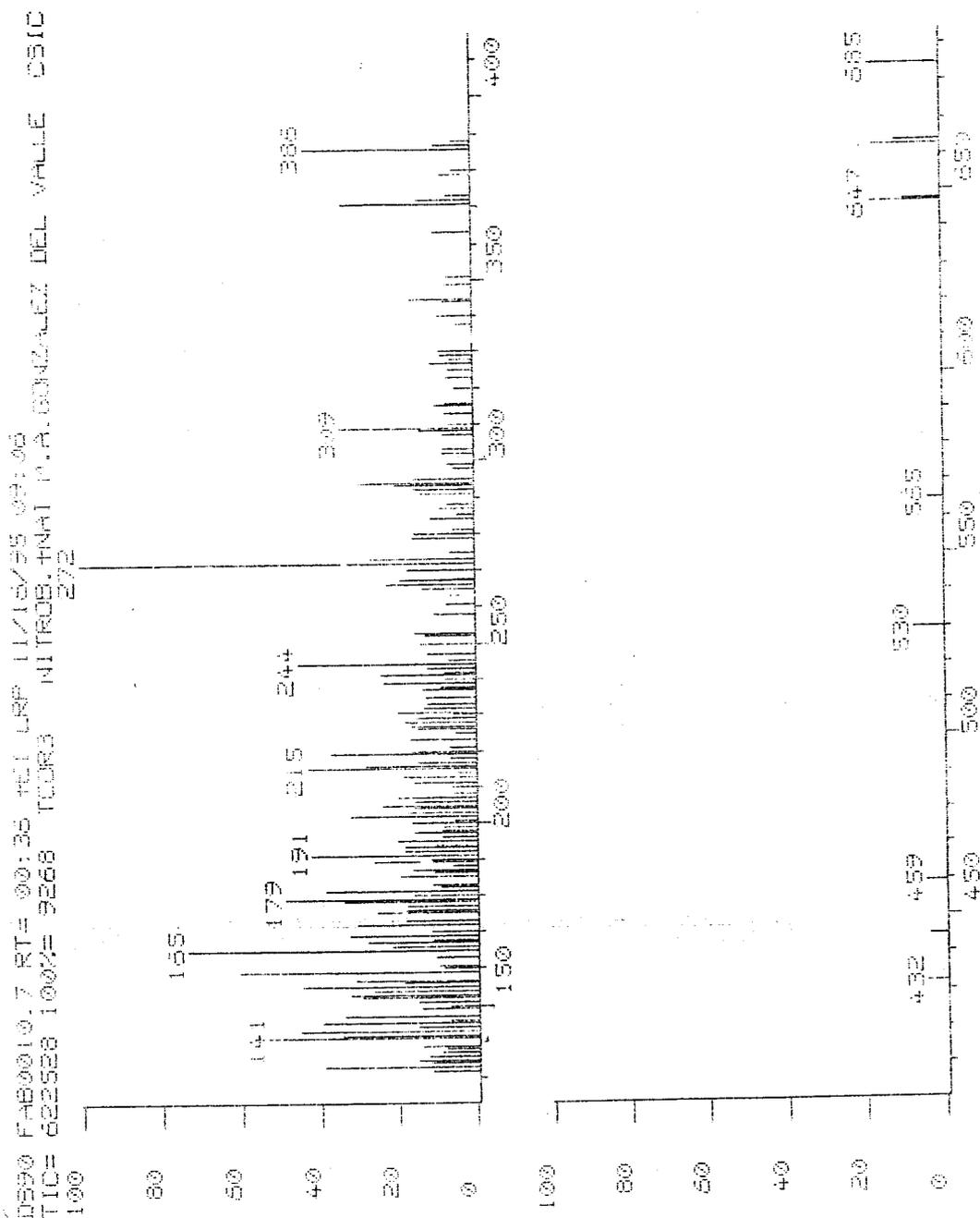


Figura 3.48: Espectro de masas obtenido mediante la técnica FAB (Fastt Atom Bombard) del extracto del sobrenadante de los cultivos de *P. aeruginosa*.

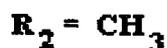
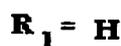
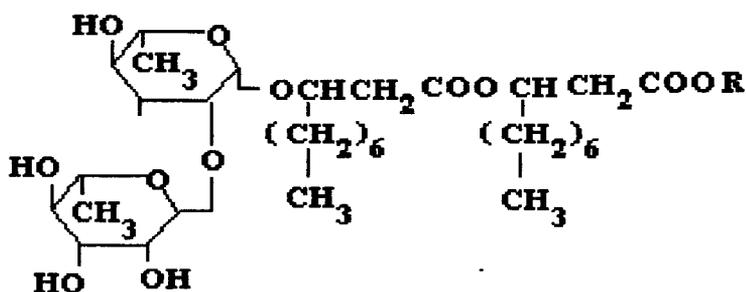


Figura 3.49: Estructura de un ramnolípido del tipo R1.

Además de este análisis se aplicó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) sobre extractos obtenidos a partir del sobrenadante del cultivo bacteriano; el cromatograma obtenido se muestra en la figura 3.50. Como se puede ver entre los minutos 2 y 6, aparece un grupo de picos, que son los que corresponden a las distintas formas del glicolípido. En Zhang & Miller (1995) encontramos una referencia a la metodología de HPLC, sin embargo, los resultados obtenidos y la metodología empleada no se muestran debido a que corresponden a un trabajo realizado por la compañía Kyowa Hakko Kogyo Co., y no han sido publicados, aunque los autores mencionan que en los cromatogramas obtenidos por esta compañía aparecían cuatro picos que correspondían a distintas formas del ramnolípido y que diferían poco entre sí. En el caso estudiado por nosotros, se han obtenido cuatro picos y, según se ve en la figura 3.51, sus espectros varían poco entre sí. Se pueden apreciar que dos de los cuatro picos son mayoritarios, picos 1 y 4 (figura 3.51 A y B). Los espectros de éstos aunque poseen los mismos máximos de absorción, es de destacar la presencia de un pequeño hombro alrededor de 270 nm en el espectro de absorción del pico 4 (figura 3.51B). Si tenemos en cuenta que en el tipo de columna que se ha empleado para la cromatografía los compuestos más polares poseen tiempos de retención

menores, se puede afirmar que las formas ácidas tendrán tiempos de retención menores que las formas con un éster de metilo; consecuentemente, se puede asimilar el pico 1 a la forma ácida del ramnolípido y el pico 4 al éster de metilo. Por lo tanto, esta metodología permite distinguir ambas formas, tanto por sus tiempos de retención como por sus espectros de absorción. El pico 2 del cromatograma posee un espectro de absorción similar a los dos mayoritarios (figura 3.51C), coincidiendo los máximos de absorción. El espectro del pico 3 (figura 3.51D) difiere ligeramente en sus máximos y en su forma de los espectros de los tres anteriores.

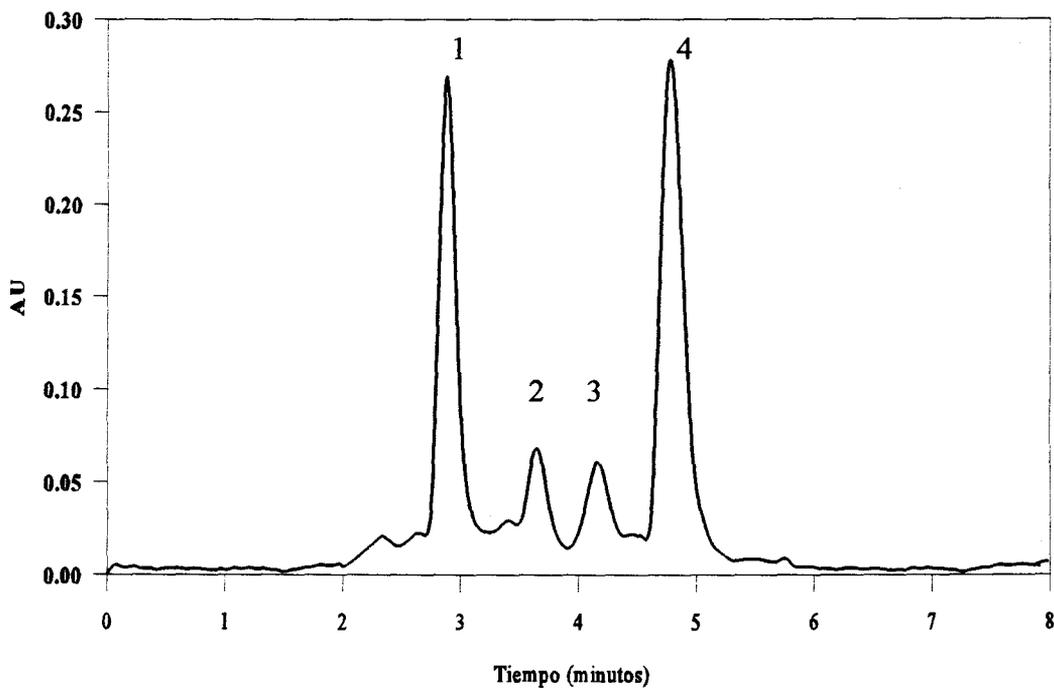


Figura 3.50: Cromatograma, obtenido mediante HPLC, de un extracto del sobrenadante de un cultivo de la cepa bacteriana TCOR3 (*Pseudomonas aeruginosa*)

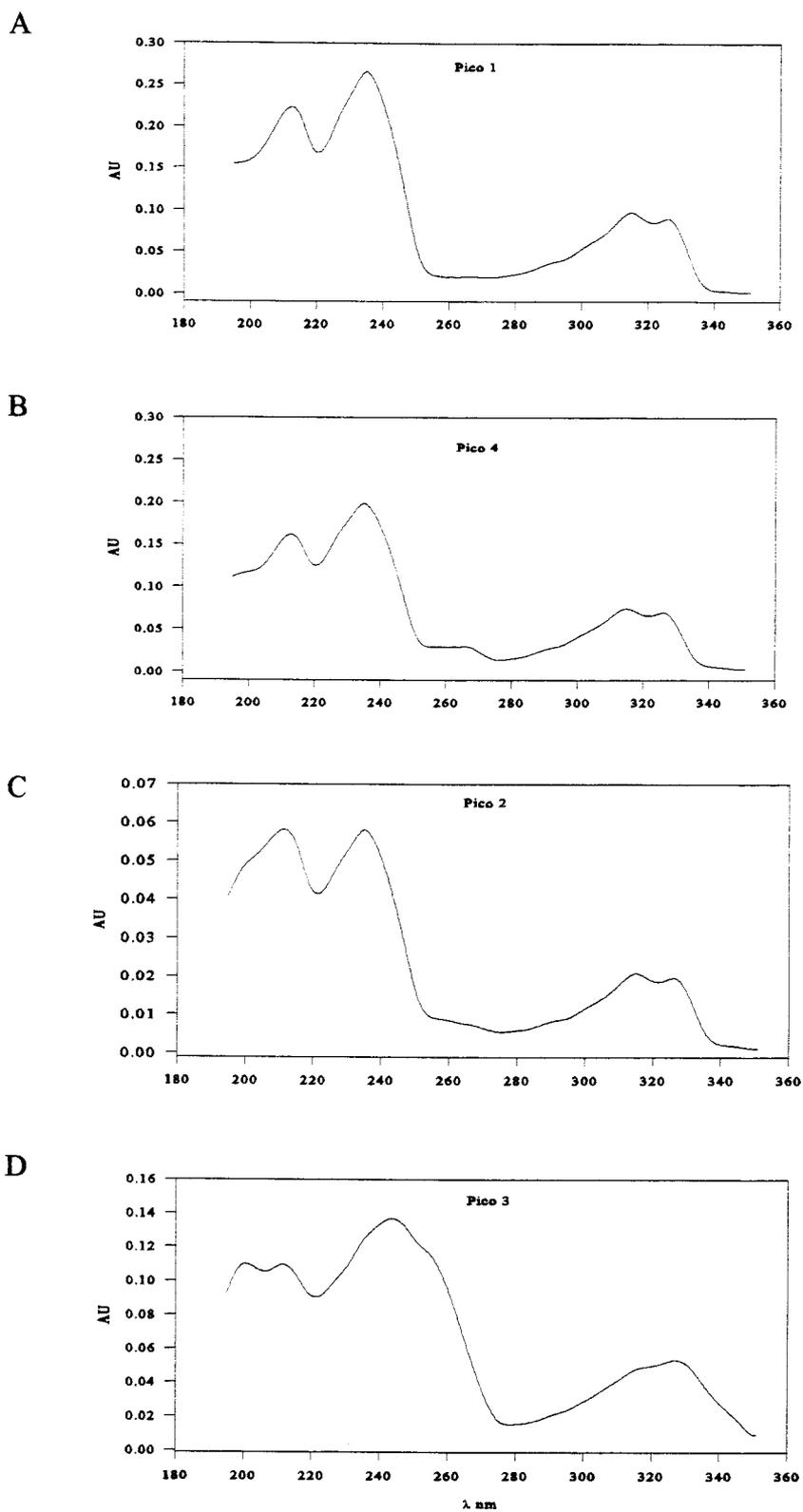


Figura 3.51: Espectros de absorción de los picos cromatográficos correspondientes al extracto del sobrenadante de la cepa bacteriana TCOR3

Efecto de la salinidad y la fuente de carbono sobre la producción del tensioactivo.

Como se puede ver en la figura 3.52, cuando la fuente de carbono es glucosa, los picos 1, 3 y 4 poseen un máximo de producción a 3,5% de salinidad, mientras que cuando la fuente de carbono es citrato férrico, solo los picos 2 y 4 dan un máximo de producción a una salinidad del 3,5%. Con esta última fuente el pico 1 se mantiene más o menos constante a las diferentes salinidades, y el pico 3 da un máximo al 5% de salinidad. Si se observan los porcentajes relativos de las distintas formas del tensioactivo, figura 3.53A, se observa que la forma correspondiente al pico 4 es mayoritaria en las distintas salinidades cuando la fuente de carbono es citrato férrico, y a partir de 2% cuando la fuente de carbono es glucosa, notándose sin embargo, una evolución simétrica de los picos 1 y 4 en las dos fuentes de carbono.

Si se comparan los picos cromatográficos obtenidos mediante la técnica de HPLC en las distintas fuentes de carbono, figura 3.53B, se observa que el incremento de la producción de las distintas formas del tensioactivo es superior en glucosa, excepto en el caso del pico 2, que es producido en mayor cantidad cuando la fuente de carbono es citrato férrico.

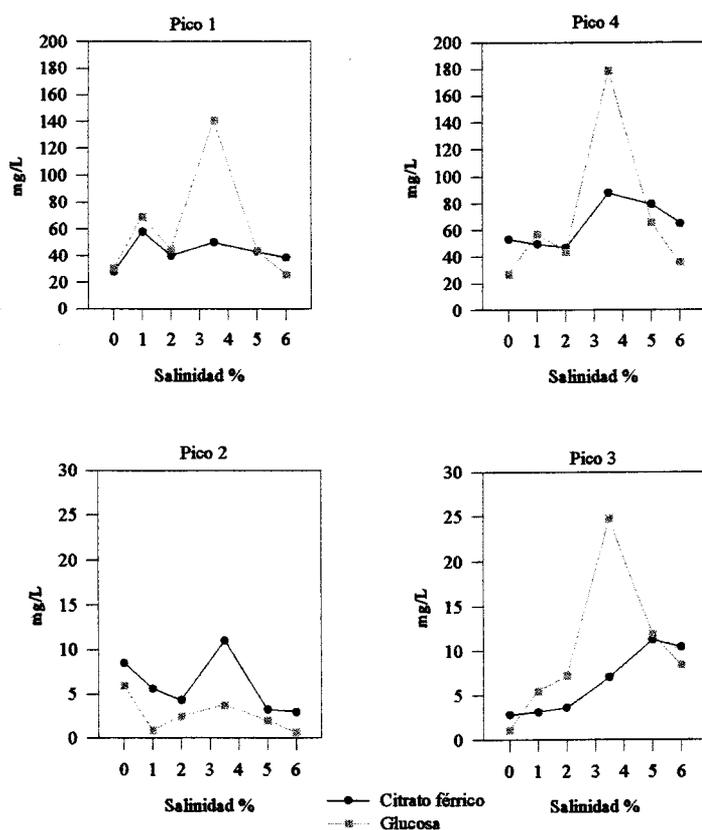


Figura 3.52: Producción, en mg/L, de las distintas formas del ramnolípido a distintas salinidades en glucosa y citrato férrico por parte de la cepa bacteriana TCOR3.

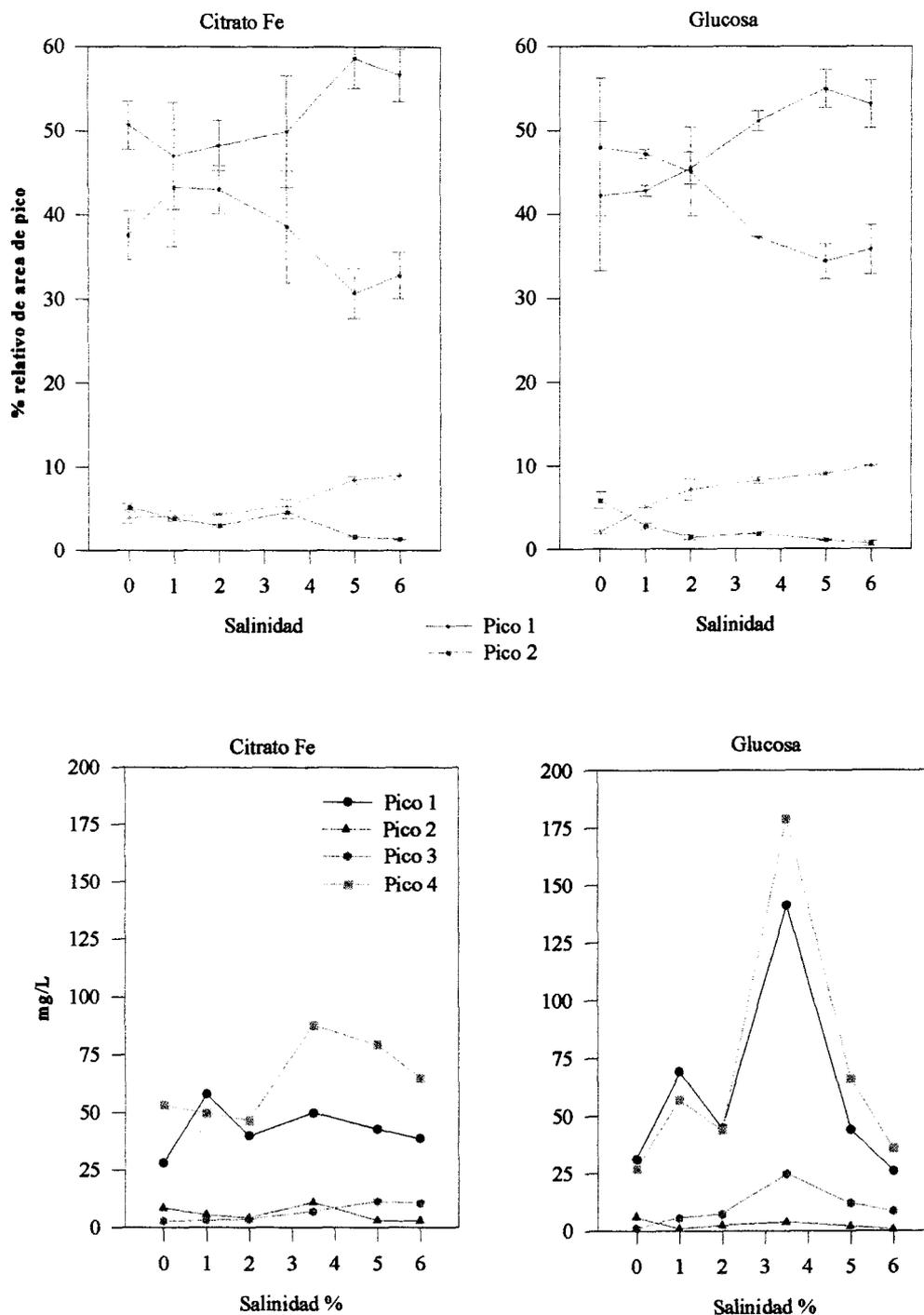


Figura 3.53: Producción de las distintas formas del ramnolípido por parte de la cepa bacteriana TCOR3, en; A, porcentaje relativo de área de pico y B, en mg/L, en citrato férrico y glucosa a distintas salinidades.

4.1 -IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

El conocimiento del papel de las bacterias acompañantes de los cultivos de microalgas es aún escaso, aunque se han propuesto varios tipos de relaciones entre ambas poblaciones (Aubert & Aubert, 1986, Button, 1994, Cole, 1982, Jorris, 1977, Pridle *et al*, 1995). Para poder determinar el tipo de relación que se establece entre las microalgas en cultivo y sus bacterias asociadas, es conveniente tener un conocimiento previo de las especies bacterianas implicadas. Las referencias sobre este tipo de estudios son muy escasas, así por ejemplo, Berland *et al* (1969) hacen un estudio en este sentido, situando a sus aislados bacterianos en los géneros, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Agaracterium*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Sin embargo, estos autores, no relacionaron los distintos grupos bacterianos y sus algas de procedencia.

En este estudio, no se planteaba llevar a cabo una identificación taxonómica de las distintas especies bacterianas asociadas a cada especie de microalga, sino determinar de una manera sencilla los distintos grupos bacterianos implicados. La aplicación de técnicas de secuenciación del ARNr 16S ha puesto de manifiesto la gran variedad de bacterias existente en el medio marino (Kramer & Singleton, 1993, Rochelle *et al.*, 1994). De este modo, esquemas para la identificación de bacterias marinas, como el de Oliver (1982), solo permiten realizar una aproximación a la identificación de grupos bacterianos, ya que la mayor parte de los casos resultan insuficientes en agua de mar.

El resultado obtenido de la serie de pruebas rápidas empleadas en esta memoria, ha mostrado una gran variabilidad dentro de las bacterias que se han aislado y purificado (tabla 3.1). En el proceso de aislamiento se observó la presencia de un número mayor de cepas bacterianas de las que se han conseguido aislar. Esta afirmación se basa en el hecho de que se observaron morfologías de colonias que posteriormente no se observaban en los cultivos bacterianos puros, y en la suposición de que al efectuar una dilución de las muestras, para conseguir colonias aisladas, se perdían un número de poblaciones bacterianas, de presencia minoritaria, que no se han logrado detectar.

Los resultados obtenidos en la identificación bacteriana han sido escasos y solo se han logrado identificar 11 cepas del total de ellas aisladas. Ante el hecho de que los sistemas de identificación no permitían ir determinando la evolución de las distintas poblaciones bacterianas en los cultivos de microalgas, se ha recurrido a la morfología de las colonias que permite distinguir con cierta facilidad distintas cepas, y de este modo cumplir el objetivo propuesto.

El escaso número de bacterias identificadas y la dificultad para generar grupos de asociación (clusters) no ha permitido analizar el grado de afinidad entre las bacterias y las microalgas. La única observación que permite determinar algún tipo de asociación, es la presencia de las bacterias de color rojo, identificadas como *Alteromonas sp.*, en casi todos los cultivos de microalgas estudiados, más adelante se discutirá el posible tipo de asociación que se establece entre las microalgas y este grupo bacteriano. A su vez es de destacar la gran abundancia de bacterias G- (84,7%) presentes en los cultivos de microalgas. El estudio de los intervalos de tolerancia a la salinidad ha permitido determinar la existencia de dos grupos de bacterias; un grupo muy sensible a la composición salina del medio, que tolera entre 1 y 8% de salinidad (bacterias moderadamente halófilas, Brisou, 1980), y un segundo grupo con tolerancias a la salinidad comprendidas entre 0 y 16% de salinidad o más (que según ambos autores correspondería a bacterias halotolerantes).

Entre las cepas bacterianas identificadas, se observa la presencia de tres patógenos, como son: *Pasteurella sp.*, *Vibrio damsela* y *Pseudomonas aeruginosa*. De estos tres, los dos primeros son patógenos de peces, mientras que el tercero es un patógeno oportunista tanto para las microalgas, como para los organismos que se alimenten de estas microalgas o los consumidores finales de estos organismos. La identificación esporádica de estas tres cepas, en solo tres especies de microalgas, permite considerarlas como minoritarias y ocasionales. El intervalo de tolerancia a la salinidad de *Pasteurella sp* (0-16%) y *Pseudomonas aeruginosa* (0-8%), permite que puedan desarrollarse en un medio rico en nutrientes como el que constituye un cultivo de microalgas (Azam *et al*, 1993, Bjornsen, 1988, Boetius & Lochte, 1994, Chrost & Faust, 1983, Cole 1982), cuando por alguna razón contaminan estos. La presencia de estas bacterias indica que los cultivos de microalgas pueden ser portadores potenciales de patógenos, aspecto que ya habí sido

reportado anteriormente (Guillard, 1959, Openheimer, 1955). Sin embargo, la baja frecuencia de estos grupos bacterianos entre las distintas especies de microalgas estudiadas, hace suponer que la incidencia de infecciones microbianas a partir de cultivos de microalgas es muy escasa.

4.2.- INTERACCIÓN MICROALGA-BACTERIAS

Uno de los objetivos planteados al iniciar este estudio fue caracterizar las relaciones existentes entre una determinada microalga y sus bacterias asociadas, en base a la evolución de sus respectivas poblaciones a lo largo del crecimiento en cultivo. Hay indicios de que las bacterias pueden ser responsables de los colapsos de los cultivos de microalgas, ya sea por una competitividad por los nutrientes o por la excreción de toxinas (Dakhama *et al*, 1993, Darveau & Lynch, 1977). Sin embargo, existen pruebas de que las bacterias favorecen el crecimiento de las algas, poniendo a su disposición factores de crecimiento, como vitaminas, agentes quelantes, etc. (Berland *et al*, 1969, 1970, Forlani *et al*, 1989 Kesthacher-Liebson *et al*, 1995, Ukeles & Bishop, 1975). Una de las hipótesis más recientes, plantea la posibilidad de que las microalgas ven favorecido su crecimiento por la retirada de oxígeno de su entorno inmediato por parte de las bacterias, ya que de este modo se ve incrementada la eficiencia fotosintética (Escher *et al*, 1982, Mouget *et al*, 1995).

Como se ha visto hay una gran variedad de cepas bacterianas presentes en los cultivos de microalgas. Sin embargo, el comportamiento, en lo que se refiere a los principales parámetros que definen el crecimiento, de casi todas ellas es similar, al menos, en los seis casos estudiados. En la serie de curvas de crecimiento obtenidas, se aprecia un paralelismo entre las curvas de crecimiento de las microalgas y de las bacterias asociadas, lo que permite pensar en la existencia de algún tipo de asociación entre ambas poblaciones. Clásicamente, se ha pensado que las bacterias se aprovechan de los productos resultantes del metabolismo secundario de las microalgas (Anderson *et al*, 1981, Simon & Tilzer, 1987, Bird & Duarte, 1989, Obernosterer & Herndl, 1995). Sin embargo, estos metabolitos son más abundantes durante las fases de retardo y estacionaria del crecimiento de la población de microalgas, por lo que cabría esperar un mayor crecimiento de las bacterias según envejece el cultivo de microalgas. Como se ha visto, esto no sucede en los cultivos estudiados, ya que la fase de crecimiento exponencial de las poblaciones

bacterianas coincide, en la mayor parte de los casos, con la fase exponencial de crecimiento de las microalgas. Además, como se ve en las gráficas de evolución de nutrientes, hay un incremento importante del carbono orgánico disuelto (COD) según envejecen los cultivos que, en los seis casos estudiados, las bacterias no aprovechan, al menos, de un modo eficaz, coincidiendo con la idea expuesta por algunos autores de que el uso del COD por parte de las bacterias no es todo lo eficaz que cabría esperar (Chrost & Faust, 1983, Lindell *et al*, 1995). Sin embargo, el ineficiente uso del COD por parte de las poblaciones bacterianas, no implica la similitud entre las curvas de crecimiento de algas y bacterias asociadas a estas. Por tanto se puede afirmar, que en los casos estudiados las dos poblaciones establecen un tipo de relación total, o parcialmente independiente del COD.

Muchos autores indican a su vez, la importancia de la fuente de N y del equilibrio N:P en la relación que se establece entre bacterias y microalgas marinas en entornos naturales (Anderson *et al*, 1981, Azam 1993, Berman *et al*, 1994, Ietswart *et al*, 1994, Kroer *et al*, 1994, Obernosterer & Herndl, 1995, Pridle *et al*, 1995), sin embargo, en los resultados obtenidos no se puede establecer ninguna relación entre el consumo de N y P, y el crecimiento de la población de bacterias y microalgas. Esto, puede ser debido a que el medio de cultivo empleado posee N y P en exceso, comparado con un entorno natural, y por tanto no han sido un factor limitante para el crecimiento de ninguna de las poblaciones. Es decir sobre la base de este hecho, se puede decir que no se establece una competencia entre las dos poblaciones por los nutrientes aportados en el medio $f/2$ de Guillard.

Las cepas de bacterias puras, aisladas en esta memoria, no crecen en agua de mar con medio $f/2$ de Guillard, esto indica que hay algún tipo de dependencia por parte de las bacterias con las microalgas. Para comprobar si existe una dependencia en sentido contrario, es decir si se aprecia un mejor crecimiento de las algas en presencia de bacterias como indican algunos autores (Ukeles & Bishop, 1975, Bertrand *et al*, 1970, Forlani *et al*, 1989, Kesthacher-Liebsen *et al*, 1995), se han intentado axenificar los cultivos de tres de las especies estudiadas, y comprobar si estas dependen de algún modo de la presencia de este tipo de bacterias. Sin embargo, en los intentos de axenificación no se han obtenido resultados satisfactorios, en el sentido de que o los cultivos se colapsan (como en el caso de *R. salina*), o el alga sufre aparentemente graves

alteraciones morfológicas (como en el caso de *N. gaditana*), pudiéndose deber este hecho al efecto del antibiótico más que a la ausencia bacteriana, o en otras ocasiones (como en el caso de *T. suecica*) se logra una reducción del número de bacterias pero sin lograr la axenificación completa. Dado que en los cultivos de microalgas no existe una sola población bacteriana, sino una mezcla de varias, cabe esperar que haya distintos tipos de interacción alga bacteria según la subpoblación bacteriana. En este estudio, los únicos experimentos en este sentido se han realizado con *N. gaditana*, cuyos cultivos axénicos presentan un crecimiento menor que los habituales y apenas presenta diferencias cuando se re infectan por separado con tres cepas bacterianas.

Se puede encontrar un gran número de referencias sobre la proliferación de resistencias a antibióticos en las bacterias en general y marinas en particular (Spangaard *et al*, 1993, Sizemore *et al*, 1977, Andersen *et al*, 1994). Muchos autores han recomendado el uso de antibióticos (Cotrell *et al*, 1993, Droop, 1967), para la axenificación de cultivos y de este modo se encuentran en el mercado una serie de soluciones antibióticas, como por ejemplo las descritas por Provasoli y Guillard (Sigma). De las pruebas realizadas con estos antibióticos comerciales y con las mezclas empleadas durante la realización de este trabajo, se puede decir que no es recomendable el uso de antibióticos como un sistema de axenificación rutinario, ya que como se ha visto, los antibióticos pueden afectar de modo negativo al cultivo de microalgas o sencillamente no afectar de un modo eficiente a las bacterias presentes en los cultivos.

Ya se ha comentado anteriormente el paralelismo que, en general, existe entre el crecimiento de las distintas poblaciones de microalgas y el de sus bacterias asociadas. Este paralelismo se pone especialmente de manifiesto si se representa en cada caso la densidad de células bacterianas frente a la de la microalga (figura 4.1). En todas las especies existe una correlación lineal aceptable, durante todo el desarrollo del cultivo o, al menos, durante su fase exponencial de crecimiento. En *N. gaditana*, *I. galbana* y *P. cruentum*, durante la fase de crecimiento retardado o estacionaria la pendiente de la relación población bacteriana-población algal disminuye o incluso es negativa, bien por la propia naturaleza de las distintas poblaciones bacterianas asociadas a cada especie algal, o bien por la presencia de metabolitos algales que afectan negativamente al crecimiento bacteriano.

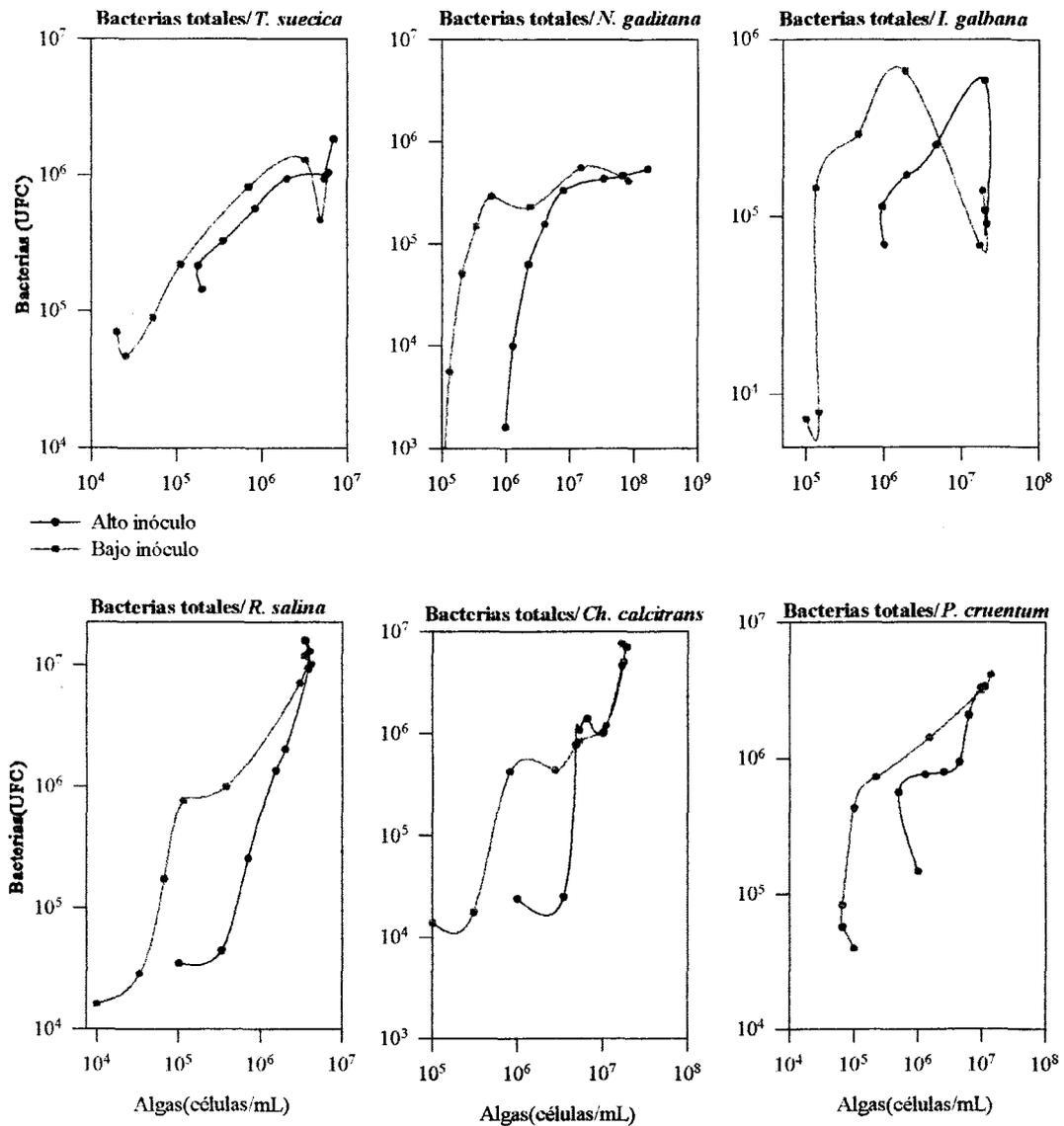


Figura 4.1: Número de bacterias totales por mililitro frente a microalgas por mililitro, en los seis casos estudiados.

Asimismo, existen particularidades que afectan tanto a la población total de bacterias como a las subpoblaciones estudiadas. El caso de *R. salina* es el único en que la población bacteriana total supera a la de la microalga, en cultivos sembrados a partir de inóculos de siete días de edad. En *I. galbana*, todas las subpoblaciones bacterianas estudiadas descienden al entrar las microalgas en fase estacionaria, y en *T. suecica* sucede únicamente en la subpoblación TR. Por el contrario, la subpoblación CAM de *C. calcitrans* inicia su fase de crecimiento exponencial

cuando la población de microalgas alcanza la fase estacionaria.

Los experimentos destinados a estudiar el crecimiento de las poblaciones de microalgas y sus bacterias asociadas, se han planteado a dos densidades de cultivo inicial, alto y bajo. El alto inóculo corresponde a una densidad inicial de aproximadamente el 10% de la densidad final de los cultivos, y el bajo inóculo es siempre un orden de magnitud menor que el alto inóculo. Con esto se ha pretendido determinar el efecto que causa sobre el crecimiento de las poblaciones bacterianas, la diferencia de densidad inicial de la población de microalgas. Como se puede ver en las distintas curvas de crecimiento obtenidas, a las dos densidades de cultivo inicial, la densidad de inóculo no parece afectar al paralelismo de crecimiento entre en ambas poblaciones, microalgas y bacterias. Sin embargo, existen diferencias en los parámetros que caracterizan las curvas de crecimiento, así, las tasas exponenciales de crecimiento de *T. suecica*, *N. gaditana* y *C. calcitrans*, son diferentes dependiendo del inóculo inicial, mientras que *I. galbana*, *R. salina* y *P. cruentum* son iguales. En cuanto a los rendimientos totales, en todos los casos estudiados no hay diferencias significativas entre cultivos sembrados con alto y bajo inóculo, pero sí existen diferencias en lo que respecta a los rendimientos óptimos, que normalmente suelen ser menores con bajos inóculos ya que la duración del crecimiento es mayor.

La edad del inóculo tiene una clara influencia sobre el crecimiento bacteriano, aumentando hasta dos ordenes de magnitud la densidad de células, en cultivos sembrados con inóculos envejecidos, respecto a los sembrados con inóculos jóvenes, con excepción de *R. salina*. Sin embargo, el crecimiento algal, en general, no se ve afectado sensiblemente por este factor.

Las relaciones existentes entre las densidades de células de las distintas poblaciones ya es un dato de interés, pero esta información se implementaría notablemente si se determinan las relaciones existentes entre sus biomásas. Estas determinaciones no son fáciles de llevar a cabo con la suficiente precisión, y aunque existen en la bibliografía factores de conversión de biovolumen a biomasa para las poblaciones bacterianas (Lee & Fuhrman, 1987) y microalgales (Agustí *et al*, 1987), se ha considerado conveniente tomar como referencia los datos del volumen celular, determinados directamente en cada microalga y el volumen medio estimado para las células bacterianas, en ningún caso, para cultivos sembrados con inóculos jóvenes, el biovolumen de la población bacteriana total supone un valor superior al 0,4% del biovolumen algal (figura 4.2).

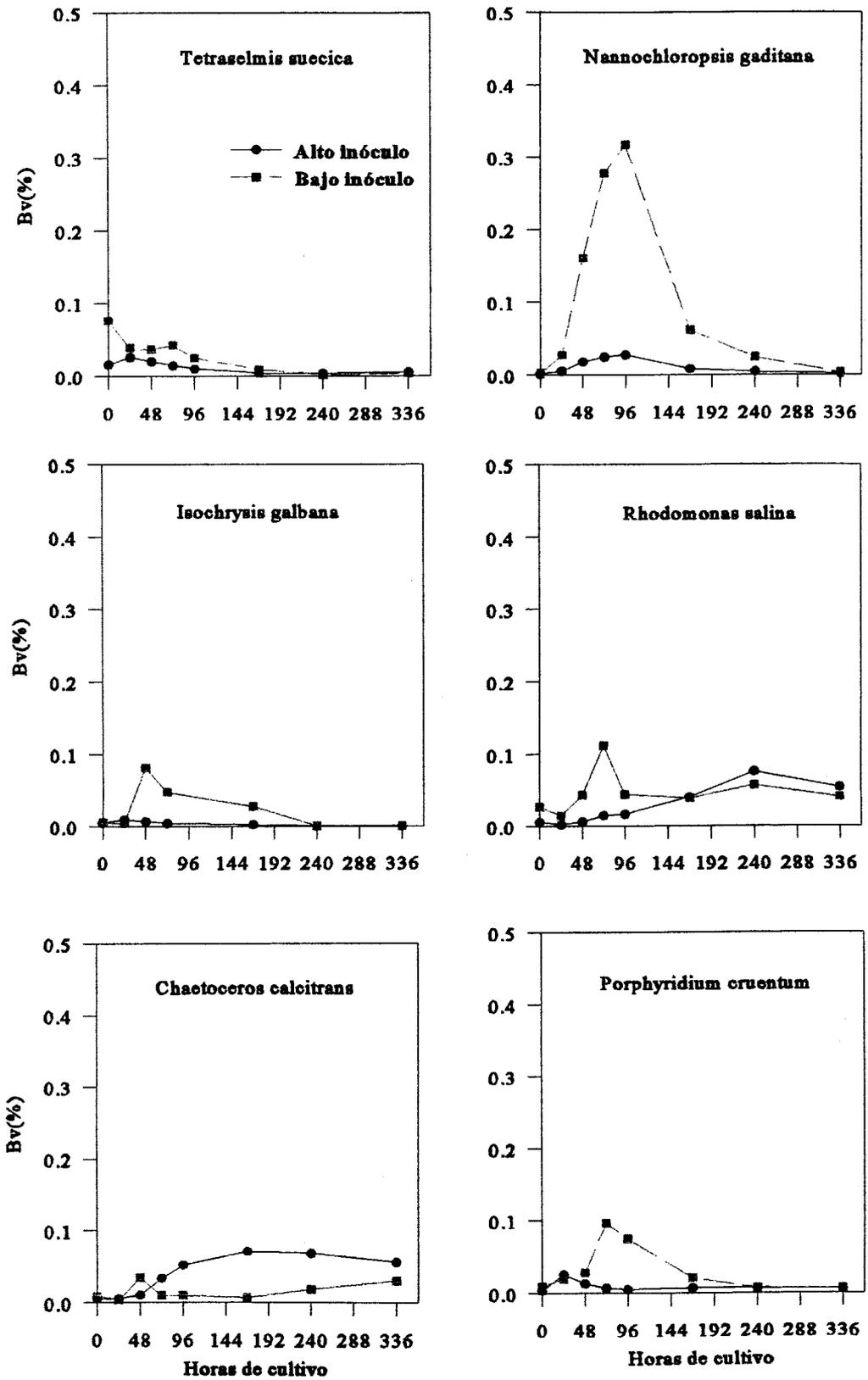


Figura 4.3: Relación entre el biovolumen de la población bacteriana total y la población de microalgas, en los seis casos estudiados

4.3.-ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS DE POSIBLE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

4.3.1.-Identificación y estudio de la producción de pigmentos en *Alteromonas*

Las cepas bacterianas de color rojo intenso, aisladas a partir de un gran número de microalgas, producen una serie de pigmentos que se han estudiado mediante HPLC. En el análisis que se ha realizado mediante esta técnica aparecen tres grupos claramente definidos, el primer grupo entre los minutos 12 a 16, este grupo es el principal responsable del color rojo de las bacterias y en él se encuentra el pigmento mayoritario. El segundo grupo lo componen dos picos, con tiempos de retención alrededor del minuto 18, que tienen los mismos espectros de absorción y se distinguen únicamente por los tiempos de retención. Estos pigmentos son de color amarillo, y su espectro es muy similar a los de las xantofilas con los mismos máximos de absorción de la 3,4,3',4'-tetrahidrobisanzohydrobacterioruberina, 3,4,3',4'-tetrahydrospirilloxantina, lycoxantina, licopeno y lycofila (Foppen, 1971, Bauernfeind, 1981). Sin embargo, ninguno de estos carotenoides está epoxidado y como se ha dicho en el capítulo de resultados estos pigmentos de color amarillo sí lo están, por lo que cabe la posibilidad de que se trate de formas epoxidadas de alguno de estos carotenoides o de alguno similar. La purificación del pico principal de este segundo grupo de pigmentos ha sido insuficiente para someterlo a RMN y análisis de espectrometría de masas, ya que era aislado de extractos que daban medidas de absorbancia muy altas, pero sin embargo se obtenía poca masa a partir de ellos. Es de suponer por tanto, que poseen un coeficiente de extinción específico muy alto. El tercer grupo está constituido por una serie de pigmentos minoritarios, con tiempos de retención entre los minutos 20 a 25 y posee también unos espectros similares a los de las xantofilas. Lo destacable de este grupo es que se produce un desplazamiento progresivo entre los máximos de absorción de estos picos hacia el ultravioleta, de este modo el pico 5 tiene el máximo de absorción a 474nm, claramente en el visible, mientras que el pico 7 tiene su máximo a 393 nm, ya en el ultravioleta, de hecho a continuación de este pico se detecta la cola de otro que se encuentra en el UV y cuyo máximo está por debajo de 350 nm, que ha sido el límite de detección en los análisis realizados mediante HPLC.



Aunque el espectro de absorción de la fracción principal y su peso molecular ($P_m=666$) no difiere del de un carotenoide, el hecho de que la única extracción eficiente se consiguiera con triclorometano, ya hacía pensar que se trataba de un lípido de distinta naturaleza. Los análisis de RMN de protón y de ^{13}C indican la presencia de una cadena larga alquílica, que no corresponde con lo que cabría esperar en un compuesto del tipo de los carotenoides. La estructura propuesta, con un anillo, que podría ser una quinona, y dos largas cadenas alquílicas, es la que mejor se ajusta a las características del compuesto: naturaleza lipídica, peso y estructura molecular, que permite la obtención de los máximos de absorción que se han detectado.

Las bacterias productoras de este pigmento característico, son uno de los grupos bacterianos que aparece con más frecuencia asociado a las distintas cepas de microalgas de la colección. En ninguno de los 6 casos de microalgas estudiados, este grupo bacteriano representa la población bacteriana mayoritaria asociada al cultivo de microalgas, pero sí una de las poblaciones bacterianas más abundantes, como sucede en el caso de *T. suecica* o *C. calcitrans*. Sin embargo, en los cultivos de *I. galbana* aparece como población minoritaria.

Como se ha visto, la producción de pigmentos responsables del color rojo de *Alteromonas* spp. está estrechamente relacionada con el oxígeno disuelto en el medio de cultivo. En una primera aproximación, para contrastar el efecto de las condiciones de agitación-aireación sobre la producción de las distintas fracciones, se pone de manifiesto un claro incremento del pigmento mayoritario (pico 1) con una agitación fuerte-aireación fuerte y unas situaciones intermedias con el resto de las condiciones. Estas respuestas intermedias van a depender de la concentración de aire disuelto que, a su vez, va a estar en función del tamaño de la burbuja y el régimen de turbulencia, parámetros que no han sido determinados en las condiciones experimentales.

Asimismo, el aumento del contenido celular del pico 1, al someter el cultivo a una concentración saturante de oxígeno durante una hora, corrobora el resultado anterior. Es de hacer notar la respuesta inversa del pico 3, respecto al pico 1, en todos los casos. Esto no es de extrañar, ya que el tiempo de elución del pico 3 es mayor que el del pico 1, lo que es indicativo de un compuesto menos oxidado. Las bajas concentraciones o ausencia de oxígeno en el medio provoca una disminución en el contenido celular del pigmento mayoritario, aunque este proceso

es más lento que el anterior. Este tipo de respuesta no es raro y se ha descrito de manera similar en microalgas carotenogénicas, como *Dunaliella salina*, donde la tasa de producción de pigmentos frente a factores de estrés es mucho más rápida que la reversión a las condiciones iniciales (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Como se ha indicado anteriormente estas bacterias producen una gran cantidad de exopolímero laxo, de naturaleza peptídica, y que se adhiere con facilidad a las superficies. Según Decho (1990) a los exopolímeros de distintos microorganismos se les pueden atribuir diversas funciones. Por un lado, pueden crear microentornos alrededor de la bacteria, protegiéndola de agentes externos y amortiguar los efectos producidos por cambios rápidos en el ambiente, como pH, salinidad, desecación o régimen de nutrientes. Asimismo estas excreciones juegan un papel muy importante en la unión bacteriana a superficies y, a su vez, secuestran y concentran nutrientes, a la vez que ofrecen un soporte para el funcionamiento de los exoenzimas. También pueden adoptar funciones de protección contra metales pesados y/u otras toxinas. De este modo podemos decir que el exopolímero bacteriano representa un mecanismo primario de relación entre la bacteria y su entorno.

Se ha observado que el grupo de pigmentos de color rojo se encuentra distribuido en el exopolímero. Aunque no se ha estudiado, ni la fracción de pigmentos ni la cantidad de pigmento presente, aparentemente, en el exopolímero se encuentra una fracción importante de los pigmentos responsables del color rojo.

Existen autores como Escher & Characklis (1982) y Mouguet *et al* (1995), que mantienen la hipótesis de que la presencia de bacterias en los cultivos de microalgas, suponen para estas un efecto beneficioso, dado que disminuyen el exceso de oxígeno acumulado en el entorno próximo a la célula (ficosfera) como resultado de la actividad fotosintética. Esta retirada de oxígeno evitaría o, al menos, reduciría los riesgos de fotorespiración, dado que la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RubisCo) tiene mayor afinidad por este elemento que por el CO₂. Sin embargo, no cabe pensar que este hecho suponga ninguna ventaja de *Alteromonas* frente al resto de las poblaciones asociadas a los cultivos de microalgas, ya que, como ya se ha indicado, en ningún caso ha supuesto la población mayoritaria. No obstante, sería interesante en un futuro

comprobar si la presencia masiva de esta bacteria, inoculandola artificialmente en los cultivos de microalgas, favorece la actividad fotosintética de las mismas.

4.3.2.- Estudio del agente tensioactivo purificado a partir de cultivos de la cepa bacteriana TCOR3 (*P. aeruginosa*), aislada a partir de cultivos de microalgas

P. aeruginosa es una especie bacteriana muy versátil, siendo un patógeno oportunista de distintas especies animales y vegetales (Manual Bergey, 1989). Recientemente se ha descrito la producción de compuestos antialgales por parte de esta especie (Dakhama *et al*, 1993, Parhikova *et al*, 1989), con lo cual hay que considerar la posibilidad de que esta bacteria sea también un patógeno para las microalgas. Sin embargo, esta población no aparece frecuentemente en los cultivos de las microalgas estudiadas, en las condiciones de cultivo establecidas, y de hecho únicamente se detecta la presencia de TCOR3 en cultivos muy envejecidos.

A pesar de que la presencia de esta cepa bacteriana no es significativa en los cultivos de microalgas, el interés existente por los agentes tensioactivos ha impulsado el estudio de la producción del biosurfactante producido por *P. aeruginosa*. Tras la identificación del compuesto se ha procedido al estudio de este mediante las técnicas de HPLC, que se han empleado con éxito en el estudio y la cuantificación de agentes tensioactivos artificiales en sedimento y agua de mar (González Mazo, 1994). Además la metodología de HPLC es un método directo para la determinación de los compuestos tensioactivos, con lo cual es más eficiente que los métodos indirectos empleados, CMC y tensión superficial (Fiechter, 1992).

Como se ha dicho, es frecuente encontrar dos formas del ramnolípido R1, una forma ácida y otra con un éster de metilo (Zhang *et al*, 1995); esta diferencia ha permitido separar las dos formas mediante el sistema de cromatografía empleado. Al comparar ambos espectros de absorción se aprecia que sus máximos coinciden, aunque la forma con el éster de metilo posee una pequeña loma aproximadamente a 270 nm que no aparece en la forma ácida, como se indica en el capítulo de resultados (fig. 3.50). Esta característica no cambia con la salinidad, por lo que se puede proponer el uso de este método para distinguir estas dos formas del ramnolípido de un modo rápido y sencillo. Ello ha permitido determinar fácilmente como afectan las condiciones de

cultivo a las proporciones de las distintas variedades del compuesto.

Se ha descrito que la glucosa es la fuente de carbono que provoca la mayor producción del tensioactivo en esta bacteria, pero en condiciones de agua dulce (Georgiou *et al.*, 1992, Robert *et al.*, 1989). En este trabajo se han comprobado dos fuentes de carbono, glucosa y citrato férrico, esta última constituye la fuente utilizada en el medio de cultivo habitual. El resultado obtenido pone claramente de manifiesto la mayor producción del tensioactivo con glucosa, en la cepa TCOR3 cultivada a la salinidad del agua de mar.

Se sabía igualmente que la salinidad no afecta a la estructura ni a la función del tensioactivo por bacterias de agua dulce (Banat, 1995). Con la cepa estudiada en este caso el óptimo de producción se obtiene a la salinidad del agua de mar, comprobándose también que la salinidad no afecta a la composición del tensioactivo y que su estructura es la misma que la del tensioactivo producido por las cepas de agua dulce.

Además de los dos picos principales (picos 1 y 4) aparecen otros dos menores (picos 2 y 3) cuya naturaleza es desconocida, aunque cabe esperar que sean compuestos derivados de los anteriores ya que sus espectros de absorción son muy similares.

Conclusiones

1.- En los cultivos de microalgas marinas estudiados aparece una amplia variedad de bacterias que se han caracterizado por el tamaño y forma de las colonias, así como por sus respuestas a distintas pruebas bioquímicas, aunque sin llegar en la mayor parte de los casos a su identificación taxonómica.

2.- La variabilidad de las características bioquímicas y fisiológicas de las poblaciones bacterianas ha impedido determinar el posible grado de especificidad entre una determinada microalga y sus bacterias asociadas. En términos generales, las bacterias Gram negativas son las más abundantes representando el 84,7% de todas las cepas aisladas.

3.- Existe un claro paralelismo entre las curvas de crecimiento de las poblaciones de microalgas y las de sus poblaciones bacterianas asociadas, que unido al hecho de que estas bacterias no crecen en el medio de cultivo algal, lleva a la consideración de que existe una relación de dependencia entre ambas.

4.- En el intervalo de valores ensayados, el tamaño del inóculo no afecta al crecimiento de las poblaciones, tanto de las microalgas estudiadas como de sus poblaciones bacterianas asociadas. Asimismo, en las condiciones experimentadas, la edad del inóculo tampoco influye sustancialmente en el crecimiento de las microalgas, per sí en el crecimiento bacteriano, que puede aumentar su población en algunos casos hasta dos ordenes de magnitud (*I. galbana* y *C. calcitrans*), cuando se utilizan inóculos envejecidos.

5.- Con excepción de *R. salina*, cuando se utilizan inóculos jóvenes, las densidades de células alcanzadas por las poblaciones bacterianas se mantienen por debajo de las alcanzadas por las microalgas y, en cualquier caso, supone un porcentaje de biovolumen menor del 0,5% del biovolumen algal. No obstante, existen diferencias notables respecto a la carga bacteriana que soportan las distintas microalgas y que varían entre $0,5 \cdot 10^6$ UFC en *N. gaditana* hasta 10^7 UFC en *R. salina*.

6.- La cepa bacteriana *Alteromonas* sp. posee un perfil pigmentario característico, del que se puede destacar la presencia de un pigmento mayoritario de color rojo, para el que tras los análisis realizados se propone la siguiente fórmula química: 2-(1'oxo-3'exa,5',7',8', trimetil-nonanil)-2,5-dien-3metil-4-etinil-6-(2'',12''-dihidroxy-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9''-heptametil-tridecanil)-ciclohexanona. El coeficiente de extinción molar determinado para este pigmento posee un valor de $\epsilon = 8303,68$.

7.- La producción del pigmento de color rojo presente en la cepa bacteriana *Alteromonas* sp. está relacionada con la presencia de oxígeno en el medio de cultivo, incrementándose la producción a altas concentraciones de este gas. A su vez, la producción de este pigmento por célula resultó ser dependiente de la fuente de carbono y de la presencia o ausencia de hierro en el medio de cultivo, no afectando ninguno de estos parámetros al crecimiento bacteriano.

8.- La cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* aislada a partir de cultivos de la microalga *Tetraselmis suecica*, produce un compuesto tensioactivo identificado como un ramnolípido del tipo R1.

9.- La producción de este ramnolípido puede ser estudiada tanto cuantitativamente, como cualitativamente mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC).

10.- La producción del ramnolípido sintetizado por la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* está influenciada por la salinidad del medio de cultivo, obteniéndose un máximo de producción a la salinidad del agua de mar.

- Abu-Ruwaida.A.S., Bannat I.M. Haditirto.S. Salem.A., and Kadri.M.** (1991) Isolation of biosurfactant-producing bacteria product caracterizacion, and evaluation. *Acta Biotechnologica*, 4, 315-324.
- Agustí, S., Duarte, C., and Kalff, J.** (1987) Algal cell size at the maximum density and biomass of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 32(4), 983-986.
- American Public Health Association (APHA)** (1985) Standart methods for the examination of water and wastewater. 16^a ed. *Am. Health Association, Inc.* Washington DC .126 pp
- Andersen, S.R., and Sandaa, R.A.** (1994) Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl. Eviron. Microbiol.*, 60(3), 908-912.
- Anderson, J. G., Boonruang, P., and Meadows, P. S.** (1981) Interrelationships between chlorophylls, carbon, nitrogen and heterotrophic bacteria in an intertidal sediment transect.. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 6, 277-283.
- Arjonilla, M., Forja, J.M., y Gómez-Parra, A.,**(1993). Determinación de carbono orgánico en agua de mar con un autoanalizador TRAACS-800. *Series de Química Oceanográfica*, 213, 48-59.
- Aubert M., and Aubert J.** (1986) Eutrophie et dystrophie en milieu marin phenomenes planctoniques et bacteriens. *Revue Inter. d'Ocoenograp. Medicale*, 83-84, 0-302.
- Austin, B.,** (1988). Marine microbiology. *Cambridge University Press* pp.222
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., and Thingstad, F.** (1983) The ecological role of Water-column microbes in the sea. *Mar.Ecol. Prog. Ser.*, 10, 257-263.

Azam, F., Smith, D.C., Steward, G.F., and Hagstrom, A. (1993) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.*, 28, 167-179.

Banat, I.M. (1993) The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.*, 15, 591-594.

Barcina, I., Ayo, B., Unanue, M., Egea, L., and Iriberry J. (1992) Comparison of rates of flagellate bacterivory and bacterial production in a marine coastal system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12), 3850-3856.

Bauernfeind, J.C. (1981) Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. *Technological and nutritional applications. Academic Press.* pp 883-917

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) *ed. William & Willkins* V, 1, 2, 3.

Berland, B.R., Bianchi, M.G., et Maestrini, S.Y. (1969) Etude des bacterias asociées aux algues marines en culture. I: Determination preliminaire des especes. *Marin. Biol.*, 2, 350-355.

Berland, B.R., Bonin, D.J., and Maestrini, S.Y. (1970) Study of bacteria associated with marine algae in culture. III: Organic substrates supporting growth. *Marin. Biol.*, 5, 68-76.

Berman, T., Hoppe, H.G., and Gocke, K. (1994) Response of aquatic bacterial populations to substrate enrichment. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 104, 173-184.

Bertrand, J.C., Bonin, P., Goutx, M., and Mille, G. (1993) Biosurfactant production by marine microorganisms: Potential application to fighting hydrocarbon marine pollution. *J.Mar. Biotechnol.*, 1, 125-129.

Bird, D.F., and Duarte, C.M. (1989) Bacteria-organic matter relationship in sediments: a case of spurious correlation. *Can. J. Fish: Aquat. Sci.*, 46, 904-908.

Bird, D.F., and Kalff, J. (1984) Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*, 41, 10015-1023.

Brisou, J.F. (1980) Les bacteries marines. *Collection de biologie des Milieux Marins. Masson. Paris* pp.209

Bjornsen, P.K., (1988) Phytoplankton exudation of organic matter: Why do healthy cells do it?. *Limnol. Oceanogr.*, 33,1, 151-154.

Boetius, A., and Lochte, K. (1994) Regulation of microbial enzymatic degradation of organic matter in deep-sea sediments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 104, 299-307.

Buck, J.D. (1979) The plate count in aquatic microbiology, In: S W. Costerton & R.R. Colwell (eds.), Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia: 19-28

Buck, J.D. (1982) Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4), 992-993.

Butcher, R.W., (1967) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part IV. Cryptophyceae. *Fisheries Investigations ser. IV*. Ministry of agriculture, Fisheries and Food.

Button, D.K. (1994) The physical base of marine bacterial ecology. *Microb. Ecol.*, 28, 273-285.

Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., and Robertson, B.R. (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 881-891.

- Cañavate Hors, J.P.** (1995) Respuesta de microalgas marinas a la congelación biológica. Evaluación de técnicas criogénicas para la conservación de seis estirpes. *Tesis doctoral de la Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias del mar*. pp 177
- Castellví, J.**, 1972, Bacteriología marina, En “ Ecología marina”, Cap.7, ed. Fundación Lasalle. p. 201-229
- Cavanaugh, C.M.** (1994) Microbial symbiosis: patterns of diversity in the marine environment. *Amer. Zool.*, 34, 79-89.
- Chrost, R.H., and Faust, M.A.** (1983) Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton.. *J. Plank. Research.*, 5(4), 477-493.
- Cole J.J.** (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann.Rev.Ecol.Syst.*, 13, 291-314.
- Cole, J.J., Likens, G.E., and Strayer, D.L.** (1982) Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, 27(6), 1080-1090.
- Colección Española de Cultivos Tipo** (1990) Ed.Dawson, C. Belloch, C., G^a López, M.D., y Uruburu. 3^a edición p.266
- Cooper, D.G.** (1986) Biosurfactants. *Microbiological sciences*, 3(5), 145-149
- Cooper, D.G., and Goldenberg, B.G.** (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2), 224-229.
- Cooper, D.G., and Paddock, D.A.** (1984) Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(1), 173-176.

- Copper, D.G., Zajic, J.E., and Fergus Gracey, D.E. (1979) Analysis of Corynomycolic acids and other fatty acids produced by *Corynebacterium lepus* grown on kerosene. *J. Bacteriol.*, 137(2), 795-801.
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., and Gerson, D.F. (1979) Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 4-10.
- Cottrell, M.T., and Suttle, C.A. (1993) Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J. Phycol.*, 29, 385-387.
- Dakhama, A., de la Noue, J., and Lavoie, M.C. (1993) Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.*, 5, 297-306.
- Darveau, R.P., and Lynch, D.L. (1977) The antibiotic activity of prodigiosin against certain blue-green and green algae. *Phycologia*, 16(3), 349-351.
- De La Mar, R., and Francis, F.J. (1969) Carotenoid degradation in bleached paprika. *J. Food Sci.*, 34, 287-.
- De Pauw, N., and Persoone, G. (1988). Micro-algae for aquaculture. En "Micro-algal Biotechnology" Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J., (Eds.) *Cambridge University Press.*, Cambridge, p.197-221
- Decho, A.W. (1990) Microbial exopolimer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28, 73-153.
- Delmas, D., Legrand, C., Bechemin, Ch., and Collinot, C. (1994) Exoproteolytic activity determined by flow injection analysis: its potential importance for bacterial growth in coastal marine ponds. *Aquat. Living. Resour.*, 7, 17-24.

Donnison, A.M., Ross, C.M., and Rusell, J.M. (1993) Quality control of bacterial enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 922-923.

Droop, M.R. (1967) A procedure for Routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br. Phycol. Bull.*, 3(2), 295-297.

Epstein, S. S., and Rossel, J. (1995) Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 117, 289-298.

Escher, A., and Characklis, W.G. (1982) Algal-bacterial interactions within aggregates. *Biotechnol. Bioengineer.* XXIV, 2283-2290.

Ewart, J., and Pruder, G.D., (1981). Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff. galbana*, clon T-Iso, at four temperatures and three light intensities. *J. World Mariculture Soc.*, 12, 333-339.

Falatko, D. M., and Novak, J.T. (1992) Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment Research*, 64, 163-169.

FAO/WHO. (1973) Aminoacid content of foods and biological data on proteins. *FAO Nutritional Studies*. 24. Roma. Italy.

Fidalgo Paredes, J.P., (1995). Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. *Tesis Doctoral Universidad de la Coruña*, pp, 217.

Fiechter, A. (1982) Integrated systems of biosurfactant synthesis. *Pure & Appl. Chem.*, 64(11), 1739-1743.

Fleming, C.A., Leung, K.T., Lee, H., Trevors, J.T., and Greer, C.W. (1994) Survival of lux-lac-marqued biosurfactant-producing *Pseudomonas aureuginosa* UG2L in soil monitored by nonselective plating and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5), 1606-1613.

Foppen, F.H. (1971) Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.*, 14, 133-298

Forlani, G., Tosti, E., and Volterra, L. (1989) Growth interactions of phytoplanktonic algae and enteric bacteria. *Rev. Internationale D'Océanographie Méd.*, 93(94), 15-30.

Fuhrman, J.A., McCallum, K., and Davis, A.A. (1992) Novel major archeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 356, 148-149.

Garbisu, C., Gil, J.M., Bazin, M.J., Hall, D.O., and Serra, J.L. (1991) Removal of nitrate from water by foam immobilized *Porhirdium laminosum* in batch and continuous-flows bioreactors. *J. Appl. Phycol.*, 3, 221-234.

García, M.T., Ventosa, A., Ruiz Berraquero, F., and Kocour, M. (1987) Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. *Inter. J. Systematic Bacteriol.*, 37, 251-256.

Garnham, G.W., Codd, G.A., and Gadd, G.M. (1982) Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina*. *J. Appl. Phycol.* 3, 222-234.

Geddie, J.L., and Sutherland, I.W. (1993) Uptake of metals by bacterial polysacchrides. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 467-472.

Georgiou, G., Sung-Chyr Lin and Sharma, M.M. (1992) Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, 10, 60-65.

González Mazo, E. (1994) Comportamiento de alquilbenceno lineal sulfonatos (LAS) en sistemas litorales del golfo de Cádiz. *Tesis Doctoral de la Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias del Mar.* pp.263.

Goodwin, T.W., 1976. Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Goodwin, T.W., (ed.). *Academic Press*, London. Vol. 1, pp 870, Vol. 2, pp 373.

Guerra-Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. (1984) *Pseudomonas aureaginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(2), 301-305.

Guillard, R.R.L. 1959. Further evidence of the destruction of the bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull.* 117, 258-266.

Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. En Stein, J.R., (ed.). Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press.* 289-311.

Guillard, R.R.L., and Ryther, J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Denotula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.

Harwood, J. L., and Rusell, N. J., 1984. Lipids in plants and microbes. *George Allen and Unwin ed.* London. pp. 162

Heinanen, A., Kononen, K., Kuosa, H., Kuparinen, J., Makela, K. (1995) Bacterioplankton growth associated with physical fronts during a cyanobacterial bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116, 233-245.

Hepimstall, J.A., and Fuller, R.L. (1994) Periphyton reactions to different light and nutrient levels and the response of bacteria to these manipulations. *Arch. Hydrobiol.*, 131(2), 161-173.

Hibberd, D.J. and Leadle, G.F., (1970). Eustigmatophyceae a new algal class with unique organization of the motile cell. *Nature*, 255, 758-760.

Hibberd, d.j. and Leadle, G.F., (1971). A new algal class- Eustigmatophyceae. *Taxon*, 20(4), 523-525.

Hibberd, D.J. and Leadle, G.F., (1972). Observations on the cytology and ultrastructure of new algal class, Eustigmatophyceae. *Ann. Bot.*, 36, 79-71.

Hill, D.R.A., and Wetherbee, R., (1989). A reappraisal of the genus *Rhodomonas* (Cryptophyceae). *Phycologia*, 28, 143-158.

Hobbie, J.E., Daley R.J. and Jasper S. (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(5), 1225-1228.

Hollibaugh, J.T., Steibert, D.L.R. and Thomas, W.H., (1981) Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species. *F. Phycol.*, 17, 1-9.

Hopkinson, Jr., C.S., and Vallino, J.J. (1994) Toward the development of generally applicable models of the microbial loop in aquatic ecosystems. *Microb. Ecol.*, 28, 321-326.

Ietswaart, T., Schneider, P.J., and Prins, A. (1994) Utilization of organic nitrogen sources by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5(60), 1554-1560.

Iqbal, M., Grey, D., Sepan-Sarkissian, G. and Fowler, M.W. (1993) Interactions between the unicellular red alga *Porphyridium cruentum* and associated bacteria. *Eur. J. Phycol.*, 28, 63-65.

- Jepras, R.I., Carter, J., Pearson, S.C., Paul, F.E., and Wilkinson, M.J.** (1995) Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(7), 2696-2701.
- Joiris, C.** (1977) On the role of heterotrophic bacteria in marine ecosystems: Some problems. *Helgolander wiss.Meeresunters*, 30, 611-621.
- Kaspar, C.W., and Tamplin, M.L.** (1993) Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8), 2425-2429.
- Kelly, M., Norgard, S., and Liaaen-Jensen, S.** (1970) Bacterial Carotenoids: XXXI. *C50-carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially Bacterioruberin. *Acta. Chem. Scand.*, 24, 2169-2182.
- Kemp, P.F., Lee, S., and LaRoche, J.** (1993) Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8), 2594-2601.
- Keshtacher-Liebson, E., Hadar, Y., and Chen, Y.** (1995) Oligotrophic bacteria enhance algal growth under iron-deficient conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2439-2441.
- Kramer, J.G., and Singleton, F.L.** (1993) Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the southeastern U.S. continental Shelf. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8), 2430-2436.
- Kroer, N.** (1994) Relationships between biovolume and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 13, 217-224.
- Kroer, N., Jorgensen, N.O.G., and Coffin R.B.** (1994) Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: a comparison of three ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(11), 4116-4123.

Kushner, D. J. 1985. The Halobacteriaceae, En "The bacteria" C. R. Woese and R. S. Wolfe (ed.), vol. 8. *Academic Press, Inc. (London), Ltd.*, London, p.171-214.

Lebaron, P., and Joux, F. (1994) Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 60(12), 4345-4350.

Lee, R.E., (1989). Phycology. *Cabridge University Press* 2nd ed. pp, 645.

Lee, S., and Fuhrman, J.A. (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56-6, 1298-1303.

Lee, S.H., Kang, Y. CH., Fuhrman, J. A. (1995) Imperfect retention of natural bacterioplankton cells by glass fiber filters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119, 285-290.

Lindell, M.J., Graneli, W., Tranvik, L.J. (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.*, 40(1), 195-199.

Litchfield, C.D. (1976) Marine Microbiology. *Blenchmark Papers in Microbiology Vol. 11. Dowden. Hutchinsonson & Ross. Inc.* pp. 517.

Lizhu Wang and Priscu J.C. (1994) Influence of phytoplankton on the response of bacterioplankton growth to nutrient enrichment. *Freshwater Biology*, 31, 183-190.

López-Amoros, R., Comas, J., and Vives-Rego, J. (1995) Flow cytometric assesment of *E.coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater usin rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(7), 2521-2526.

López Alonso, D., Molina Grima, E., Sánchez Perez, J.A., García Sánchez, J.L., and García Camacho, F. (1992.) Fatty acid variation among different isolates of a single strain of *Isochrysis galbana*. *Phytochemistry*, 31(11): 3901-3904

- Losada, I., Lorenzo, H., Morales, E., y Fábregas, J.** (1993) Separación de microalgas mediante dextrano-polietilenglicol y bacterias a partir de un cultivo mixto. *Actas del congreso de Ficología. III congreso Latinoamericano. 1ª Reunion Iberoamericana. I Congreso Mexicano.* p. 67
- Lubián, L.M.** (1979). Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica marina *Nannochloris* sp. *Ind. Técn. Inst. Pesq.* 67, 1-14
- Lubián, L.M.** (1981). Crecimiento en cultivo de cuatro cepas de *Nannochloris* (alga planktónica). Estudio de su citología y composición de pigmentos como base para el esclarecimiento de su situación taxonómica. *Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.* pp 186
- Lubián, L.M.** (1982) *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa* 4, 287-293.
- Lubián, L.M. y Establier, R.** (1982) Estudio comparativo de la composición de pigmentos en varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) *Inv. Pesq.* 46, 379-389.
- Lubián, L.M. y Establier, R.** (1983) Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana* Lubián, 1983 (Eustigmatophyceae) durante su crecimiento. *Inv. Pesq.* 47 (1), 29-37.
- Lubián, L.M. and Yúfera, M.** (1989). Culture collection of microalgae of the Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). *Acuicultura Intermareal.* M. Yúfera (Ed.) Inst. Cienc. Mar. Andalucía, Cádiz. p: 69-78
- Lund, J.W.G., Kipling, C., and Le Cren, E.D.** (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11, 143-170.

Macdonald, C.R., Cooper, D.G., and Zajic, J.E. (1981) Surface active lipids from *Nocardia erythropolis* grown in hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(1), 117-123.

Manual Difco (1984) Décima edición . pp. 1166.

Márquez, M.C., Ventosa, A., and Ruiz-Berraquero, F. (1987) A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. General Microbiol.*, 133, 45-46.

Márquez, M.C., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero F. (1992) Phenotypic and chemotaxonomic Characterization of *Marinococcus halophilus*. *System. Appl. Microbiol.*, 15, 63-69.

Matulova, M., Toffanin, R., Navarini, L., Gilli, R., Paoletti, S., Cesaro, A. (1994) NMR analysis of succinoglycans from different microbial sources: partial assignement of their H and C NMR spectra location of the succinate and theacetate groups. *Carbohydrate Research*, 265, 167-179.

Miller, K.J., (1991). Do periplasmic oligosaccharides provide a role in the osmotic adaptation of gram-negative bacteria?. En *Geneal and applied aspects of halophilic microrganisms*, ed. Rodríguez-Valera, F., Plenum Press, New York., p.243-248.

Mínguez-Mosquera, M.I., Jaren-Galan, M., Gandul-Rojas, B., and Fiestas-Ros de Ursinos, J. (1991) Chlorophyll and carotenoid composition of the algal flora developed under immobilized conditions-influence of the support. *Biomass and Bioenergy*, 1(6), 347-353.

Montgomer, M.T., and Kirchman, D.L. (1994) Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), 4284-4288.

Montoura R.F.C., and Llewellyn, C.A. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their break products in natural waters by reverse-phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal. Chem. Acta.*, 151, 297-314

Moreno-Garrido, I., González-delValle, M., Montero, O., and Lubián, L.M. (1994) Comparative copper accumulation by dead and alive marine microalgae (*Nannochloropsis gaditana* Lubian) *Revista de Geociências, Museu Nacional de História Natural, Universidade de Lisboa.* 57-58.

Mouget, J.L., Dakhama, A. Lavoie, M.C., and de la Noue, J. (1995) Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18, 35-44.

Mukerjee, P. (1956) Use of ionic dyes in the analysis of ionic surfactants and other ionic organic compounds. *Analytical Chemistry*, 28(5), 870-873.

Nakano, M.M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A.D., and Zuber, P. (1991) srfA is an operon required for surfactin production competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.*, 173(5), 1770-1778.

Norgard, S., Aasen, J.A., and Liaanen-Jensen, S. (1970) Bacterial Carotenoids:XXXII. *C50-carotenoids.* Carotenoids from *Corynebacterium poinsettiae*. Including four new C50-diols. *Acta. Chem. Scand.*, 24, 2183-2197.

Obernosterer, I., and Herndl, G.J. (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116, 247-257.

Oliver, J.D. (1982) Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Research*, 29(6a), 795-798.

- Oppenheimer, C.H.**, 1955. The effect of bacteria on the development and hatching of pelagic fish eggs, and the control of such bacteria by antibiotics. *Copeia*, 1955, 43-49.
- Oren, A.**, (1991). Estimation of the contribution of Archeobacteria and Eubacteria to the bacterial biomass and activity in hypersaline ecosystems: Novel approaches, En *General and applied aspects of halophilic microorganisms*, ed. Rodríguez-Valera, F., *Plenum Press.*, New York., p. 25-31.
- Otero Casal, A.M.**, (1994). Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. *Tesis Doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela*, pp163.
- Palmer, C.J., Tsai, Yu-Li, Lang, A.L., and Sangermano, L.R.** (1993) Evaluation of collilert-marine water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 786-789.
- Parshikova, T.V., and Negrutskiy, S.F.** (1989) Effect of surfactant on algae (A review). *Scripta Technica. Inc.* p. 47-58.
- Podamo, J.** (1972) Relation entre des populations sucesives de phytoplancton et des bacteries heterotrophes dans le bassin de Casse D'Ostende (Belgique), en 1971. *Extr. des Ann. de la Societ. Roy. Zool. Bel.*, 102(3), 135-142.
- Poremba, K.** (1993) Influence of synthetic and biogenic surfactants on the toxicity of water-soluble fractions of hydrocarbons in sea water determined with the bioluminescence inhibition test. *Environmental Pollution*, 80, 25-29.
- Poremba K., and Gunkel, W.** (1991) Marine Biosurfactants III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z.Naturforsch.*, 46c, 210-216.
- Porter, J., Diaper, J., Edwards, C., and Pickup, R.** (1995) Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(7), 2783-2786.

Porter, K.G., and Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol.Oceanogr.*, 25(5), 943-948.

Priddle, J., Leakey, R., Whitehouse, M., Robins, D., Cripps, G., Murphy, E., and Owens, N. (1995) Nutrient cycling by antarctic marine microbial plankton.. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116, 181-198.

Provasoli, L. (1958) Effect of plant hormones on Ulva. *Biol. Bull.* 114, 375-384.

Regan, D.L., 1988. Other microalgae. En "Micro-algal Biotechnology" Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., (Eds.) *Cambridge University Press.*, Cambridge, p.122-151.

Reich, K., and Kahn, J., 1954. A Bacteria-free culture of *Prymnesium parvum* (Chrysoomonadina). *Bull. Res. Council Israel*, 4, 49-144.

Rochelle, P.A., Cragg, B.A., Fry, J.C., Parkes, R.J. (1994) Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15, 215-226.

Rodríguez-Valera, F., (1988). Halophilic bacteria. Rodríguez-Valera, F., (ed.), *CRC Press*. Boca Raton, Florida, Vol.1 pp. 149, Vol. II pp. 142.

Russell, N.J. and Adams, R.L., (1991) Effects of salinity on membrane lipids and membrane-derived oligosaccharides.. En *General and applied aspects of halophilic microorganisms*, ed. Rodríguez-Valera, F., *Plenum Press*, New York., p.225-231.

Sandaa, R.A., Enger, O. (1994) Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), 4234-4238.

Santore, U.J., (1984). Some aspects on taxonomy in the Cryptophyceae. *New Phycol.*, 98, 627-646.

Shelef, G. And Soeder, C.j. (eds.) (1980) Algae biomass production and use. *Elsevier-North Holland. Biomedical Press. Amsterdam.* pp. 852.

Siefermann-Warms, D. (1988). *J.Cromatography.* 448, 411-416.

Simon, M., and Tilzer, M.M. (1987) Bacterial response to seasonal Changes in primary production and phytoplankton biomass in Lake Constance. *J. Plankton. Res.*, 9, 535-552.

Singh,K., and Caplan, S.R. (1980) The purple membrane and solar energy conversion. *TIBS*, March, 62-64.

Sizemore, R.K., and Colwell, R.R. (1977) Plasmid carried by antibiotic-resistant marine bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 12(3), 373-382.

Soli, G., 1963. Axenic cultivation of a pelagic diatom. En *Marine Microbiology*, Thomas, C.C., *Oppenheimer. C. Ed.*, p 26-121.

Soli, G., 1964. A system for isolating phytoplankton organisms in unialgal and bacteria-free culture. *Limnol. Oceanogr.*, 9, 8-265.

Spanggaard, B., Jorgensen, F., Gram, L. and Huss, H.H. (1993) Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and unpolluted stream in Denmark.. *Aquaculture*, 115, 195-207.

Stoeckenius, W. (1976) The purple membrane of salt loving bacteria. *Science*, 239 , 38-46.

Stewart, W.D.P. (1974), "Algal Physiology and Biochemistry", Stewart, W.D.P., (Ed.) *Blackwell Scientific Publications*, p. 909-917

Sugita Haruo, Asai Tatsumi, Hayashi Kazuhide, and Mitsuya Takahito. (1992) Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida* *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12), 4072-4075.

Sukenik, A. and Wahnon, R., (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 97, 61-72

Sundin, G.W., and Bender, C.L. (1993) Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(4), 1018-1024.

Sundin, G.W., Demezas, D.H., and Bender, C.L. (1994) Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), 4421-4431.

Tanaka, Y. (1993) Aerobic cellulolytic bacterial flora associated with decomposing *Phragmites* leaf litter in seawater lake. *Hidrobiologia*, 263, 145-154.

Thomas, D.N., and Lara, R.J. (1995) Photodegradation of algal derived dissolved organic carbon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116, 309-310.

Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamemura, M., and Kates, M. (1986) Classification of non-alkaliphilic Halobacteria based on numerical taxonomic and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.*, 8, 89-99.

Ukeles, R., and Bishop, J. (1975) Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria.. *J. Phycol.*, 2(2), 142-149.

Uriarte, I., Farias, A., Seoane, J., Peña, J.B. y Mestre, S., (1990). Flora bacteriana presente en cultivos de diatomeas planctónicas marinas. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* p, 913-916.

Van Dyke, M.I., Gulley, S.L., Lee, H., and Trevors, J.T. (1993) Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *J. Industrial Microbiol.*, 11, 163-170.

Van Dyke, M.I., Lee, H. and Trevors, J.T. (1991) Applications of microbial surfactants. *Biotech. Adv.*, 9, 241-252.

Vater, J. (1986) Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Progres in colloid and polymer science*, 72, 12-18.

Ventosa, A., Garcia, M.T., Kamekura, M., Onishi, H., and Ruiz-Berraquero, F. (1989) *Bacillus Halophilus* sp.nov., a Moderately halophilic *Bacillus* Species.. *System Appl. Microbiol.*, 12, 162-166.

Ventosa, A., Marquez, M.C., Ruiz-Berraquero, F., and Kocur, M. (1990) *Salinococcus roseus* gen.nov., sp.nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. *System Appl. Microbiol.*, 13, 2933.

Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., (1982) Numerical taxonomi of moderately halophilic Gram-negative rods. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1959-1968.

Wheeler, P.A., and Kirchman, D.L. (1986) Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanogr.*, 31(5), 998-1009.

Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231-241

Yúfera, M., and Lubián, L.M. (1990) Effects of microalgae diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture, En "Introduction to Applied Phycology" Akatsuda (Ed.) *SBP Academic Publishing*, Japan, p. 209-227

Zhang, Y., and Miller, R.M. (1995) Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2247-2251.

ZöBell, C.E., 1961, Low Temper. *Microbiol. Sympos.*, Camden N.J., p. 107-132

Zweifel, U., and Hagstrom, A. (1995) Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2180-2185.

MANUEL ANTONIO GONZALEZ DEL VALLE

Cooperativación y crecimiento de las pobla-
ciones boaterianas asociadas a cultivos de micro-
algas. sus áreas: Producción de compuestos de potencial Inter
APTO CUM LAUDE

2 Julio 97

Cenarrano

José [Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]



501038740

FBI E TD / 382

1038740