



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“Relación entre el fitoplancton y el bacterioplancton  
bajo dos regímenes de fertilización en mesocosmos con  
presencia de sedimentos”**

**Tesis de Grado**  
**Previa a la obtención del título de:**

**MAGISTER EN CIENCIAS**

**Presentada por:**  
**Edgar Alfonso López Landavery**

**Guayaquil – Ecuador**

**2004**

**TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:**



**FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL**



**COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA**



**UNIVERSIDAD DE GANTE  
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE LOVAINA – BÉLGICA**

## VITA

Edgar Alfonso López Landavery, hijo de Alfonso López Infante y Nelly Landavery Rugel, nació el 27 de noviembre de 1978 en la ciudad de Tumbes, Perú. En agosto del 2001 se gradúa como Bachiller en Ingeniería Pesquera en la Universidad Nacional de Tumbes y empieza su vida profesional en la empresa RSUR Inversiones S.A.C en el departamento de Producción Acuícola, desempeñando el cargo de asistente de producción hasta su incorporación en septiembre del 2002 al Programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, financiado por la Cooperación Técnica Belga. En octubre del 2003 recibe el título de Ingeniero Pesquero en la Universidad Nacional de Tumbes.

## DECLARACIÓN EXPRESA

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

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

---

**Edgar López Landavery**

**TRIBUNAL DE TESIS**

---

**Jorge Calderón V., Ph.D.****Presidente del Tribunal**

---

**Laurence Massaut, Ph.D.****Director de Tesis**

---

**Ricardo Cedeño****Miembro del Tribunal**

---

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

---

**Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D.****Miembro del Tribunal**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme la fuerza y el entendimiento necesario para salir adelante ayer, hoy y siempre.

A mis padres y hermanos por todo su amor, comprensión y paciencia. Gracias por creer en mí. Siempre los llevaré en mi corazón con admiración y respeto.

A Laurence Massaut, Ph.D, mis más sinceros agradecimientos por su admirable vocación de trabajo, guía incondicional y continua ayuda para la realización de esta tesis.

A Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D, por las críticas constructivas para mejorar el trabajo.

A la plana docente de maestría, por los valiosos conocimientos impartidos.

A mis compañeros de promoción: Sara, Jacqueline, Milviana, Albert, Ricardo, Juan y José Luis. De todo corazón, gracias por las experiencias vividas. Me llevo lo mejor de ustedes.

Al personal de los laboratorios de análisis ambiental químico y microbiológico por la guía y ayuda recibida.

Al personal del área de moluscos y mantenimiento por su apoyo en el acondicionamiento del set experimental.

Al ECUADOR y su gente. Gracias por haberme adoptado todo este tiempo.

## DEDICATORIA

A los seres más preciados que me ha regalado Dios:

A mamá : Por su incansable lucha a través de los años para hacer de nosotros hombres de bien.

A Gady: Gracias gatita por todo el amor y la comprensión brindada. Fuiste y serás un pilar fundamental en mi vida.

A Edward y Nicole: *Gracias angelitos por convertirse en mi aliciente de lucha ayer, hoy y siempre.* Viviré para verlos felices.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. La trama alimenticia en piscinas camaroneras:.....	3
2.2. relación fitoplancton-zooplancton:.....	7
2.3. relación fitoplancton-bacteria: .....	9
2.4. Relación bacteria-zooplancton: .....	12
2.5. Sedimento y el reciclaje de la materia orgánica:.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
3.1. Diseño experimental:.....	19
3.2. Descripción y cuantificación del plancton:.....	21
3.3. Descripción y cuantificación de las bacterias: .....	22
3.4. Análisis de los nutrientes y sólidos: .....	23
3.6. Análisis de datos:.....	24
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Efecto de la fertilización inorgánica:.....	27
4.1.1. Variables de calidad de agua :.....	27
4.1.2. Condición del suelo: .....	35
4.1.3. Análisis de componentes principales y regresión múltiple:.....	36
4.2. Efecto de la fertilización orgánica:.....	39

4.2.1. Variables de calidad de agua :.....	39
4.2.2. Condición del suelo: .....	46
4.2.3. Análisis de componentes principales y regresión múltiple:.....	47
4.3. Fertilización inorgánica versus fertilización orgánica:.....	50
5. DISCUSIÓN .....	54
5.1. Efecto de la fertilización inorgánica:.....	54
5.2. Efecto de la fertilización orgánica:.....	60
6. CONCLUSIÓN .....	64
ANEXO 1 .....	85
ANEXO 2 .....	86

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Localización geográfica del lugar de estudio.....	20
Figura 2: Evolución en el tiempo para variables de calidad de agua del régimen de fertilización inorgánica: (a) clorofila <i>a</i> , (b) conteos de cianobacterias, (c) conteos de diatomeas, (d) densidades de zooplancton, (e) conteos de bacterias totales y (f) conteos de <i>Vibrio</i> spp. ....	30
Figura 3: Evolución en el tiempo para los análisis de sólidos del régimen de fertilización inorgánica: (a) TDS, (b) TSS, (c) DIM, (d) PIM, (e) DOM y (f) POM.....	34
Figura 4: Evolución en el tiempo para variables de calidad de agua del régimen de fertilización orgánica: (a) clorofila <i>a</i> , (b) conteos de cianobacterias, (c) conteos de diatomeas, (d) densidades de zooplancton, (e) conteos de bacterias totales y (f) conteos de <i>Vibrio</i> spp. ....	42
Figura 5: Evolución en el tiempo para los análisis de sólidos del régimen de fertilización orgánica: (a) TDS, (b) TSS, (c) DIM, (d) PIM, (e) DOM y (f) POM.....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Diseño experimental y descripción de las combinaciones de los factores para los dos experimentos.....	21
Tabla 2:	Valores p obtenidos de ANOVA medidas repetidas y Kruskal Wallis (*) para los efectos principales fertilización (F), sedimento (S), tiempo (T) y sus interacciones para las variables de calidad de agua evaluadas durante el experimento de fertilización inorgánica.....	28
Tabla 3:	Promedio por tratamiento de las variables de calidad de agua ( $\pm$ desviación estándar) evaluadas durante el experimento de fertilización inorgánica. ....	29
Tabla 4:	Promedio de las variables de calidad del suelo ( $\pm$ desviación estándar) evaluadas al inicio y final del experimento de fertilización inorgánica a través de ANOVA de una vía. Datos en la misma fila con diferente superíndice y en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).....	35
Tabla 5:	Eigenvalores y varianza explicada por los componentes principales para el experimento de fertilización inorgánica.....	37
Tabla 6:	Coeficientes de correlación entre variables originales y los componentes principales (CP) para el experimento de fertilización inorgánica. Coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.....	37
Tabla 7:	Regresiones múltiples obtenidas durante el experimento de fertilización inorgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados. Ver en el Anexo 2 las ecuaciones con las transformaciones realizadas para cada variable.....	38

Tabla 8:	Valores p obtenidos de ANOVA medidas repetidas y Kruskal Wallis (*) para los efectos principales alimento (A), sedimento (S), tiempo (T) y sus interacciones para las variables de calidad de agua evaluadas durante el experimento de fertilización orgánica.....	40
Tabla 9:	Promedio por tratamiento de las variables de calidad de agua ( $\pm$ desviación estándar) evaluadas durante el experimento de fertilización orgánica. ....	41
Tabla 10:	Promedio de las variables de calidad del suelo ( $\pm$ desviación estándar) evaluadas al inicio y final del experimento de fertilización orgánica a través de ANOVA de una vía. Datos en la misma fila con diferente superíndice y en una misma columna con diferente cantidad de (*) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).....	47
Tabla 11:	Eigenvalores y varianza explicada por los componentes principales para el experimento de fertilización orgánica.....	48
Tabla 12:	Coefficiente de correlación entre las variables originales y los componentes principales (CP) para el experimento de fertilización orgánica. Coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.....	48
Tabla 13:	Regresiones múltiples obtenidas durante el experimento de fertilización orgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados. Ver en el Anexo 2 las ecuaciones con las transformaciones realizadas para cada variable.....	49
Tabla 14:	Valores p obtenidos durante la prueba de Kruskal Wallis para los efectos principales fertilización (F), sedimento (S), tiempo (T) y la interacción fertilización x sedimento (F x S) comparando las variables de calidad de agua entre los dos experimentos de fertilización (fertilización inorgánica versus fertilización orgánica). ....	51

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACP	Análisis de Componentes Principales
DIM	Materia inorgánica disuelta (Dissolved Inorganic Matter)
DN	Nitrógeno disuelto (Dissolved Nitrogen)
DOM	Materia orgánica disuelta (Dissolved Organic Matter)
org/L	Organismos por litro
org/mL	Organismos por mililitro
PIM	Materia inorgánica particulada (Particulate Inorganic Matter)
POM	Materia orgánica particulada (Particulate Organic Matter)
SRP	Fosfato soluble reactivo (Soluble Reactive Phosphate)
TAN	Nitrógeno amoniacal total (Total Ammonia Nitrogen)
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (Thiosulfate Citrate Bilis Sucrose)
TDS	Sólidos disueltos totales (Total Dissolved Solids)
TIM	Materia inorgánica total (Total Inorganic Matter)
TOM	Materia orgánica total (Total Organic Matter)
TS	Sólidos totales (Total Solids)
TSS	Sólidos suspendidos totales (Total Suspended Solids)
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
N	Nitrógeno
P	Fósforo
Al <sup>3+</sup>	Ión aluminio
Fe <sup>3+</sup>	Ión férrico
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio

## RESUMEN

Se estudió el efecto de la fertilización sobre la relación fitoplancton – bacterioplancton a través de dos experimentos con duración de 30 días cada uno, utilizando 24 tanques de una tonelada llenados con agua del canal reservorio de la estación experimental del CENAIM en Palmar (Provincia del Guayas, Ecuador). El diseño fue factorial 2x2 y completamente aleatorizado, con el primer factor correspondiendo al efecto fertilización con dos niveles y el segundo factor a la presencia o ausencia de una capa de sedimento (5-8 cm) en el fondo de los tanques. En el primer experimento, 12 tanques recibieron dos aplicaciones semanales de urea (1,0 mg N/L) y fosfato diamónico (0,1 mg P/L) manteniendo una relación 10N:1P. Durante el segundo experimento, 12 tanques recibieron cada día 1,0 g de alimento balanceado ( $\approx 7N:1P$ ). La aplicación de fertilizantes inorgánicos incrementó las concentraciones de clorofila *a* ( $p < 0,01$ ) que alcanzaron máximos en la segunda y cuarta semana (104 y 109  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente) y los conteos de bacterias totales ( $p < 0,01$ ) que alcanzaron valores máximos en la tercera semana ( $37 \times 10^3$  células/mL). El análisis de regresión múltiple indicó que el fitoplancton respondió principalmente a la adición de N y las bacterias a la adición de P y N. El fitoplancton fue dominado por representantes pequeños de las cianobacterias (*Synechococcus* spp.), característicos de ambientes eutróficos y resistente a la depredación por parte de los copépodos que dominaron el zooplancton al final del experimento. Se encontró una correlación positiva entre fitoplancton y bacterioplancton, sugiriendo la dependencia de la producción bacteriana sobre el carbono orgánico generado por el fitoplancton. Los conteos de *Vibrio* spp. fueron positivamente relacionados con la concentración de nitrógeno disuelto, indicando una respuesta positiva a la acumulación de materia orgánica disuelta en los mesocosmos. A pesar de las

adiciones de nutrientes inorgánicos, no se encontró acumulación de P en los sedimentos y se sugiere que el fitoplancton y las bacterias fueron la ruta principal de remoción del N y P adicionados con los fertilizantes. Durante el segundo experimento, la adición de alimento incrementó las concentraciones de fitoplancton ( $p < 0,01$ ), de bacterias totales ( $p < 0,01$ ), de *Vibrio* spp. ( $p < 0,01$ ) y de zooplancton ( $p < 0,01$ ). Las concentraciones de zooplancton fueron más altas que en el experimento de fertilización inorgánica y se mantuvieron altas hasta el final del experimento, soportando que el zooplancton puede aprovechar directamente el alimento. El análisis de regresión múltiple indicó que el fitoplancton respondió a la adición de N y P y las bacterias a la adición de P. La mineralización de la materia orgánica por parte de las bacterias incrementó las concentraciones de nutrientes inorgánicos que fueron aprovechados por el fitoplancton, lo que evitó el incremento de materia orgánica y P en el suelo. *Vibrio* spp. alcanzaron sus máximos al final del experimento, coincidiendo con la biomasa máxima de cianobacterias, soportando que un incremento en *Vibrio* spp. podría esperarse como resultado del incremento en la población de cianobacterias.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola se basa en procesos ecológicos naturales que consisten de relaciones físicas, químicas y biológicas interdependientes (Kautsky *et al.*, 2000). Sin embargo, el ecosistema es extraordinariamente complejo y la acuicultura en estanques ha llegado a ser vista como un sistema de caja negra donde se comparan las entradas con las salidas y se tiene poco conocimiento de los procesos internos (Boyd y Tucker, 1998). La calidad del agua y suelo juega un rol importante en la salud del animal en cultivo y cualquier deterioro causa estrés, lo cual puede llevar a la aparición de enfermedades por invasión de patógenos oportunistas tales como *Vibrio* spp. (Arulampalam *et al.*, 1998). Las enfermedades (bacterianas y virales) junto con una mala calidad del suelo y del agua son las principales causas de mortalidad en el camarón (Chamberlain, 1997). Un manejo ineficiente es otro factor importante en la disminución del rendimiento productivo (Flegel, 1996).

El manejo de las condiciones de los estanques es esencial para lograr una camaronera productiva. Varias medidas de manejo son usadas para mantener la calidad del agua en estanques. Se controla los niveles de nutrientes para mantener una adecuada biomasa y estructura del fitoplancton logrando establecer niveles óptimos de oxígeno disuelto y promover la asimilación de desechos producidos durante el ciclo de cultivo (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003). Otra estrategia recientemente aplicada, es la remoción de amonio de la columna de agua a través de su asimilación dentro de proteínas microbianas por la adición de carbohidratos en el sistema, tales como melaza y glucosa, estimulando el crecimiento bacteriano (Avnimelech *et al.*, 1995; Avnimelech, 1999).

Pero la efectividad de muchas de estas técnicas de manejo en la gran variedad de sistemas de cultivo existentes, es discutida (Boyd, 1995).

El tratamiento tradicional de las enfermedades bacterianas en el camarón se centra en el uso de antibióticos (Aguirre y Ascencio, 2000). El uso continuo de antibióticos y su persistencia en el sedimento conduce a la proliferación de patógenos resistentes, afecta la descomposición bacteriana de los desechos influenciando la estructura de la comunidad microbiana (Kautsky *et al.*, 2000) y puede acumularse en el tejido del camarón (Aguirre y Ascencio, 2000). Como consecuencia, se observa un incremento en el uso de productos microbianos comerciales en estanques acuícolas como una estrategia alternativa de manejo de enfermedades. Sin embargo, el efecto benéfico de su uso es aún debatible (Devaraja *et al.*, 2002). Por tanto, es crucial encontrar métodos alternativos de control de enfermedades e incrementar el conocimiento de los factores ecológicos controlando la producción, para lograr un manejo más efectivo y la sostenibilidad del cultivo de camarón (Prayitno y Latchford, 1995; Alongi *et al.*, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue definir interacciones entre el fitoplancton, bacterioplancton y niveles de materia orgánica en mesocosmos con presencia de sedimentos y recibiendo diferentes fuentes de nutrientes. Para esto, se evaluaron el efecto de dos regímenes de fertilización (inorgánica y orgánica) sobre el fitoplancton, zooplancton, bacterias totales y *Vibrio* spp. Adicionalmente, se efectuaron análisis de calidad de agua y suelo para correlacionarlos con la estructura de las poblaciones de fitoplancton y bacteria y de esta manera lograr un mejor entendimiento del ecosistema.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LA TRAMA ALIMENTICIA EN PISCINAS CAMARONERAS:

Los estanques camaroneros soportan una diversidad de plantas y animales (Burford, 1997; Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Coman *et al.*, 2003), estableciendo una serie de interacciones entre el fitoplancton, zooplancton, bacterias, camarón y materia orgánica. Existe una relación desde una vía autotrófica dominada por el fitoplancton hacia una vía heterotrófica dominada por las bacterias, siendo la materia orgánica el factor intermedio (Brock y Main, 1995). Las especies bacterianas predominantes en agua y suelo de piscinas camaroneras son de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Sung *et al.*, 1999), que con cambios ambientales pueden causar estrés y mortalidad (Arulampalan *et al.*, 1998). No se conocen los factores ambientales que desencadenan el incremento en la abundancia de este tipo de bacterias. No obstante, a medida que se incrementa la biomasa de los organismos en las piscinas de cultivo, el equilibrio entre los diferentes componentes del ecosistema desaparece (Aguirre y Ascencio, 2000). Para comprender como los cambios ambientales influyen el ecosistema de una piscina camaronera, es necesario entender las interacciones existentes entre los diferentes componentes de la trama alimenticia (Samuelsson, 2003).

Los grupos de zooplancton dominantes encontrados en piscinas camaroneras son los rotíferos (principalmente del género *Brachionus*) y los copépodos (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Preston *et al.*, 2003) con conteos totales que varían fuertemente con el tiempo de cultivo y picos de abundancia ocurriendo al inicio del ciclo de producción. En estanques de cultivo de *Penaeus monodon*, la abundancia máxima es de 2.080 organismos/L, siendo mayor que 1.120 organismos/L encontrados para *Marsupenaeus*

*japonicus* (Coman *et al.*, 2003), pero menor a 5.000 organismos/L reportado para *Litopenaeus vannamei* (Martinez-Córdova *et al.*, 1998a). No obstante, para el resto del cultivo la abundancia cae a valores entre 2 y 61 organismos/L (Coman *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2003). El zooplancton cumple dos funciones en piscinas camaroneras: (1) influencia la dinámica del fitoplancton a través del efecto pastoreo y (2) al servir de presa para el camarón, transfiere carbono hacia niveles tróficos más altos. Coman *et al.* (2003) demostraron que el zooplancton es una adecuada presa para la post-larva de *M. japonicus*, experimentándose una rápida disminución en sus conteos inmediatamente después de la siembra del camarón. Sin embargo, una disminución en la abundancia de zooplancton durante el ciclo de cultivo puede estar relacionada con un deterioro en la calidad de agua (Coman *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2003), ya que concentraciones de amonio no ionizado mayores a 0,2 mg/L han mostrado efectos adversos sobre algunas especies de copépodos (Buttino, 1994). Para incrementar la abundancia del zooplancton, algunos acuicultores introducen fertilizantes orgánicos en los estanques (por ejemplo, mezclas de alfalfa fermentada con melaza, vitaminas y aceite de pescado), favoreciendo la abundancia de copépodos y rotíferos (Boyd y Tucker, 1998; Martinez-Córdova *et al.*, 2002).

El fitoplancton juega un rol fundamental en piscinas camaroneras en mantener la calidad del agua influyendo los niveles de oxígeno disuelto, la concentración de nutrientes, la penetración de luz, los niveles bacterianos y la biomasa del zooplancton (Tucker *et al.*, 1984; Chien *et al.*, 1992; Paerl y Tucker, 1995; Boyd y Tucker, 1998). Durante la fotosíntesis, la energía solar es capturada por el fitoplancton para reducir el carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) a carbono orgánico con liberación de oxígeno. El oxígeno es producido de acuerdo a la densidad del fitoplancton y cantidad de luz solar, considerándose que como mínimo el 1% de la luz incidente es necesario para la realización de la fotosíntesis

(Boyd y Tucker, 1998). La absorción de amonio y nitrato por parte del fitoplancton es la principal vía de remoción del nitrógeno inorgánico en piscinas camaroneras evitando la acumulación de compuestos tóxicos nitrogenados (Tucker *et al.*, 1984; Hargreaves, 1998; Burford y Glibert, 1999; Burford *et al.*, 2003). Adicionalmente, el fitoplancton es una importante fuente de alimento natural para los organismos en cultivo (Burford, 1997; Yusoff y McNabb, 1997; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003). El fitoplancton puede ser utilizado por el camarón de manera directa (Chong y Sasekumar, 1981; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003) ó indirectamente vía la depredación por parte del zooplancton herbívoro que a su vez sirve de alimento para el camarón (Biró, 1995).

Los grupos más representativos de fitoplancton en aguas salobres son las diatomeas, dinoflagelados, cianobacterias y las algas verdes (Boyd y Tucker, 1998). Sin embargo, en piscinas acuícolas y sistemas eutróficos donde la luz es el factor limitante para el crecimiento del fitoplancton, las cianobacterias dominan el fitoplancton (Paerl y Tucker, 1995). Su bajo requerimiento en luz (van Liere y Mur, 1980; Tilzer, 1987) y su capacidad en regular su flotabilidad para moverse en la columna de agua le confiere ventajas competitivas sobre otros grupos de fitoplancton disminuyendo la diversidad fitoplanctónica (Biró, 1995; Paerl y Tucker, 1995; Burford, 1997). Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna (2003) reportaron que la cianobacteria *Synechocystis diplococcus* representó la especie dominante de fitoplancton (>88,9%) en la mayoría de piscinas camaroneras con sistemas intensivos y semi-intensivos en México. Sin embargo, poblaciones fitoplanctónicas dominadas por cianobacterias son propicias a colapsos repentinos asociados con disminución de oxígeno disuelto en la columna de agua y no representan una buena fuente de producción primaria, aportando con poco oxígeno al medio favoreciendo la acumulación de compuestos tóxicos como amonio, nitrito y sulfuro de

hidrógeno en el fondo de las piscinas y teniendo impacto sobre el crecimiento y la salud del camarón (Boyd *et al.*, 1975; Tucker *et al.*, 1984; Biró, 1995; Paerl y Tucker, 1995; Cowan *et al.*, 1999; Yusoff *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2003). Las mayores pérdidas económicas atribuidas a cianobacterias en acuicultura están relacionadas a la producción de compuestos olorosos que dan sabores indeseables al animal en cultivo (Paerl y Tucker, 1995; Hargreaves y Tucker, 2003) o de compuestos tóxicos que disminuyen el crecimiento o causan mortalidad del animal en cultivo (Lightner, 1978; Smith, 1996; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Zimba y Grimm, 2003).

Las bacterias están presentes en la columna de agua como en el sedimento de piscinas camaroneras. En ambientes acuáticos naturales, la concentración de bacterias varía entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/mL (Samuelsson, 2003). Bayot *et al.* (2001) reportaron concentraciones de bacterias totales en la columna de agua de estanques de *L. vannamei* en Ecuador de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  UFC/mL y Sung *et al.* (2001) reportan valores entre  $8 \times 10^4$  y  $3 \times 10^6$  UFC/mL para *P. monodon*. Las concentraciones encontradas en Ecuador para sedimentos oscilan entre  $1 \times 10^3$  y  $3 \times 10^8$  UFC/g (CENAIM, datos no publicados). En estanques camaroneros, las bacterias cumplen un rol importante con el reciclaje de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica, liderando en gran parte la calidad de agua en un sistema (Avnimelech *et al.*, 1995), actuando como un nexo en la transferencia de la energía hacia los niveles tróficos superiores (Samuelsson, 2003), controlando la disponibilidad de nutrientes (Rodrigues y Williams, 2001) y a veces, sirviendo de alimento directo para el camarón (McIntosh *et al.*, 2000). Además, las bacterias controlan el ciclo de nitrógeno en ambientes acuícolas, a través de la nitrificación y desnitrificación.

En piscinas camaroneras, los problemas bacterianos están asociados con enfermedades debidas principalmente a especies de vibrios (Lightner, 1992; Austin, 1995; Saulnier *et al.*, 2000). *Vibrio* spp. son bacterias comunes encontradas en el agua y en los sedimentos marinos y de piscinas acuícolas (Direkbusarakom *et al.*, 1998), pero también forman parte de la microbiota natural de camarones penaeidos. Gómez-Gil *et al.* (1998) aislaron del hepatopáncreas de *L. vannamei* sanos, nueve especies de vibrios destacando entre ellos *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio damsela*. Bacterias luminiscentes aisladas de piscinas camaroneras incluyen *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium leiognathi* y de estos, *V. harveyi* ha sido reconocido por ser el agente causal asociado a mortalidades de camarón (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Pasharawipas *et al.*, 1998; Abraham y Palaniappan, 2003). En Ecuador, brotes de enfermedades en *L. vannamei* fueron atribuidos a *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Lightner, 1992). Brotes de enfermedades han sido asociados con incrementos en la proporción de especies potencialmente patógenas en la población de *Vibrio* spp. en el agua de estanques camaroneros (Sung *et al.*, 1999). La reducción en la diversidad de vibrios no sólo puede indicar un estrés ambiental sino que puede ser usado como un indicador en la ocurrencia de enfermedades de penaeidos (Sung *et al.*, 2001).

## 2.2. RELACIÓN FITOPLANCTON-ZOOPLANCTON:

El zooplancton tiene dos efectos opuestos sobre el fitoplancton: (1) reducción de la biomasa del fitoplancton por pastoreo (efecto “top-down”) o (2), estimulación del crecimiento del fitoplancton a través de la regeneración de nutrientes por parte del zooplancton (efecto “bottom-up”) (Bergquist *et al.*, 1985; Grigorszky *et al.*, 1998). Martínez-Córdova *et al.* (1998b) demostraron que la abundancia de zooplancton en piscinas de cultivo de *Farfantepenaeus californiensis* estuvo relacionada con la

abundancia del fitoplancton. Generalmente, el pastoreo por parte del zooplancton representa la principal pérdida para el crecimiento del fitoplancton. Sin embargo, el rango de partículas ingeridas varía y depende del grupo de zooplancton considerado (Bergquist *et al.*, 1985), de la cantidad, calidad y tamaño de la partícula alimenticia, de la intensidad de luz y del nivel de temperatura (Ravera y Scotto, 1999; Conde-Porcuna *et al.*, 2002). Calbet y Landry (2004) estiman que el 75 y 59% de la productividad primaria es perdido por el pastoreo de microherbívoros en sistemas oceánicos y estuarinos, respectivamente, indicando que la relación fitoplancton-zooplancton se debilita en sistemas eutróficos. Un fuerte efecto de pastoreo sobre el fitoplancton, incluyendo reducciones de varios ordenes de magnitud, ha sido reportado para el zooplancton dominado por copépodos en el mar (Bautista *et al.*, 1992), los cuales son consumidores más efectivos que los cladóceros, particularmente en condiciones eutróficas (Burns y Schallenberg, 2001; Sommer *et al.*, 2001). No obstante, en sistemas eutróficos donde se desarrollan poblaciones de fitoplancton con tamaños mayores a 50  $\mu\text{m}$ , con espinas o formadoras de colonias, el efecto pastoreo del zooplancton se pierde (Haney, 1987; Lampert, 1987; Elser y Goldman, 1990; Biró, 1995).

Los efectos predatorios de copépodos ciclopoideos sobre el zooplancton de menor tamaño, como los protozoarios y flagelados, han sido demostrado en ambientes marinos y sistemas de agua dulce (Caron, 1984), reduciendo la presión sobre el fitoplancton de menor tamaño y causando un incremento en sus concentraciones (Cottingham *et al.*, 1997). A medida que el fitoplancton incrementa a través del gradiente de ultraoligotrófico a mesoeutrófico, la efectividad de copépodos calanoides en la remoción de ciliados incrementa de 2,5 a 9,5 veces respecto a los cladóceros (Burns y Schallenberg, 2001). La naturaleza de la interacción copépodo-ciliado es específica y la presencia de

presas alternativas influencia el impacto de los copépodos sobre los ciliados (Wickham, 1998). Nejtgaard *et al.* (2001) mostraron en mesocosmos experimentales con agua marina que el zooplancton dominado por el ciliado *Strombidium* spp. tienen altas tasas de pastoreo sobre el dinoflagelado *Protoperidium bipes*, removiendo entre 30 y 63% de la clorofila *a* total. Dawidowicz (1990) trabajando con encierros *in situ* en un lago eutrófico encontró que la concentración total de clorofila *a* disminuyó a 2,4 µg/L al término de la primera semana, incrementando a 4 µg/L al término de la tercera semana cuando la concentración de rotíferos y copépodos alcanzó su concentración mínima.

La presencia de zooplancton filtradores (cladóceros y copépodos calanoides) o carnívoros (copépodos ciclopoideos) influencia grandemente la concentración de nutrientes en lagos (Adrian y Schneider-Olt, 1999). Algunos tipos de zooplancton pueden alimentarse directamente de partículas orgánicas, estimulando la producción primaria a través del incremento en las concentraciones de proteínas disueltas o carbohidratos en la columna de agua, desechos metabólicos del zooplancton (Richardot *et al.*, 2001). Las proteínas, los carbohidratos y los lípidos están formados por C, H y O. Además, las proteínas contienen N y los ácidos nucleicos N y P, los cuales son tomados de la columna de agua para formar biomasa, lo que disminuye su disponibilidad para el fitoplancton (Fraga, 2001).

### 2.3. RELACIÓN FITOPLANCTON-BACTERIA:

Varios estudios han mostrado que la abundancia bacteriana y su productividad están consistentemente relacionadas con la abundancia y productividad del fitoplancton (Cole *et al.*, 1988; Sommaruga, 1995; Vörös *et al.*, 2003). Las bacterias requieren de carbono orgánico disuelto producido dentro o fuera del sistema (Samuelsson, 2003). Una porción

del carbono fijado dentro de las bacterias es excretado del fitoplancton como carbono orgánico disuelto (DOC) (Hargreaves y Tucker, 2003) y dependiendo de la fuente, la tasa de descomposición del DOC varía (Strauss y Lamberti, 2002). Un crecimiento balanceado de bacterias requiere de sustratos con ratios atómicos C:N:P de 106:12:1 (Goldman *et al.*, 1987) mientras que el fitoplancton generalmente presenta un ratio C:N:P de 106:16:1 (Cottingham *et al.*, 1997; Pinckney *et al.*, 2001). Las bacterias tienen la capacidad de variar estos requerimientos (Tezuka, 1990), no obstante, la limitación del recurso puede generar relaciones antagónicas o sinérgicas dentro de la trama alimenticia controlando el crecimiento de las bacterias. La coexistencia de bacterias y fitoplancton es posible solamente si las bacterias son limitadas por el carbono y si el ratio carbono:nutrientes de productores primarios y bacterias son suficientemente similares (Hulot *et al.*, 2001).

El DOC puede también ser el resultado de la completa ingestión y digestión por parte del metazooplancton y protozoarios (Nagata, 2000; Richardot *et al.*, 2001; Samuelsson, 2003). A su vez, la parcial o total mineralización de la materia orgánica disuelta (sea el carbono o el nitrógeno) por la trama alimenticia microbiana incrementa la concentración de nutrientes inorgánicos disponible para el fitoplancton (Havskum *et al.*, 2003; Tungaraza *et al.*, 2003). Sin embargo, la persistencia de materia orgánica disuelta en muchos sistemas marinos eutróficos sugiere que su producción y el posterior consumo bacteriano está desacoplado en tiempo y espacio y que algún factor limita su utilización (Cherrier *et al.*, 1999).

La correlación entre el crecimiento del fitoplancton y bacterias puede ser atribuido a la dependencia bacteriana sobre el carbono liberado por el fitoplancton, o a la regulación del

crecimiento de ambos por un mismo factor (Vrede *et al.*, 1999). A la asunción clásica de que las bacterias heterotróficas son limitadas por el carbono en sistemas eutróficos, se ha establecido que el nitrógeno, y en particular el fósforo, pueden limitar el crecimiento de las bacterias heterotróficas en sistemas acuáticos oligotróficos (Arvola y Tulonen, 1998; Havskum *et al.*, 2003; Vadstein *et al.*, 2003). Los requerimientos de N y P por bacterias son grandes debido a sus altos contenidos de proteínas y ácidos nucleicos, que son requeridos para mantener bajos radios N:P intracelulares (Church *et al.*, 2000; Medina-Sánchez *et al.*, 2002). El crecimiento bacteriano es limitado por P cuando su radio N:P es más bajo que el del sustrato disponible, pero es limitado por N cuando su radio N:P es más alto (Tezuka, 1990). No obstante, cuando el crecimiento bacteriano depende del nitrógeno la inmovilización del nitrógeno ocurre (Jana *et al.*, 2001). Por otro lado, la combinación del N y P aumenta el crecimiento del fitoplancton en forma más eficiente que la adición simple de N o P (Yusoff y McNabb, 1997) y estimula la producción bacteriana en sistemas marinos y lagos temperados (Castillo *et al.*, 2003). Comparando las bacterias y el fitoplancton, uno puede esperar que las bacterias con su gran radio área superficial:volumen y su rápido crecimiento son más eficientes en absorber nutrientes inorgánicos disueltos (Currie y Kalff, 1984) y disminuir su disponibilidad para el fitoplancton (Cottingham *et al.*, 1997).

Las bacterias son comúnmente observadas dentro de la zona mucosa y sobre la pared celular de cianobacterias coloniales y filamentosas (Paerl y Tucker, 1995; Salomon *et al.*, 2003). Estas asociaciones pueden ser benéficas ya que los sustratos orgánicos liberados por el fitoplancton hospedador son aprovechados por las bacterias con el posterior retorno de nutrientes inorgánicos y CO<sub>2</sub> que pueden ser utilizados por la microalga (Paerl *et al.*, 1989). Midlen y Redding (1998) argumentan que un incremento en la población de

*Vibrio* spp. podría esperarse como resultado del incremento en la población de cianobacterias. En contraste, Walker y Higginbotham (2000) demostraron que un número de cepas bacterianas aisladas de diferentes cuerpos de agua tienen la capacidad de destruir cianobacterias coloniales y filamentosas.

#### 2.4. RELACIÓN BACTERIA-ZOOPLANCTON:

El impacto del zooplancton sobre la biomasa y producción bacteriana ha sido reportado como negativo (pastoreo directo) o positivo (pastoreo sobre depredadores de bacterias). Los ciliados, flagelados, rotíferos, cladóceros y nauplios de copépodos remueven efectivamente las bacterias, causando una disminución en sus conteos y pudiendo alterar la distribución del tamaño bacteriano a través de la selectividad (Havens, 1998; Vrede *et al.*, 1999; Gasol *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos cladóceros y copépodos adultos se alimentan de flagelados y presas más grandes, lo que indirectamente disminuye su presión de depredación sobre las pequeñas partículas bacterianas (Cottingham *et al.*, 1997; Calbet y Landry, 1999).

El efecto pastoreo del zooplancton sobre partículas orgánicas genera sustrato orgánico, cuyo grado de polimerización tiene una influencia directa sobre la intensidad de hidrólisis enzimática que se piensa es un estado limitante en la asimilación bacteriana y por lo tanto en el crecimiento de estas poblaciones (Chróst, 1991). En experimentos *in situ*, correlaciones positivas han sido encontradas entre cambios en la abundancia y biomasa del metazooplancton y la actividad de enzimas extracelulares de depolimerización ( $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasa y leucina aminopeptidasa) en la fracción de partículas entre 0,2 – 100  $\mu\text{m}$  (Richardot *et al.*, 2001). No obstante, las enzimas liberadas directamente por el

zooplancton son menos significantes que aquellas derivadas de bacterias libres y adheridas a sustrato (Vrba *et al.*, 1992).

El zooplancton lleva bacterias adheridas en la superficie externa y en el tracto digestivo, principalmente del género *Vibrio* si es zooplancton de agua marina, estableciendo una relación de mutualismo entre ambos organismos (Colwell, 1996). Los copépodos pueden servir como un reservorio de *Vibrio* spp. potencialmente patógenos, incluyendo *V. cholerae*, que se adhieren a su superficie y pueden sobrevivir más tiempo que en forma libre, funcionando como una estrategia de supervivencia en ambientes limitados por nutrientes (Tamplin *et al.*, 1990). Copépodos calanoides (*Centropages* spp.) aislados del mar Liguriano en Italia son colonizados por *V. alginolyticus* en estado cultivable alcanzando concentraciones máximas de  $1,9 \times 10^4$  UFC/mL, mientras que *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* fueron aislados de rotíferos con concentraciones máximas de  $0,65 \times 10^7$  y  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente, en el mar Adriático (Montanari *et al.*, 1999).

#### 2.5. SEDIMENTO Y EL RECICLAJE DE LA MATERIA ORGÁNICA:

La composición del sedimento en piscinas camaroneras está sujeta a cambios temporales como consecuencia de la adición de alimento, el uso de fertilizantes y la acumulación de sales derivadas del agua marina y salobre, viéndose reflejado en la producción final de camarón (Boyd, 1995; Funge-Smith y Briggs, 1998). El sedimento juega un rol importante sobre la calidad de agua, como fuente de varias sustancias disueltas y como sumidero de nutrientes y partículas orgánicas (Masuda y Boyd, 1994; Bratvold y Browdy, 2001; Bhakta y Jana, 2002), siendo la dinámica del fósforo y la neutralización de la acidez del suelo ejemplos clásicos (Boyd, 1995; 2001). La cal es aplicada a estanques para neutralizar acidez del suelo y mejorar la alcalinidad y dureza total al suministrar

iones  $\text{HCO}_3^-$ , los cuales neutralizan  $\text{H}^+$  en el suelo, y el  $\text{Ca}^{2+}$  puede desplazar  $\text{Al}^{3+}$  adheridos a las partículas del suelo y precipitarlo como hidróxido de aluminio (Boyd, 1995). La acumulación de materia orgánica en los sedimentos causa la disminución del oxígeno disuelto en la interfase agua-suelo (Boyd, 1990; Wellsbury *et al.*, 1996), y la consecuente aparición de sustancias reducidas que pueden ser tóxicas para el camarón en cultivo como el amonio, sulfuro de hidrógeno y metano (Kassila, 2003). Por otro lado, una porción principal del nitrógeno (entre 14 y 38%) y la mayoría del fósforo (entre 31 y 84%) suministrados a estanques camaroneros son retenidos en los sedimentos (Briggs y Funge-Smith, 1994; Funge-Smith y Briggs, 1998; Martín *et al.*, 1998; Teichert-Coddington *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2003), enfatizando el rol positivo de los fondos de piscinas camaroneras en mantener concentraciones adecuadas de nutrientes inorgánicos en la columna de agua.

En sistemas eutróficos, el sedimento actúa como un sumidero de fósforo, mientras que en sistemas oligotróficos actúa como una fuente (Boyd, 1995). La capacidad de adsorción y precipitación del fósforo en sedimentos es influenciada por un número de factores tales como contenido inicial de fósforo en el sedimento, pH, potencial de óxido-reducción, tensión de oxígeno y concentraciones relativas de hierro (Shrestha y Lin, 1996a; Bhakta y Jana, 2002; Hargreaves y Tucker, 2003). La tasa de pérdida de fósforo hacia los sedimentos disminuye al incrementar la saturación de fósforo en el sedimento a través del aporte regular de fósforo, sea por fertilización o suministro de alimento balanceado (Boyd y Musig, 1981). Recientes investigaciones han mostrado que midiendo la capacidad de adsorción del sedimento y su contenido en arcilla puede indicar hasta que grado el fósforo soluble será removido por el sedimento (Boyd y Munsiri, 1996; Hargreaves y Tucker, 2003). Sin embargo, el fósforo puede ser liberado de los sedimentos,

principalmente en condiciones anaeróbicas donde el fosfato de hierro es ligeramente más soluble que en condiciones aeróbicas (Boyd, 1995; Ritvo *et al.*, 1998; Bhakta y Jana, 2002). Adicionalmente, el equilibrio del fósforo entre el agua y el sedimento es regulado por la toma del fitoplancton y macrófitas acuáticas. Si el equilibrio es interrumpido por la toma biológica, más fósforo puede ser liberado del sedimento cuando el fosfato de hierro y de aluminio son reducidos bajo condiciones anaeróbicas a la forma soluble (Boyd, 1995; Santacruz *et al.*, 2003).

La nitrificación u oxidación del amonio a nitrato por parte de bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, ocurre tanto en la columna de agua como en el sedimento de piscinas acuícolas, siendo mayor en la interfase agua-suelo (Hargreaves, 1998). La densidad de bacterias nitrificantes en la superficie del sedimento es de  $10^6$  a  $10^9$  células/cm<sup>3</sup>, representando de tres a cinco ordenes de magnitud superior que en la columna de agua ( $10^3$  a  $10^4$  células/mL) en estanques de cultivo intensivo de peces (Hargreaves, 1998). El nitrato, producto final de la nitrificación, puede funcionar a su vez como aceptor final de electrones durante la oxidación de la materia orgánica y por lo tanto suministrar energía para el crecimiento microbiano cuando la concentración de oxígeno cae por debajo de 0,2 mg/L, en un proceso denominado desnitrificación. Funge-Smith y Briggs (1998) estimaron que alrededor del 30% de nitrógeno que entra en piscinas camaroneras se pierde a la atmósfera por desnitrificación o volatilización de amonio, siendo comparable con resultados obtenidos por Gross *et al.* (2000) en piscinas de bagre de canal (17,4% y 12,5% para desnitrificación y volatilización, respectivamente). Estos resultados enfatizan la importancia de la conversión bacteriana de los compuestos nitrogenados a nitrógeno molecular en piscinas acuícolas. Aunque la desnitrificación es tradicionalmente considerada una vía importante para la pérdida de

nitrógeno, Burford y Longmore (2001) encontraron que menos del 2% de la entrada total de nitrógeno en piscinas intensivas de cultivo de camarón en Australia fue perdido vía desnitrificación y argumentan que podría ser el resultado de una limitación por el sustrato. Hargreaves y Tucker (2003), trabajando con bagre de canal, encontraron que el factor más probable influenciando la tasa de desnitrificación es la disponibilidad de nitrato.

La acumulación de residuos orgánicos en sedimentos de piscinas acuícolas, resultado de la sedimentación del fitoplancton, alimento no consumido, fertilizantes y heces de los animales en cultivo (Boyd, 1995; Martin *et al.*, 1998), suministra una fuente esencial de carbono para la actividad bacteriana (Baldwin *et al.*, 1997). Jana y Roy (1985) reportan para sedimentos de piscinas de cultivo de carpa concentración para bacterias mineralizadoras de entre  $10^4$  y  $10^6$  células/g. La tasa de degradación del material orgánico es afectada por la eficiencia de la conversión bacteriana y el radio C:N del sustrato (Tezuka, 1990; Avnimelech *et al.*, 1995). Las bacterias generalmente contienen 10% de nitrógeno y 50% de carbono en base a materia seca, con una eficiencia de asimilación de carbono del 5% (Boyd, 1995), por lo que una relación de 5C:1N en la materia orgánica asegura su total descomposición (Boyd y Tucker, 1998). Un sustrato con un bajo radio C:N se descompondrá más rápidamente (lábil) con mineralización de nitrógeno orgánico, mientras que un residuo con un alto radio C:N se descompondrá lenta e incompletamente (refractario) con inmovilización de nitrógeno inorgánico soluble (Powlson, 1993; Boyd, 1995; Golterman, 1995). Sustratos conteniendo quitina son fuertemente colonizados por representantes de *Vibrio* spp. que mineralizan este polisacárido insoluble (Montanari *et al.*, 1999).

La descomposición de la materia orgánica acumulada en el sedimento favorece la formación de condiciones anaeróbicas y la liberación en la columna de agua de componentes tóxicos para el camarón tales como amonio, iones ferrosos, sulfuro de hidrógeno y metano (Boyd, 1990; Hopkins *et al.*, 1994; Hargreaves, 1998; Alongi *et al.*, 1999; Bhakta y Jana, 2002; Kassila, 2003). Aunque la oxidación de la materia orgánica procede más eficientemente utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, también puede ocurrir bajo condiciones anaeróbicas utilizando aceptores de electrones alternativos (Hargreaves y Tucker, 2003). Varios autores afirman que la mayor descomposición en sedimentos toma lugar en la capa anaeróbica donde la calidad de la materia orgánica acumulada es baja y relativamente refractaria a la descomposición (Kristensen *et al.*, 1995; Hargreaves, 1998; Hargreaves y Tucker, 2003).

Camarones penaeidos se alimentan selectivamente de tejidos vegetales, alimento balanceado y partes de crustáceos (Focken *et al.*, 1998). La dieta de camarones en estanques extensivos y semi-intensivos está compuesta principalmente de alimento natural debido a que el fondo de los estanques son ricos orgánicamente y ofrecen una variedad de fuentes de alimento (Nunes *et al.*, 1997). El bentos, principalmente el grupo de los nemátodos, representa un alimento rico para el camarón y su biomasa depende de la productividad fitoplanctónica (Martínez-Córdova *et al.*, 2002), sin embargo, no se mantiene una alta biomasa durante todo el ciclo de cultivo (White, 1986). Estanques intensivos de camarón con cero recambio de agua contienen una alta densidad de flóculos bacterianos ricos en bacterias y fitoplancton, suministrando una fuente potencial de alimento para el camarón (McIntosh *et al.*, 2000; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2003). Conteos bacterianos totales en la columna de agua de estanques camaroneros intensivos variaron entre  $3,64$  y  $5,06 \times 10^7$  UFC/mL, donde del 27 al 51% de las bacterias

fueron asociadas con partículas floculadas y se demostró que entre el 1 y 3% del nitrógeno particulado retenido en el camarón derivó principalmente de los flóculos particulados (Burford *et al.*, 2003). El alimento balanceado nunca excede el 50% del contenido estomacal (Focken *et al.*, 1998). Gamboa-Delgado *et al.* (2003) analizando el contenido estomacal de *L. vannamei* encontraron que el material vegetal representó el 30% para camarones de 6 a 10 g, detritus entre el 58 y 62% para camarones entre 2 y 4 g y el alimento balanceado contribuyó con un máximo de 20% para camarones de 6 g. Nunes *et al.* (1997) demostraron que la biota natural en estanques semi-intensivos fue la principal fuente de alimento para *Litopenaeus subtilis*, mientras que el alimento balanceado constituyó el 16% del contenido estomacal. Por tanto, una vez que el valor nutricional del alimento natural ha sido considerado, fórmulas de alimento y esquemas de alimentación deben ser optimizados (Focken *et al.*, 1998).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Los experimentos se realizaron en 24 tanques rectangulares de fibra de vidrio con capacidad de una tonelada cada uno, en el set experimental exterior #20 de la Fundación CENAIME-ESPOL, ubicado en San Pedro de Manglaralto (provincia del Guayas, Ecuador) a  $02^{\circ} 00'$  de latitud sur y  $80^{\circ} 45'$  longitud oeste (Fig. 1). Cada tanque fue llenado con agua del canal reservorio de la estación experimental de la Fundación CENAIME-ESPOL (Palmar, Provincia del Guayas, Ecuador), ubicada a 10 km al sur de las instalaciones principales. Para homogeneizar la columna de agua, se instaló un sistema de aireación con piedra difusora en cada tanque suministrando aire desde las 1900 hasta la 0700 cada noche. El trabajo de investigación consistió en dos experimentos con duración de 30 días cada uno. El primer experimento abarcó desde el 30 de marzo hasta el 27 de abril del 2004, mientras el segundo experimento comprendió desde el 11 de mayo hasta el 8 de junio del 2004.

En el primer experimento se aplicó fertilizantes inorgánicos empleando urea (45% de N) y fosfato diamónico (18% de N y 48% de  $P_2O_5$ ), con un diseño factorial 2x2 completamente aleatorizado. El primer factor correspondió al efecto de la fertilización con dos niveles: (1) una tasa de fertilización 10N:1P para lo cual se hicieron dos aplicaciones semanales de 1,0 mg N/L y 0,1 mg P/L y (2) un control sin adición de nutrientes. El segundo factor correspondió a la presencia o ausencia de una capa de sedimento (5 a 8 cm) recogido de la estación experimental de la Fundación CENAIME-ESPOL, en el fondo de los estanques.

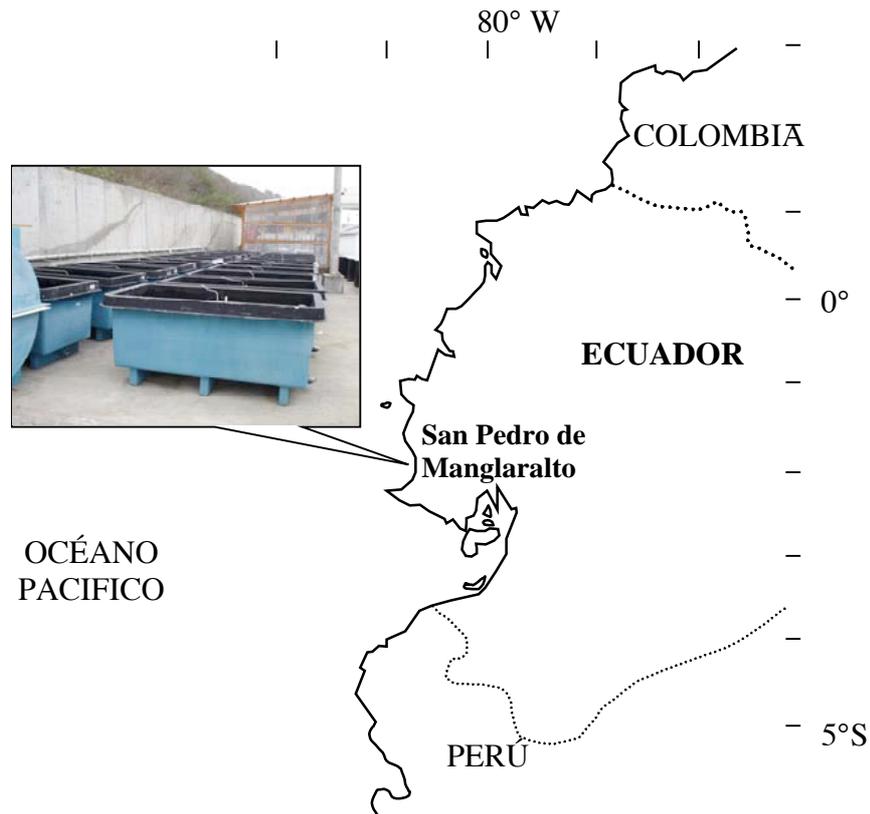


Figura 1: Localización geográfica del lugar de estudio.

En el segundo experimento se aplicó como fertilizante orgánico un alimento balanceado comercial (35% de proteína y enriquecido con vitamina C), empleando un diseño factorial 2x2 completamente aleatorizado. El primer factor correspondió al efecto de la fertilización con dos niveles: (1) adición de alimento a través de aplicaciones diarias de 1,0 g alimento por tanque (correspondiente a una relación 7N:1P) lo que representa el 40% de una dosis equivalente a 25 kg/ha/día y simula el aporte a través de alimento no consumido y heces en un sistema tradicional de cultivo semi-intensivo de *L. vannamei* y (2) un control sin adición de alimento. El segundo factor correspondió a la presencia o ausencia de una capa de sedimento (5 a 8 cm) como en el primer experimento. Ambos experimentos consistieron de cuatro combinaciones de los factores (2x2) con seis réplicas (Tabla 1).

Tabla 1: Diseño experimental y descripción de las combinaciones de los factores para los dos experimentos.

Régimen de fertilización	Con sedimento	Sin sedimento
<b>Experimento 1 – Fertilización Inorgánica</b>		
Sin adición de nutrientes	Control con sedimento	Control sin sedimento
10 mg N/L + 0,1 mg P/L	10N:1P con sedimento	10N:1P sin sedimento
<b>Experimento 2 – Fertilización Orgánica</b>		
Sin adición de alimento	Control con sedimento	Control sin sedimento
Alimento balanceado	Alimento con sedimento	Alimento sin sedimento

El promedio de la temperatura y la salinidad registradas a las 0700 fueron 27,3 °C y 44,6 g/L, respectivamente, para el primer experimento. Para el segundo experimento los valores de temperatura y salinidad cayeron a 25,1°C y 40,9 g/L, respectivamente. Para ambos experimentos, se recolectaron muestras de agua al inicio del ensayo y luego semanalmente para evaluar la composición del fitoplancton y zooplancton, cuantificar los niveles bacterianos y evaluar las concentraciones de fosfato soluble reactivo, nitrógeno amoniacal total y nitrógeno disuelto y de los sólidos. Asimismo, muestras de suelo al inicio y final de cada experimento fueron recolectadas para determinar el pH, porcentaje de materia orgánica y concentración de fósforo.

### 3.2. DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PLANCTON:

Se estimó la biomasa de fitoplancton a través de la clorofila *a*, por lo cual se tomó 1 L de agua en la parte central de cada tanque y se filtró entre 100 y 500 mL a través de un filtro Whatman GF/F (poro de 0,7 µm). Luego la concentración de clorofila *a* fue medida por colorimetría después de una extracción con una solución de acetona:metanol (5:1) a temperatura de 65°C y corrección por feofitina con adición de HCl (Pechar, 1987). A su vez, 50 mL de agua no filtrada se preservó con 600 µL de Lugol para determinación y conteo de fitoplancton con la cámara de Sedgwick-Rafter y un microscopio de luz a una magnificación de 200X (APHA *et al.*, 1998). El fitoplancton fue clasificado hasta el

nivel de género para cianobacterias y flagelados, mientras las diatomeas fueron agrupadas en Pennales o Centrales. *Nitzchia* spp. fue evaluada como un grupo adicional dada la importancia que mostró dentro de las diatomeas. Se utilizó las claves presentadas por Cocks (1967), Jiménez (1983) y Tomas (1997). Las cuantificaciones fueron expresadas en número de organismos por mililitro (org/mL).

De cada tanque se filtró 8 L de agua a través de una malla de 30  $\mu\text{m}$  y se concentró en un volumen de 25 mL preservándose con 25 mL de una solución sucrosa-formalina al 10% para determinación y conteo de zooplancton con la cámara de Sedgwick-Rafter y un microscopio de luz a una magnificación de 100X (APHA *et al.*, 1998). El zooplancton se clasificó hasta el nivel de género para los rotíferos y tintínidos, mientras los copépodos fueron agrupados en nauplios o adultos. Se utilizaron las claves presentadas por Yamaji (1973) y Jiménez (1983). Las densidades fueron expresadas como número de organismos por litro (org/L) después de una corrección por el factor de concentración (160x) en la preservación de la muestra inicial.

### 3.3. DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS:

Entre 150 y 200 mL de agua fueron colectados en frascos estériles para cuantificación de bacterias totales (epifluorescencia) y *Vibrio* spp. (agar TCBS). Para las bacterias totales, 9 mL de agua fue fijada con 1 mL de glutaraldehído al 5%, luego teñida con naranja de acridina al 0,01% en proporción 1:1 (v:v) y finalmente filtrada al vacío (filtro de policarbonato con poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ). La cuantificación de las bacterias sobre el filtro se realizó con la ayuda del micrómetro de Whipple y un microscopio de epifluorescencia a una magnificación de 400X (APHA *et al.*, 1998). Para la cuantificación de *Vibrio* spp. se sembró la muestra directamente (sin dilución) en placas petri por duplicado y se incubó

entre 28 y 30°C durante 24 horas (Colwell, 1984). Las cuantificaciones bacterianas se expresaron en células y Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro de agua muestreada para bacterias totales y *Vibrio* spp., respectivamente.

#### 3.4. ANÁLISIS DE LOS NUTRIENTES Y SÓLIDOS:

Se filtró 100 mL de agua a través de un filtro Whatman GF/F (poro de 0,7 µm) para remover la materia particulada y determinar las concentraciones de fosfato soluble reactivo (SRP), nitrógeno amoniacal total (TAN) y nitrógeno disuelto (DN). Las concentraciones de SRP fueron determinadas a través del método del ácido ascórbico (APHA *et al.*, 1998), mientras las concentraciones de TAN fueron determinadas a través del método del fenolhipoclorito (Solórzano, 1969). La digestión para DN se hizo con el método del persulfato de potasio en condiciones básicas y la detección por reducción de los nitratos en una columna de cadmio y detección por colorimetría (APHA *et al.*, 1995).

De la parte central de cada tanque, se tomó 400 mL de agua para el análisis gravimétrico de los diferentes componentes de la materia orgánica e inorgánica (APHA *et al.*, 1998). Los sólidos totales (TS) fueron medidos después de 24 horas de secado de una muestra original de 40 mL a 104°C. Posteriormente, la muestra fue llevada a 550°C por 30 minutos para estimar la materia inorgánica total (TIM). La materia orgánica total (TOM) fue estimada por diferencia entre las dos variables anteriores. De la misma manera, los sólidos suspendidos totales (TSS) fueron medidos en base a una muestra de 100 mL de agua recogida sobre filtros Whatman GF/F secados durante 24 horas a 104°C. Después de 30 minutos a 550°C, el filtro fue pesado para determinar la materia inorgánica particulada (PIM). La concentración de la materia orgánica particulada (POM) fue estimada por diferencia entre las dos variables anteriores. Los componentes de la

fracción disuelta (TDS, DIM y DOM) fueron estimados por diferencia entre las medidas totales y las medidas de la materia particulada.

### 3.5. VARIABLES DE LA CALIDAD DEL SUELO:

Para determinar la condición del suelo, se recolectaron muestras (5 cm de profundidad en seis puntos en cada tanque) al inicio y final de cada experimento para determinar el porcentaje de materia orgánica por ignición (APHA *et al.*, 1998) y los valores del pH en una solución 1:1 (p:v) suelo seco:agua destilada (Boyd, 1995). Se evaluó la concentración total de P por ignición de la muestra durante una hora a 550°C seguida por una extracción con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y detección por el método del ácido ascórbico (Shrestha y Lin, 1996b). Además se realizaron las estimaciones de las concentraciones de la fracción del P asociada con los iones de aluminio y hierro y la fracción del P asociada con los iones calcio (Olsen y Sommers, 1982).

### 3.6. ANÁLISIS DE DATOS:

El análisis de varianza (ANOVA, medidas repetidas) fue utilizado para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, para cumplir con las asunciones de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), algunas variables fueron transformadas (ver Anexo 1). Cuando se declaró significancia, la prueba de Scheffé fue utilizada para la comparación múltiple de medias. Para clorofila *a*, SRP y TAN una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con rangos múltiples fue utilizada, mientras que una prueba no paramétrica de Mann-Whitney fue utilizada para determinar diferencias significativas por efecto de adición de nutrientes y presencia de sedimento. Se utilizó ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre las

variables de calidad del suelo. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 5%.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) en cada experimento para disminuir el número de variables y facilitar la interpretación de los patrones encontrados. Para cumplir con los requisitos de la prueba de ACP (Pla, 1986), los datos fueron previamente estandarizados (variable con media cero y varianza unitaria). La selección de los componentes que expresaron el mayor porcentaje de variabilidad de los datos siguió el criterio de Kaiser ( $\text{eigenvalue} > 1$ ). Los coeficientes de correlación entre las variables originales y cada componente  $\geq 0,5$  en valor absoluto fueron significativos (Subas, 1994). El factor fertilización fue transformado en variables continuas en base a las cantidades de N y P aplicadas en cada experimento. En el caso de los fertilizantes inorgánicos, estas cantidades fueron calculadas en base a su composición y las dosis utilizadas. Para el alimento balanceado, la cantidad de N aplicada fue estimada en base al porcentaje de proteínas (35%) y la proporción de N en proteínas (16%). Se tomó el valor reportado por Teichert-Coddington *et al.* (2000) de 0,84% como cantidad promedio de P para el alimento comercial.

Finalmente, se realizó un análisis de regresión múltiple del tipo “Forward Stepwise” con un nivel de significancia del 5%, utilizando las variables que presentaron una alta correlación con los componentes principales y previamente normalizadas, para poder predecir el comportamiento del fitoplancton, de las bacterias totales y de *Vibrio* spp. El tipo “Forward Stepwise” considera una variable significativa dentro del modelo de regresión siguiendo el criterio del estadístico F ( $F > 1$ ). Algunas variables fueron transformadas para cumplir con la asunción de normalidad (prueba de Kolmogorov-

Smirnov), sin embargo, para facilidad de interpretación, las ecuaciones de regresión lineal múltiple se muestran sin variables transformadas (ver Anexo 2 para ecuaciones con transformación). En todos los análisis, se utilizó el programa estadístico STATISTICA<sup>®</sup> 4.1 (1994-2000, StatSoft, Oklahoma, EE.UU.). Para facilidades de interpretación, los datos son presentados sin transformación como media  $\pm$  desviación estándar.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN INORGÁNICA:

#### 4.1.1. Variables de calidad de agua :

Las concentraciones promedio de clorofila *a* incrementaron con la fertilización inorgánica ( $p < 0,01$ ; Tablas 2 y 3). No obstante, dentro del mismo grupo no se presentaron diferencias entre presencia o ausencia de sedimento ( $p = 0,06$ ). Hubo un efecto del tiempo sobre las concentraciones de clorofila *a* ( $p < 0,01$ ) que alcanzaron mayores valores en la segunda y cuarta semana (Fig. 2a). En los conteos de fitoplancton, los efectos principales debido a la fertilización y el tiempo indicaron conteos promedio más altos para el grupo “10N:1P” ( $p < 0,01$ ; Tabla 2) y las mayores abundancias de fitoplancton ( $2.170 \times 10^3$  org/mL) fueron alcanzadas a la tercera semana del muestreo ( $p < 0,01$ ).

La población del fitoplancton estuvo conformada por tres grupos: cianobacterias, diatomeas y flagelados. Las cianobacterias fueron el grupo dominante representando entre 35 y 100% de la población (Tabla 3) y mostraron valores mayores en la segunda y tercera semana (Fig. 2b). Además, los conteos mayores ( $2.123 \times 10^3$  y  $1.626 \times 10^3$  org/mL) estuvieron asociados al grupo “10N:1P”, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas para el efecto interacción “fertilizante x sedimento” ( $p = 0,38$ ; Tabla 3). Los géneros encontrados fueron *Aphanotece*, *Chroococcus* y *Synechococcus* para las cianobacterias Chroococcales, mientras que en las Hormogonales destacaron *Oscillatoria* y *Spirulina*. Las Chroococcales fueron dominadas por *Synechococcus* spp. que representó entre el 18 y 99% de la población total, mientras *Oscillatoria* spp. dominó las Hormogonales representando entre 1 y 79% de los conteos totales.

Tabla 2: Valores p obtenidos de ANOVA medidas repetidas y Kruskal Wallis (\*) para los efectos principales fertilización (F), sedimento (S), tiempo (T) y sus interacciones para las variables de calidad de agua evaluadas durante el experimento de fertilización inorgánica.

Variable	F	S	T	F x S	F x T	S x T	F x S x T
Clorofila <i>a</i> (µg/L)*	<b>&lt;0,01</b>	0,06	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	----	----	----
Fitoplancton (org/mL)	<b>&lt;0,01</b>	0,21	<b>&lt;0,01</b>	0,49	<b>0,02</b>	0,72	0,52
Cianobacterias	<b>&lt;0,01</b>	0,31	<b>&lt;0,01</b>	0,38	<b>0,02</b>	0,81	0,60
<i>Aphanotece</i>	0,66	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,09	0,20	0,51	0,60
<i>Synechococcus</i>	<b>&lt;0,01</b>	0,51	<b>&lt;0,01</b>	0,17	<b>&lt;0,01</b>	0,69	0,52
<i>Oscillatoria</i>	<b>0,04</b>	0,27	<b>&lt;0,01</b>	0,18	0,78	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>
<i>Spirulina</i>	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,79	0,45	<b>0,05</b>	0,91
Diatomeas	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,05</b>	0,17	0,11	<b>&lt;0,01</b>	0,24	0,12
Pennales	0,84	0,39	<b>0,05</b>	0,97	0,96	<b>0,01</b>	0,56
Centrales	0,13	0,61	<b>&lt;0,01</b>	0,60	0,07	0,55	0,36
<i>Nitzschia</i>	<b>&lt;0,01</b>	0,26	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,92	0,56
Flagelados	<b>0,03</b>	0,17	0,08	0,16	0,09	0,62	0,60
Zooplankton (org/L)	<b>&lt;0,01</b>	0,11	<b>&lt;0,01</b>	0,23	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,04</b>	0,11
Rotíferos	<b>0,01</b>	0,08	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,02</b>	0,30	0,28	<b>0,04</b>
<i>Brachionus</i>	<b>0,02</b>	0,57	<b>&lt;0,01</b>	0,19	0,34	0,51	<b>0,04</b>
<i>Colurella</i> *	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	0,30	<b>&lt;0,01</b>	----	----	----
<i>Proales</i>	0,23	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	0,21	0,21	<b>&lt;0,01</b>
Nauplios de copépodos	0,65	0,70	<b>&lt;0,01</b>	0,90	0,95	0,15	0,33
Copépodos adultos	0,99	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,13	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	0,41
Tintfnidos	0,17	0,94	<b>&lt;0,01</b>	0,65	0,78	0,43	<b>0,03</b>
Bacteria total(células/mL)	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,63	<b>&lt;0,01</b>	0,03	<b>&lt;0,01</b>
<i>Vibrio</i> spp (UFC/mL)	<b>0,01</b>	0,07	0,19	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,31	0,46
SRP (mg/L)*	0,16	0,27	<b>&lt;0,01</b>	0,06	----	----	----
TAN (mg/L)*	<b>&lt;0,01</b>	0,74	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	----	----	----
DN (mg/L)	<b>&lt;0,01</b>	0,15	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,26	0,94	0,81
TS (mg/L)	0,27	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,38	0,76	<b>&lt;0,01</b>	0,73
TIM	0,26	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,44	0,68	<b>0,05</b>	0,74
TOM	0,47	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,20	0,07	<b>&lt;0,01</b>	0,50
TDS (mg/L)	0,25	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,38	0,70	<b>&lt;0,01</b>	0,71
DIM	0,24	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,45	0,66	<b>0,05</b>	0,72
DOM	0,41	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,19	0,06	<b>&lt;0,01</b>	0,52
TSS (mg/L)	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,93	<b>&lt;0,01</b>	0,20	0,11
PIM	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,46	<b>&lt;0,01</b>	0,26	0,10
POM	<b>&lt;0,01</b>	0,64	<b>&lt;0,01</b>	0,09	<b>&lt;0,01</b>	0,23	0,56

Tabla 3: Promedio por tratamiento de las variables de calidad de agua ( $\pm$  desviación estándar) evaluadas durante el experimento de fertilización inorgánica.

Variable	Control sin sedimento	Control con sedimento	10N:1P sin sedimento	10N:1P con sedimento
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	21 $\pm$ 10	18 $\pm$ 12	148 $\pm$ 99	106 $\pm$ 98
Fitoplancton ( $10^3$ org/mL)	592 $\pm$ 470	386 $\pm$ 349	1.710 $\pm$ 1.422	2.128 $\pm$ 2.712
Cianobacterias ( $10^3$ org/mL)	591 $\pm$ 470	385 $\pm$ 349	1.626 $\pm$ 1.409	2.123 $\pm$ 1.713
<i>Aphanotece</i>	4 $\pm$ 5	27 $\pm$ 29	5 $\pm$ 7	17 $\pm$ 26
<i>Synechococcus</i>	569 $\pm$ 450	347 $\pm$ 332	1.301 $\pm$ 1.198	1.984 $\pm$ 2.587
<i>Oscillatoria</i>	12 $\pm$ 14	9 $\pm$ 11	141 $\pm$ 158	70 $\pm$ 112
<i>Spirulina</i>	6 $\pm$ 10	2 $\pm$ 5	179 $\pm$ 255	53 $\pm$ 78
Diatomeas ( $10^2$ org/mL)	11 $\pm$ 19	7 $\pm$ 12	810 $\pm$ 1.222	37 $\pm$ 76
Pennales	3 $\pm$ 11	2 $\pm$ 5	3 $\pm$ 10	1 $\pm$ 5
Centrales	6 $\pm$ 15	2 $\pm$ 5	4 $\pm$ 19	2 $\pm$ 7
<i>Nitzschia</i>	2 $\pm$ 5	3 $\pm$ 8	745 $\pm$ 1.208	33 $\pm$ 76
Flagelados (org/mL)	39 $\pm$ 132	57 $\pm$ 227	3.278 $\pm$ 8.504	845 $\pm$ 4.629
Zooplancton (org/L)	919 $\pm$ 273	1.170 $\pm$ 510	1.304 $\pm$ 446	1.342 $\pm$ 442
Rotíferos	414 $\pm$ 282	452 $\pm$ 334	710 $\pm$ 339	477 $\pm$ 236
<i>Brachionus</i>	349 $\pm$ 261	385 $\pm$ 288	530 $\pm$ 253	442 $\pm$ 208
<i>Colurella*</i>	5 $\pm$ 26	10 $\pm$ 54	46 $\pm$ 87	13 $\pm$ 49
<i>Proales</i>	60 $\pm$ 105	57 $\pm$ 136	125 $\pm$ 115	38 $\pm$ 78
Nauplios de copépodos	115 $\pm$ 124	123 $\pm$ 154	125 $\pm$ 173	141 $\pm$ 197
Copépodos adultos	303 $\pm$ 206	485 $\pm$ 367	325 $\pm$ 439	593 $\pm$ 376
Tintínidos	101 $\pm$ 161	110 $\pm$ 134	144 $\pm$ 135	132 $\pm$ 115
Bacteria total ( $10^3$ células/mL)	21 $\pm$ 7	17 $\pm$ 6	38 $\pm$ 18	29 $\pm$ 11
<i>Vibrio</i> spp (UFC/mL)	133 $\pm$ 174	36 $\pm$ 44	32 $\pm$ 64	40 $\pm$ 83
SRP (mg/L)*	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01
TAN (mg/L)*	0,02 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,40	0,30 $\pm$ 0,74
DN (mg/L)	0,68 $\pm$ 0,24	0,84 $\pm$ 0,29	1,62 $\pm$ 0,90	1,50 $\pm$ 0,96
TS (mg/L)	48.687 $\pm$ 5.807	56.188 $\pm$ 6.139	46.110 $\pm$ 5.850	55.902 $\pm$ 6.712
TIM	42.545 $\pm$ 5.385	48.614 $\pm$ 5.278	40.430 $\pm$ 5.108	48.196 $\pm$ 5.551
TOM	6.142 $\pm$ 708	7.574 $\pm$ 996	5.680 $\pm$ 842	7.706 $\pm$ 1.517
TDS (mg/L)	48.319 $\pm$ 5.762	55.774 $\pm$ 6.075	45.679 $\pm$ 5.779	55.425 $\pm$ 6.643
DIM	42.255 $\pm$ 5.348	48.285 $\pm$ 5.220	40.112 $\pm$ 5.060	47.822 $\pm$ 5.491
DOM	6.064 $\pm$ 702	7.489 $\pm$ 991	5.567 $\pm$ 821	7.603 $\pm$ 1.510
TSS (mg/L)	368 $\pm$ 76	414 $\pm$ 76	428 $\pm$ 122	477 $\pm$ 120
PIM	290 $\pm$ 64	329 $\pm$ 66	318 $\pm$ 97	374 $\pm$ 96
POM	78 $\pm$ 17	85 $\pm$ 16	113 $\pm$ 38	103 $\pm$ 31

El segundo grupo en importancia fueron las diatomeas que representaron entre 1 y 64% de la población fitoplanctónica (Tabla 3). Sus conteos fueron más altos en los tanques sin presencia de sedimento ( $p=0,05$ ; Tabla 2) y recibiendo fertilizantes ( $p<0,01$ ; Tabla 2). No obstante, los conteos se mantuvieron a través del tiempo ( $p=0,17$ ; Fig. 2c). Las diatomeas centrales presentaron conteos mayores en la tercera semana ( $p<0,01$ ), mientras que para

las diatomeas pennales se registraron en la primera semana ( $p=0,05$ ). Tanto para las diatomeas centrales como para las pennales, los efectos principales debido a la fertilización y el sedimento no fueron significativos (Tabla 2).

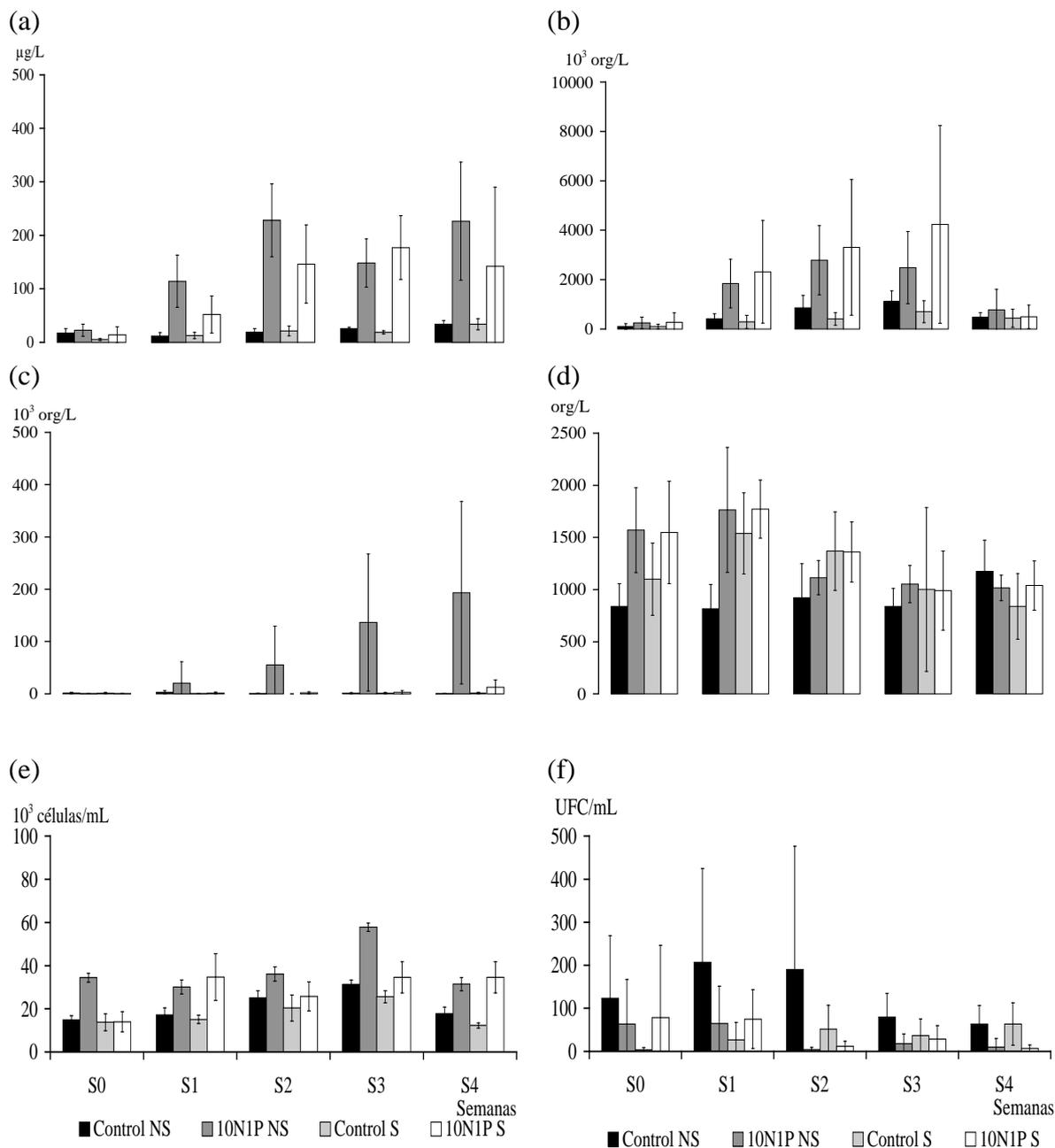


Figura 2: Evolución en el tiempo para variables de calidad de agua del régimen de fertilización inorgánica: (a) clorofila *a*, (b) conteos de cianobacterias, (c) conteos de diatomeas, (d) densidades de zooplancton, (e) conteos de bacterias totales y (f) conteos de *Vibrio* spp.

Los conteos más altos para *Nitzschia* spp. fueron asociados con los tanques que recibieron fertilizantes ( $p < 0,01$ ), sin encontrar diferencia entre los tanques con y sin sedimento ( $p = 0,26$ ). Además, se registraron los conteos más altos al final del experimento ( $p = 0,01$ ). Finalmente, los flagelados fueron representados por el género *Cryptomonas* y presentaron conteos más altos para el grupo “10N:1P” ( $p = 0,03$ ; Tabla 2).

Los conteos promedio para zooplancton oscilaron entre 919 y 1.342 org/L (Tabla 3), donde los efectos principales debido a la fertilización y el tiempo tuvieron un efecto significativo ( $p < 0,01$ ; Tabla 2). Se registraron conteos más altos en los tanques que recibieron fertilizantes y se observaron las mayores densidades en la primera semana (1.473 org/L) para después disminuir en la segunda y tercera semana (Fig. 2d). Se clasificó el zooplancton en cuatro grupos: nauplios de copépodos, copépodos adultos, rotíferos y tintínidos. Los rotíferos fueron en promedio el grupo más abundante, constituyendo entre el 6 y 99% del zooplancton total (Tabla 3). La mayor densidad (710 org/L) estuvo asociada a la combinación de los factores “10N:1P sin sedimento” (efecto interacción con  $p = 0,02$ ). Además, los conteos de rotíferos fueron más altos en promedio en la primera semana del experimento ( $p < 0,01$ ). Tres géneros fueron identificados: *Brachionus*, *Proales* y *Colurella*. El género *Brachionus* fue el más representativo constituyendo entre el 1 y 99% del total de rotíferos. La adición de nutrientes incrementó sus conteos ( $p = 0,02$ ; Tabla 2) y se registró conteos más altos una semana después del inicio del experimento (533 org/L;  $p < 0,01$ ). Los géneros *Colurella* y *Proales* solo alcanzaron entre el 1 y 33% del total de rotíferos y presentaron un efecto de interacción “fertilización x sedimento” con conteos más altos para la combinación “10N:1P sin sedimento” ( $p < 0,01$  y  $p = 0,03$ , respectivamente). Además, los efectos principales sedimento y tiempo para las densidades de *Proales* spp. fueron significativos, con valores

más altos en los tanques sin sedimento ( $p=0,03$ ; Tabla 2) y en la tercera semana del experimento ( $p=0,02$ ).

Los nauplios de copépodos representaron entre 1 y 40% de los conteos totales del zooplancton (Tabla 3), y el efecto principal para los factores nutrientes y sedimento no fueron significativos ( $p=0,65$  y  $p=0,70$ , Tabla 2). No obstante, el efecto tiempo mostró diferencias significativas con densidades que alcanzaron máximos al principio del experimento y en la tercera semana (258 org/L y 130 org/L, respectivamente;  $p<0,01$ ). Los copépodos adultos representaron entre 1 y 79% de los conteos totales del zooplancton y la presencia de sedimento incrementó sus conteos ( $p<0,01$ ; Tabla 3). Además, la máxima densidad de copépodos adultos se registró al inicio del experimento (678 org/L) para después disminuir progresivamente hasta alcanzar valores de 240 org/L al final del experimento ( $p<0,01$ ). Los tintínidos fueron el grupo menos abundante del zooplancton (entre 1 y 33% de los conteos totales) y representados exclusivamente por el género *Tintinnopsis*. Los tintínidos alcanzaron conteos máximos de 176 org/L en la primera semana del experimento ( $p<0,01$ ).

Los conteos de bacterias totales oscilaron entre 17 y  $38 \times 10^3$  células/mL (Tabla 3), donde los efectos principales asociados al sedimento y los nutrientes mostraron conteos más altos para los tanques sin presencia de sedimento ( $p<0,01$ ; Tabla 2) ó con fertilización ( $p<0,01$ ; Tabla 2). Las concentraciones incrementaron progresivamente desde un promedio de  $19 \times 10^3$  células/mL hasta alcanzar un máximo de  $37 \times 10^3$  células/mL en la tercera semana para finalmente disminuir a valores de  $24 \times 10^3$  células/mL al final del experimento ( $p<0,01$ ; Fig. 2e). Los conteos de *Vibrio* spp. mostraron efecto de interacción “fertilización x sedimento” ( $p=0,01$ ), registrándose la mayor concentración para la combinación “Control sin sedimento” (133 UFC/mL). En general, la adición de

nutrientes ocasionó una disminución en los conteos de *Vibrio* spp. ( $p=0,01$ ; Tabla 2) y no se presentó variación en el tiempo ( $p=0,19$ ; Fig. 2f).

Las concentraciones de SRP se mantuvieron en promedio por debajo de 0,02 mg/L (Tabla 3) y no se observó un efecto principal debido a la fertilización ó el sedimento (Tabla 2). No obstante, las concentraciones a través del tiempo fueron diferentes ( $p<0,01$ , Tabla 2), alcanzando valores mayores en la segunda semana (0,02 mg/L) y manteniéndose hasta el final del experimento. Las concentraciones de TAN fueron mayores en los tanques recibiendo fertilizantes ( $p<0,01$ ; Tablas 2 y 3). Además, mostraron un incremento progresivo desde 0,03 mg/L al inicio del experimento hasta alcanzar el valor promedio más alto de 0,52 mg/L en la cuarta semana ( $p<0,01$ ). El efecto principal asociado a la fertilización para las concentraciones de DN fue significativo ( $p<0,01$ ; Tabla 2) con valores más altos en los tanques que recibieron nutrientes inorgánicos. Su evolución en el tiempo mostró un incremento progresivo desde 0,63 mg/L al inicio del experimento hasta alcanzar 2,02 mg/L en promedio en la cuarta semana ( $p<0,01$ ).

Las concentraciones promedio de los sólidos totales (TS) fueron mayores en los tanques con presencia de sedimento ( $p<0,01$ ; Tablas 2 y 3). Además, se notó un incremento progresivo en el tiempo desde una concentración de 44.555 mg/L al principio hasta alcanzar 58.629 mg/L en la cuarta semana ( $p<0,01$ ). Las fracciones disuelta (TDS) y particulada (TSS) presentaron un patrón muy parecido, con concentraciones más altas en los tanques con sedimentos ( $p<0,01$  en ambos casos), al final del experimento ( $p<0,01$  para TDS; Fig. 3a) y en la tercera semana ( $p<0,01$  para TSS; Fig. 3b).

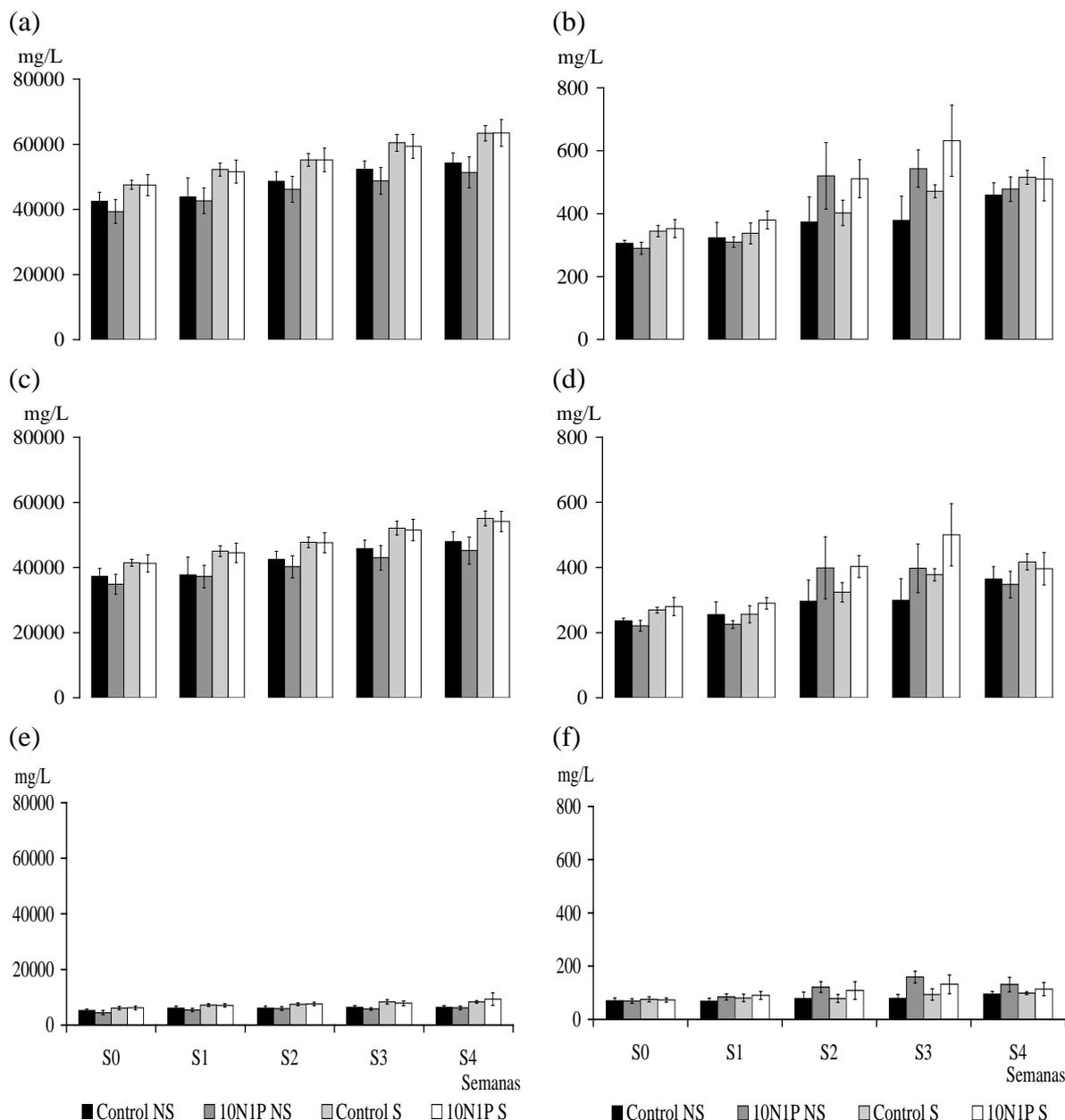


Figura 3: Evolución en el tiempo para los análisis de sólidos del régimen de fertilización inorgánica: (a) TDS, (b) TSS, (c) DIM, (d) PIM, (e) DOM y (f) POM.

En términos generales, las concentraciones de la materia inorgánica (TIM, DIM y PIM) incrementaron con la presencia de sedimento ( $p < 0,01$  para todos los casos; Tabla 2) y a través del tiempo ( $p < 0,01$  para todos los casos; Tabla 2) con las mayores concentraciones asociadas a la cuarta semana para TIM y DIM y a la tercera semana para PIM (Fig. 3c, 3d). De igual manera, las concentraciones de la materia orgánica incrementaron en los tanques con sedimento (a la excepción de POM) y con el tiempo ( $p < 0,01$  para todos los

casos; Tabla 2) para llegar a valores máximos a la cuarta semana para TOM y DOM y a la tercera semana para POM (Fig. 3e, 3f). Adicionalmente, las concentraciones de POM fueron más altas en los tanques recibiendo fertilizantes ( $p < 0,01$ ; Tablas 2 y 3).

#### **4.1.2. Condición del suelo:**

Los porcentajes de materia orgánica en el suelo fueron alrededor del 2,0% al inicio del experimento para ambos grupos ( $p = 0,65$ ) y bajaron al final del experimento para llegar a valores de 1,4% ( $p < 0,01$ ), sin encontrar diferencia entre el control y los tanques recibiendo fertilizantes ( $p = 0,68$ ; Tabla 4). Los valores de pH no mostraron diferencias entre grupos, tampoco variaron en el tiempo y se mantuvieron entre 8,05 y 8,17 (Tabla 4).

Tabla 4: Promedio de las variables de calidad del suelo ( $\pm$  desviación estándar) evaluadas al inicio y final del experimento de fertilización inorgánica a través de ANOVA de una vía. Datos en la misma fila con diferente superíndice y en una misma columna con diferente cantidad de (\*) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

VARIABLE	CONTROL	10N:1P
Materia orgánica (%)		
Inicio	2,02 $\pm$ 0,22 <sup>a,*</sup>	1,95 $\pm$ 0,28 <sup>a,*</sup>
Final	1,32 $\pm$ 0,27 <sup>a,**</sup>	1,39 $\pm$ 0,34 <sup>a,**</sup>
pH		
Inicio	8,13 $\pm$ 0,09 <sup>a,*</sup>	8,05 $\pm$ 0,15 <sup>a,*</sup>
Final	8,12 $\pm$ 0,05 <sup>a,*</sup>	8,17 $\pm$ 0,08 <sup>a,*</sup>
P asociado con Al y Fe (mg P/kg suelo)		
Inicio	4 $\pm$ 1 <sup>a,*</sup>	4 $\pm$ 1 <sup>a,*</sup>
Final	8 $\pm$ 1 <sup>a,**</sup>	8 $\pm$ 2 <sup>a,**</sup>
P asociado con Ca (mg P/kg suelo)		
Inicio	236 $\pm$ 12 <sup>a,*</sup>	236 $\pm$ 36 <sup>a,*</sup>
Final	236 $\pm$ 33 <sup>a,*</sup>	193 $\pm$ 56 <sup>a,*</sup>
P total (mg P/kg suelo)		
Inicio	363 $\pm$ 9 <sup>a,*</sup>	365 $\pm$ 25 <sup>a,*</sup>
Final	356 $\pm$ 9 <sup>a,*</sup>	348 $\pm$ 9 <sup>a,*</sup>

Las concentraciones para las fracciones de fósforo asociadas a iones ácidos (Al y Fe), al ión Ca básico y de fósforo total en el suelo medidos al inicio y final del experimento se muestran en la Tabla 4. La fracción de fósforo asociada con los iones ácidos fue la más baja, representó entre 1 y 2% del P total e incrementó entre el inicio y final del experimento ( $p < 0,01$ ), sin encontrar diferencias entre los tanques controles y los tanques recibiendo fertilizantes. La fracción de P asociada con el ión Ca representó entre 55 y 66% del P total del suelo, sin presentar diferencias entre el grupo control y el grupo fertilizado ó en el tiempo ( $p = 0,98$  para “Control” y  $p = 0,18$  para “10N:1P”). El mismo comportamiento se observó para las concentraciones de fósforo total, con tendencia a la disminución en el tiempo para los tanques “10N:1P” pero sin encontrar diferencia significativa ( $p = 0,15$ ).

#### **4.1.3. Análisis de componentes principales y regresión múltiple:**

Para el análisis de componentes principales (ACP), las variables evaluadas en el experimento de fertilización inorgánica, sin incluir a los conteos de fitoplancton y el factor sedimento, explicaron el 78,3% de la variabilidad total de los datos a través de cuatro componentes (Tabla 5). De manera general, la salinidad (TS, TIM, TDS y DIM) y la materia orgánica (TOM y DOM) estuvieron fuertemente relacionadas positivamente con el primer componente y en menor proporción, PIM y el tiempo (Tabla 6). El segundo componente mostró asociación negativa con el fitoplancton (clorofila *a*, TSS y POM), las bacterias totales, la fertilización (N y P aportados con los fertilizantes), PIM y DN. Los nutrientes solubles (SRP, TAN y DN) estuvieron asociados negativamente con el tercer componente. Finalmente, el cuarto componente estuvo asociado positivamente con el zooplancton y negativamente con las concentraciones de *Vibrio* spp.

Tabla 5: Eigenvalores y varianza explicada por los componentes principales para el experimento de fertilización inorgánica.

Componente	Eigenvalores	Porcentaje explicado	Porcentaje acumulado
1	6,374	33,5%	33,5%
2	4,849	25,5%	59,0%
3	2,412	12,7%	71,7%
4	1,248	6,6%	78,3%

Tabla 6: Coeficientes de correlación entre variables originales y los componentes principales (CP) para el experimento de fertilización inorgánica. Coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.

VARIABLE	CP1	CP2	CP3	CP4
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	-0,05	<b><u>-0,86</u></b>	-0,06	0,15
Zooplankton (org/L)	-0,15	0,13	0,09	<b><u>0,82</u></b>
Bacterias totales ( $10^3$ UFC/mL)	-0,14	<b><u>-0,55</u></b>	-0,27	-0,03
<i>Vibrio</i> spp. ( $10^2$ UFC/mL)	-0,17	0,25	0,06	<b><u>-0,57</u></b>
Nitrógeno (mg/tanque)	0,14	<b><u>-0,78</u></b>	-0,46	0,16
Fósforo (mg/tanque)	0,14	<b><u>-0,78</u></b>	-0,46	0,16
SRP (mg/L)	-0,03	-0,15	<b><u>-0,80</u></b>	-0,10
TAN (mg/L)	0,18	-0,11	<b><u>-0,88</u></b>	0,04
DN (mg/L)	0,29	<b><u>-0,62</u></b>	<b><u>-0,63</u></b>	0,04
TS (mg/L)	<b><u>0,96</u></b>	-0,12	-0,06	-0,02
TIM (mg/L)	<b><u>0,94</u></b>	-0,13	-0,06	-0,06
TOM (mg/L)	<b><u>0,90</u></b>	-0,03	-0,08	0,14
TDS (mg/L)	<b><u>0,96</u></b>	-0,11	-0,06	-0,02
DIM (mg/L)	<b><u>0,94</u></b>	-0,13	-0,06	-0,06
DOM (mg/L)	<b><u>0,90</u></b>	-0,01	-0,08	0,14
TSS (mg/L)	0,48	<b><u>-0,78</u></b>	0,09	-0,15
PIM (mg/L)	<b><u>0,55</u></b>	<b><u>-0,68</u></b>	0,12	-0,18
POM (mg/L)	0,14	<b><u>-0,86</u></b>	-0,05	-0,01
Tiempo (semana)	<b><u>0,61</u></b>	-0,48	-0,20	-0,25

En base a los resultados de ACP se seleccionaron las variables para el análisis de regresión múltiple. El primer componente estuvo relacionado con la salinidad y la materia orgánica, por tanto se seleccionó TDS (mg/L) y DOM (mg/L) como las variables representativas. POM no fue considerado porque representa básicamente el fitoplancton, el cual fue también evaluado en términos de clorofila *a* ( $\mu\text{g/L}$ ). Las otras variables escogidas fueron: bacterias totales ( $10^3$  células/mL), *Vibrio* spp. ( $10^2$  UFC/mL),

zooplancton (org/L), aportes en N ( $N_F$ ) y P ( $P_F$ ) a través de los fertilizantes inorgánicos (g/tanque), SRP (mg/L), TAN (mg/L) y DN (mg/L). Las variables seleccionadas como dependientes para cada una de las ecuaciones de regresión fueron clorofila *a*, conteos de bacterias totales y *Vibrio* spp, basándose en los objetivos del trabajo. Todos los modelos de regresión efectuados tuvieron una predicción altamente significativa ( $p < 0,01$ ), no obstante, la variabilidad total explicada fluctuó entre 10 y 62% (Tabla 7).

Tabla 7: Regresiones múltiples obtenidas durante el experimento de fertilización inorgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados. Ver en el Anexo 2 las ecuaciones con las transformaciones realizadas para cada variable.

Regresión	p	r <sup>2</sup>
$Y_{(\text{Clorofila } a)} = 1,930 - 0,717 (\text{DN}) - 0,359 (\text{TAN}) + 0,141 (N_F) + 0,000086 (\text{Zooplancton}) - 0,000011 (\text{TDS})$	<0,01	62%
$Y_{(\text{Bacterias})} = 3,850 + 0,434 (\text{SRP}) + 0,069 (\text{Clorofila } a) + 0,032 (N_F) - 0,000021 (\text{DOM})$	<0,01	36%
$Y_{(\text{Vibrio spp.})} = - 19,332 + 117,016 (\text{DN}) - 0,037 (\text{Zooplancton})$	<0,01	10%

El modelo de regresión lineal para la concentración de clorofila *a* mostró una relación directa entre esta variable y el N aportado por el fertilizante y los conteos de zooplancton, mientras que mostró una relación inversa con el nitrógeno disuelto (DN y TAN) y los sólidos totales disueltos (TDS) (Tabla 7). Las bacterias totales mostraron relación positiva con las concentraciones de SRP, clorofila *a* y el N aportado por los fertilizantes, mientras su relación es inversa con DOM. La regresión lineal para los conteos de *Vibrio* spp. explica solamente 10% de su variabilidad, indica una relación positiva con el nitrógeno disuelto y una relación inversa con el zooplancton.

## 4.2. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN ORGÁNICA:

### **4.2.1. Variables de calidad de agua :**

Las concentraciones de clorofila *a* fueron mayores en los tanques recibiendo alimento ( $p < 0,01$ ; Tablas 8 y 9). Además, las concentraciones más altas se encontraron desde la segunda hasta la cuarta semana ( $p < 0,01$ ; Fig. 4a). Al evaluar los conteos de fitoplancton, se encontraron efectos principales significativos para los factores alimento, sedimento y tiempo ( $p \leq 0,01$  en todos los casos; Tabla 8). Los conteos más altos fueron asociados con la adición de alimento, la ausencia de sedimento y fueron incrementando progresivamente para llegar a valores más altos en la última semana de muestreo (Tabla 9).

Las cianobacterias fueron el grupo fitoplanctónico dominante representando entre 96 y 100% de la población (Tabla 9). Al ser el grupo dominante, las cianobacterias presentan un comportamiento igual al del fitoplancton en relación con los tres factores principales (Tabla 8). Se encontraron los conteos más altos en los tanques con adición de alimento, ausencia de sedimento y al final del experimento ( $p \leq 0,01$  en todos los casos; Fig. 4b). El género *Synechococcus* dominó dentro de las cianobacterias y representó entre 82 y 99% de los conteos totales del fitoplancton (Tabla 9). Los conteos de *Aphanothece* spp., una cianobacteria colonial de pequeño tamaño, fueron más altos en los tanques con presencia de sedimento ( $p < 0,01$ ; Tabla 8) y durante la tercera y cuarta semana ( $p = 0,01$ ; Tabla 8). Los conteos de *Oscillatoria* spp., una cianobacteria filamentosa, fueron más altos en la combinación “Control sin sedimento” ( $p < 0,01$ ), además de incrementar en el tiempo ( $p < 0,01$ ).

Tabla 8: Valores p obtenidos de ANOVA medidas repetidas y Kruskal Wallis (\*) para los efectos principales alimento (A), sedimento (S), tiempo (T) y sus interacciones para las variables de calidad de agua evaluadas durante el experimento de fertilización orgánica.

Variable	A	S	T	A x S	A x T	S x T	A x S x T
Clorofila <i>a</i> (µg/L)*	<b>&lt;0,01</b>	0,60	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	----	----	----
Fitoplancton (org/mL)	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,06	0,06	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
Cianobacterias	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,06	0,06	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
<i>Aphanotece</i>	0,83	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>
<i>Synechococcus</i>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,06	<b>0,04</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
<i>Oscillatoria</i>	0,20	0,86	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,32	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,02</b>
<i>Spirulina</i>	0,65	0,29	<b>&lt;0,01</b>	0,34	<b>0,04</b>	0,13	0,17
Diatomeas	0,41	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,80	0,76	0,46	0,83
Pennales	0,82	0,76	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,03</b>	0,83	0,84	<b>&lt;0,01</b>
Centrales	0,08	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,79	0,96	0,70	0,79
<i>Nitzchia</i>	0,93	0,46	0,72	0,22	<b>0,04</b>	0,56	0,70
Flagelados	0,26	1,00	0,56	1,00	0,83	0,13	0,56
Zooplankton (org/L)	<b>&lt;0,01</b>	0,80	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,25	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,01</b>
Rotíferos	<b>&lt;0,01</b>	0,06	<b>&lt;0,01</b>	0,48	0,31	0,29	0,29
<i>Brachionus</i>	<b>0,01</b>	0,09	<b>&lt;0,01</b>	0,93	0,20	0,16	0,22
<i>Colurella</i> *	1,00	1,00	0,55	0,57	----	----	----
<i>Proales</i>	0,16	0,46	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,65	0,41	0,99
Nauplios de copépodos	0,23	0,66	0,07	<b>0,01</b>	0,75	<b>0,01</b>	0,89
Copépodos adultos	0,27	0,20	<b>0,03</b>	0,27	<b>0,01</b>	0,08	<b>0,05</b>
Tintínidos	<b>&lt;0,01</b>	0,98	<b>&lt;0,01</b>	0,11	0,12	0,89	0,22
Bacteria total(células/mL)	<b>&lt;0,01</b>	0,07	<b>&lt;0,01</b>	0,06	0,07	<b>&lt;0,01</b>	0,52
<i>Vibrio</i> spp (UFC/mL)	<b>&lt;0,01</b>	0,31	<b>0,01</b>	0,70	<b>0,05</b>	1,00	0,65
SRP (mg/L)*	0,76	1,00	0,09	0,57	----	----	----
TAN (mg/L)*	0,52	0,73	0,32	<b>0,05</b>	----	----	----
DN (mg/L)	<b>0,04</b>	0,17	<b>&lt;0,01</b>	0,85	0,36	0,50	0,62
TS (mg/L)	0,63	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,29	0,97	<b>0,02</b>	0,56
TIM	0,70	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,56	0,99	0,51	0,27
TOM	0,20	<b>0,02</b>	0,64	0,90	0,81	0,63	0,47
TDS (mg/L)	0,59	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,24	0,98	<b>0,02</b>	0,61
DIM	0,74	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,54	0,99	0,47	0,28
DOM	0,20	<b>0,02</b>	0,67	0,87	0,82	0,62	0,46
TSS (mg/L)	0,17	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,42	0,91	0,51	0,81
PIM	0,42	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,98	0,83	0,61	0,92
POM	0,14	0,94	<b>&lt;0,01</b>	0,08	0,20	0,38	0,36

Las diatomeas constituyeron el segundo grupo más importante y llegaron a representar hasta el 4% de la población fitoplanctónica (Tabla 9). La presencia de sedimento disminuyó los conteos totales de diatomeas ( $p < 0,01$ ; Tabla 8) y sus concentraciones fueron más altas en la segunda y tercera semana ( $p < 0,01$ ; Fig. 4c). Las diatomeas centrales presentaron las mayores concentraciones en la segunda semana ( $p < 0,01$ ),

mientras que las diatomeas pennales alcanzaron mayores concentraciones en la tercera semana ( $p < 0,01$ ). Los efectos principales debido al alimento, sedimento y tiempo no fueron significativos ( $p = 0,93$ ,  $p = 0,46$  y  $p = 0,72$ , respectivamente; Tabla 8) para los conteos de *Nitzschia* spp. Los flagelados representados exclusivamente por *Euglena* spp., fueron el grupo menos abundante y no mostraron diferencias para ninguno de los efectos principales o sus interacciones (Tabla 8).

Tabla 9: Promedio por tratamiento de las variables de calidad de agua ( $\pm$  desviación estándar) evaluadas durante el experimento de fertilización orgánica.

Variable	Control sin sedimento	Control con sedimento	Alimento sin sedimento	Alimento con sedimento
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/L}$ )*	24 $\pm$ 11	29 $\pm$ 12	48 $\pm$ 22	34 $\pm$ 16
Fitoplancton ( $10^3$ org/mL)	662 $\pm$ 444	638 $\pm$ 420	1.203 $\pm$ 689	747 $\pm$ 575
Cianobacterias ( $10^3$ org/mL)	657 $\pm$ 443	635 $\pm$ 420	1.195 $\pm$ 690	744 $\pm$ 575
<i>Aphanotece</i>	4 $\pm$ 5	22 $\pm$ 15	7 $\pm$ 6	18 $\pm$ 13
<i>Synechococcus</i>	639 $\pm$ 434	589 $\pm$ 397	1.165 $\pm$ 673	707 $\pm$ 554
<i>Oscillatoria</i>	10 $\pm$ 13	19 $\pm$ 19	19 $\pm$ 16	13 $\pm$ 15
<i>Spirulina</i>	5 $\pm$ 7	5 $\pm$ 7	4 $\pm$ 6	6 $\pm$ 10
Diatomeas ( $10^2$ org/mL)	52 $\pm$ 62	26 $\pm$ 43	72 $\pm$ 108	32 $\pm$ 46
Pennales	8 $\pm$ 30	0 $\pm$ 5	1 $\pm$ 5	5 $\pm$ 16
Centrales	42 $\pm$ 57	24 $\pm$ 43	68 $\pm$ 11	26 $\pm$ 43
<i>Nitzschia</i>	2 $\pm$ 7	2 $\pm$ 7	3 $\pm$ 11	1 $\pm$ 5
Flagelados (org/mL)	86 $\pm$ 470	86 $\pm$ 470	343 $\pm$ 1.117	343 $\pm$ 1.878
Zooplancton (org/L)	936 $\pm$ 408	1.235 $\pm$ 571	1.727 $\pm$ 601	1.312 $\pm$ 358
Rotíferos	536 $\pm$ 302	507 $\pm$ 393	960 $\pm$ 594	678 $\pm$ 394
<i>Brachionus</i>	477 $\pm$ 287	400 $\pm$ 338	782 $\pm$ 528	579 $\pm$ 346
<i>Colurella</i>	5 $\pm$ 30	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	11 $\pm$ 63
<i>Proales</i>	54 $\pm$ 81	107 $\pm$ 110	178 $\pm$ 151	88 $\pm$ 146
Nauplios de copépodos	135 $\pm$ 174	304 $\pm$ 400	267 $\pm$ 209	176 $\pm$ 164
Copépodos adultos	216 $\pm$ 229	345 $\pm$ 319	334 $\pm$ 272	344 $\pm$ 408
Tintínidos	49 $\pm$ 78	79 $\pm$ 99	167 $\pm$ 158	114 $\pm$ 118
Bacteria total ( $10^3$ células/mL)	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	16 $\pm$ 4	13 $\pm$ 4
<i>Vibrio</i> spp (UFC/mL)	18 $\pm$ 20	16 $\pm$ 21	57 $\pm$ 68	39 $\pm$ 56
SRP (mg/L)*	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
TAN (mg/L)*	0,02 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
DN (mg/L)	0,59 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,26	0,62 $\pm$ 0,20
TS (mg/L)	45.774 $\pm$ 1.330	48.514 $\pm$ 2.655	45.674 $\pm$ 1.670	48.793 $\pm$ 2.068
TIM	40.094 $\pm$ 1.329	42.466 $\pm$ 2.382	39.811 $\pm$ 2.756	42.525 $\pm$ 1.793
TOM	5.680 $\pm$ 454	6.048 $\pm$ 552	5.862 $\pm$ 1.592	6.268 $\pm$ 536
TDS (mg/L)	45.445 $\pm$ 1.323	48.166 $\pm$ 2.642	45.333 $\pm$ 1.664	48.481 $\pm$ 2.103
DIM	39.832 $\pm$ 1.329	42.187 $\pm$ 2.376	39.542 $\pm$ 2.756	42.272 $\pm$ 1.826
DOM	5.613 $\pm$ 453	5.979 $\pm$ 549	5.791 $\pm$ 1.594	6.209 $\pm$ 540
TSS (mg/L)	328 $\pm$ 36	346 $\pm$ 42	339 $\pm$ 28	349 $\pm$ 45
PIM	264 $\pm$ 30	277 $\pm$ 37	267 $\pm$ 23	281 $\pm$ 36
POM	64 $\pm$ 15	69 $\pm$ 12	73 $\pm$ 13	68 $\pm$ 15

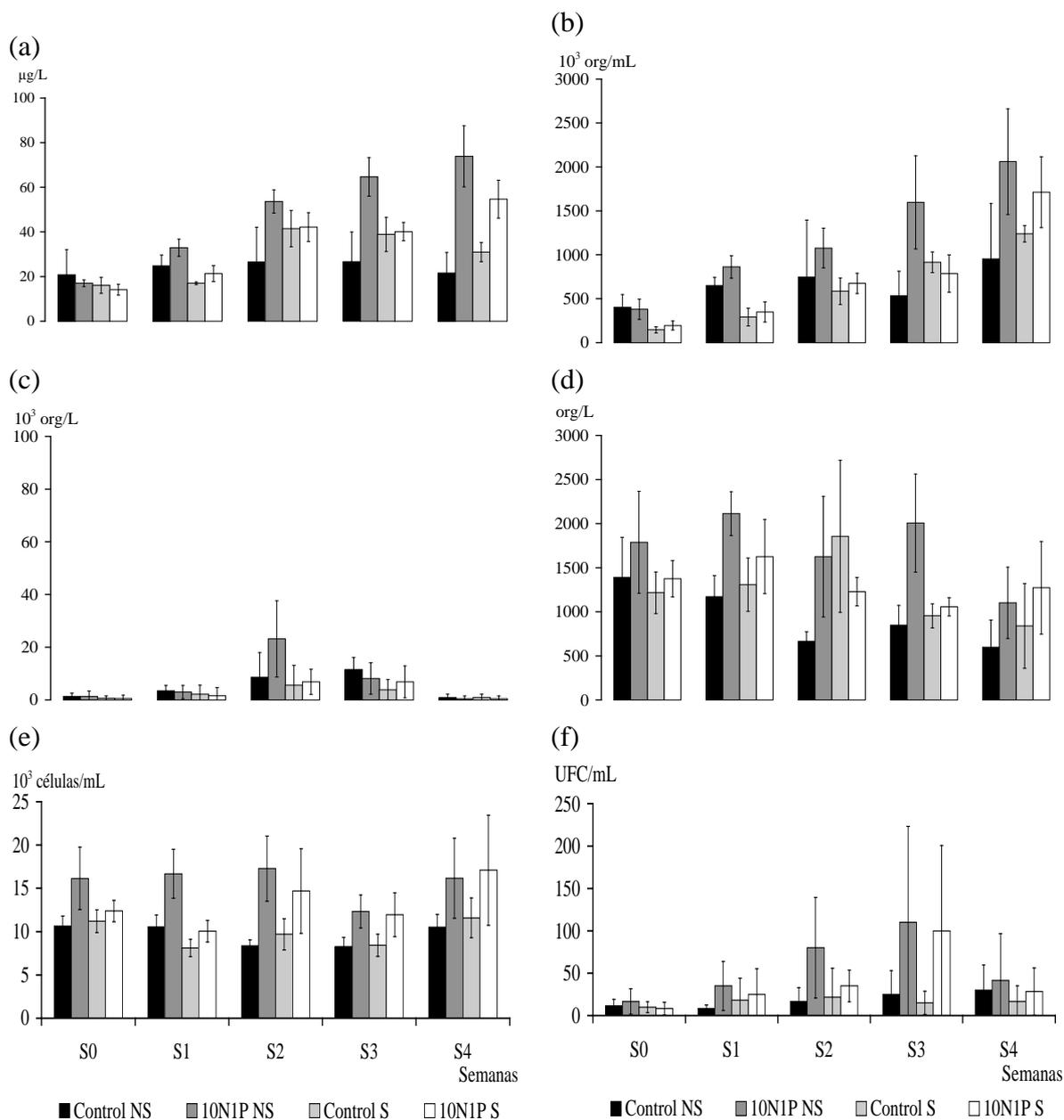


Figura 4: Evolución en el tiempo para variables de calidad de agua del régimen de fertilización orgánica: (a) clorofila *a*, (b) conteos de cianobacterias, (c) conteos de diatomeas, (d) densidades de zooplancton, (e) conteos de bacterias totales y (f) conteos de *Vibrio* spp.

Las mayores densidades para el zooplancton total estuvieron asociadas a los tanques recibiendo alimento ( $p < 0,01$ ; Tabla 8) con conteos promedio de 1.312 org/L para los tanques con sedimento y 1.727 org/L para los tanques sin sedimento (Tabla 9). Además,

se registraron los conteos más altos entre la primera y tercera semana para después disminuir en la cuarta semana a valores de 953 org/L ( $p < 0,01$ ; Fig. 4d). Los rotíferos fueron el grupo más representativo del zooplancton, constituyendo entre el 7 y 99% de los conteos totales de zooplancton. Los conteos promedio más altos fueron asociados con los tanques recibiendo alimento ( $p < 0,01$ ; Tabla 8) y se registró el valor promedio más alto en la primera semana del experimento ( $p < 0,01$ ). Se identificaron a tres géneros; *Brachionus*, *Colurella* y *Proales*. *Brachionus* spp. fue el género dominante constituyendo entre el 1 y 99% de los conteos totales de rotíferos, incrementó con la adición de alimento ( $p = 0,01$ ) y presentó densidades más altas en la primera semana del experimento ( $p < 0,01$ ). Los géneros *Proales* y *Colurella* llegaron a alcanzar hasta el 67% del total de los rotíferos. Los conteos de *Proales* spp. fueron más altos en la combinación “Alimento sin sedimento” ( $p < 0,01$ ) y en la primera y tercera semana del experimento ( $p < 0,01$ ), mientras que *Colurella* spp. no presentó diferencias significativas para ninguno de los factores principales (Tabla 8).

Los nauplios de copépodos representaron entre el 1 y 70% del zooplancton total, sin obtener efectos principales significativos para los factores alimento, sedimento y tiempo (Tabla 8). Sin embargo, se encontró mayores densidades en el tratamiento “Alimento sin sedimento” ( $p < 0,01$ : Tablas 8 y 9). Los copépodos adultos representaron entre el 1 y 94% del zooplancton total y alcanzaron conteos más altos en la cuarta semana ( $p = 0,03$ ). Los tintínidos del género *Tintinnopsis* fueron el grupo menos representativo del zooplancton, incrementaron con la adición de alimento ( $p < 0,01$ ) y alcanzaron su densidad máxima en la tercera semana (174 org/L) para disminuir a valores de 12 org/L en la cuarta semana ( $p < 0,01$ ).

Los conteos de bacterias totales no fueron afectados por la presencia de sedimento ( $p=0,07$ ; Tabla 8), no obstante, sus densidades incrementaron con la adición de alimento ( $p<0,01$ ) y alcanzaron valores más altos en la segunda y cuarta semana ( $p<0,01$ ; Fig. 4e). Los conteos de *Vibrio* spp. fueron más altos en los tanques recibiendo alimento ( $p<0,01$ ; Tabla 8) e incrementaron progresivamente desde 12 UFC/mL al inicio del experimento hasta alcanzar 63 UFC/mL en la tercera semana ( $p=0,01$ ).

Los efectos principales alimento, sedimento y tiempo no fueron significativos para las concentraciones de SRP y TAN (Tabla 8). Sin embargo, se notó un efecto de la interacción “alimento x sedimento” sobre las concentraciones de TAN con valores más altos en la combinación “Control sin sedimento” ( $p=0,05$ ). Las mayores concentraciones de DN estuvieron asociadas a los tanques recibiendo alimento ( $p=0,04$ ), pero no se observó un efecto de la presencia de sedimento ( $p=0,17$ ). Adicionalmente, las concentraciones de DN incrementaron desde 0,46 mg/L al inicio del experimento hasta 0,88 mg/L en la cuarta semana ( $p<0,01$ ).

El efecto principal sedimento fue significativo para los sólidos totales, ocasionando concentraciones más altas en los tanques con sedimento ( $p<0,01$ ; Tabla 8). La evolución en el tiempo mostró un incremento desde 44.529 mg/L al inicio del experimento hasta 49.786 mg/L en la última semana ( $p<0,01$ ). Las fracciones disuelta (TDS) y particulada (TSS) siguieron el mismo patrón con concentraciones más altas en los tanques con sedimentos ( $p\leq 0,01$  para ambas fracciones) y al final del experimento ( $p<0,01$  para ambas fracciones) (Fig. 5a, 5b).

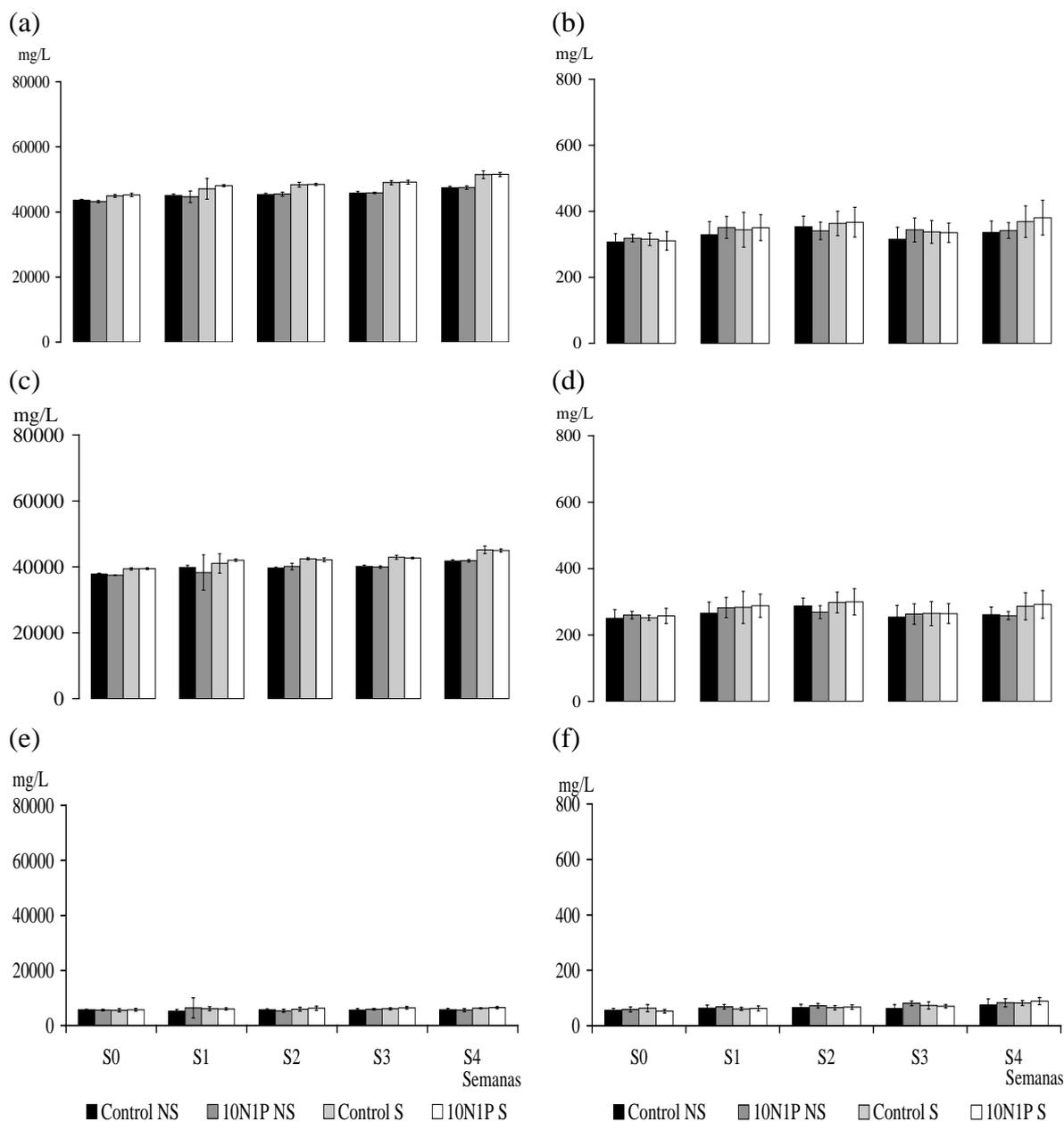


Figura 5: Evolución en el tiempo para los análisis de sólidos del régimen de fertilización orgánica: (a) TDS, (b) TSS, (c) DIM, (d) PIM, (e) DOM y (f) POM.

De manera general, las concentraciones de la materia inorgánica (TIM, DIM y PIM) no fueron influenciadas por la adición de alimento ( $p > 0,05$  en todos los casos; Tabla 8), incrementaron con la presencia de sedimento ( $p \leq 0,01$  para todos los casos) y a través del tiempo ( $p < 0,01$  para todos los casos) con las mayores concentraciones en la cuarta

semana para TIM y DIM y en la segunda semana para PIM (Fig. 5c, 5d). Las concentraciones de materia orgánica total (TOM) y disuelta (DOM) incrementaron con la presencia de sedimento ( $p=0,02$  en ambos casos), pero se mantuvieron en el tiempo (Fig. 5e). Las concentraciones de materia orgánica particulada (POM) no presentaron diferencias por la adición de alimento ó la presencia de sedimento, no obstante, incrementaron desde 58 mg/L al inicio del experimento hasta 82 mg/L en la última semana ( $p<0,01$ ; Fig. 5f).

#### **4.2.2. Condición del suelo:**

Los valores iniciales de materia orgánica en el suelo fueron en promedio de 2,25% y 1,54% para los grupos “Control” y “Alimento”, respectivamente, sin mostrar diferencia significativa entre grupo ó cambiar en el tiempo (Tabla 10). Los valores de pH incrementaron durante el experimento de fertilización orgánica ( $p<0,01$  para el grupo control y los tanques recibiendo alimento), no obstante, la comparación entre los dos grupos no mostró diferencias significativas ( $p=0,60$  para el inicio y  $p=0,99$  para el final).

La fracción de fósforo asociada con los iones ácidos fue la más baja, representó entre 2 y 4% del P total e incrementó al final del experimento ( $p<0,01$ ; Tabla 10). No obstante, la comparación entre los tanques controles y aquellos recibiendo alimento no mostraron diferencias. La fracción de P asociada con el ión  $\text{Ca}^{2+}$  representó entre 56 y 60% del P total del suelo, sin presentar diferencias entre grupos ( $p=0,79$  al inicio y  $p=0,25$  al final) ó en el tiempo ( $p=0,23$  para el grupo “Control” y  $p=0,63$  para el grupo “Alimento”). El mismo patrón fue observado para las concentraciones de fósforo total, registrándose un incremento en el tiempo pero sin encontrar diferencia significativa ( $p=0,28$  para el grupo control y  $p=0,39$  para el grupo “Alimento”).

Tabla 10: Promedio de las variables de calidad del suelo ( $\pm$  desviación estándar) evaluadas al inicio y final del experimento de fertilización orgánica a través de ANOVA de una vía. Datos en la misma fila con diferente superíndice y en una misma columna con diferente cantidad de (\*) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

VARIABLE	CONTROL	ALIMENTO
Materia orgánica (%)		
Inicio	2,25 $\pm$ 0,74 <sup>a,*</sup>	1,54 $\pm$ 1,01 <sup>a,*</sup>
Final	3,03 $\pm$ 0,69 <sup>a,*</sup>	2,44 $\pm$ 0,99 <sup>a,*</sup>
pH		
Inicio	8,14 $\pm$ 0,06 <sup>a,*</sup>	8,16 $\pm$ 0,05 <sup>a,*</sup>
Final	8,29 $\pm$ 0,04 <sup>a,**</sup>	8,29 $\pm$ 0,05 <sup>a,**</sup>
P asociado con Al y Fe (mg P/kg suelo)		
Inicio	7 $\pm$ 3 <sup>a,*</sup>	8 $\pm$ 2 <sup>a,*</sup>
Final	13 $\pm$ 2 <sup>a,**</sup>	12 $\pm$ 2 <sup>a,**</sup>
P asociado con Ca (mg P/kg suelo)		
Inicio	183 $\pm$ 15 <sup>a,*</sup>	177 $\pm$ 43 <sup>a,*</sup>
Final	197 $\pm$ 20 <sup>a,*</sup>	187 $\pm$ 26 <sup>a,*</sup>
P total(mg P/kg suelo)		
Inicio	314 $\pm$ 23 <sup>a,*</sup>	318 $\pm$ 27 <sup>a,*</sup>
Final	329 $\pm$ 19 <sup>a,*</sup>	329 $\pm$ 10 <sup>a,*</sup>

#### **4.2.3. Análisis de componentes principales y regresión múltiple:**

Las variables consideradas en el análisis de componentes principales (ACP), sin incluir a los conteos de fitoplancton y el factor sedimento, explicaron el 74,2 % de la variabilidad total de los datos a través de cinco componentes (Tabla 11). De manera general, la salinidad (TS, TIM, TDS y DIM) y el tiempo estuvieron relacionados positivamente con el primer componente (Tabla 12). El segundo componente mostró asociación positiva con el nitrógeno y fósforo aportados en el alimento, clorofila *a*, DN y bacterias totales. La materia orgánica (TOM y DOM) estuvo asociada fuertemente con el tercer componente. El cuarto componente tiene una asociación positiva con los sólidos particulados (TSS y PIM). Finalmente, el quinto componente tiene una relación negativa con el zooplancton y positiva con TAN.

Tabla 11: Eigenvalores y varianza explicada por los componentes principales para el experimento de fertilización orgánica.

Componente	Eigenvalores	Porcentaje explicado	Porcentaje acumulado
1	4,574	24,1%	24,1%
2	3,798	20,0%	44,1%
3	2,156	11,3%	55,4%
4	2,152	11,3%	66,7%
5	1,410	7,4%	74,2%

Tabla 12: Coeficiente de correlación entre las variables originales y los componentes principales (CP) para el experimento de fertilización orgánica. Coeficientes mayores a 0,50 fueron considerados.

VARIABLE	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	0,17	<b>0,83</b>	-0,05	0,20	0,16
Zooplankton (org/L)	-0,28	0,19	0,00	0,10	<b>-0,67</b>
Bacterias totales ( $10^3$ UFC/mL)	-0,12	<b>0,58</b>	0,14	0,14	-0,28
<i>Vibrio</i> spp. ( $10^2$ UFC/mL)	-0,01	<b>0,50</b>	0,02	-0,09	-0,08
Nitrógeno (mg/tanque)	0,21	<b>0,89</b>	-0,09	0,08	-0,10
Fósforo (mg/tanque)	0,21	<b>0,89</b>	-0,09	0,08	-0,11
SRP (mg/L)	0,17	-0,14	-0,14	-0,33	0,03
TAN (mg/L)	-0,24	-0,06	0,05	0,04	<b>0,61</b>
DN (mg/L)	0,38	<b>0,60</b>	-0,10	-0,12	0,43
TS (mg/L)	<b>0,94</b>	0,13	-0,17	0,11	0,00
TIM (mg/L)	<b>0,94</b>	0,11	0,20	0,10	0,00
TOM (mg/L)	-0,01	0,05	<b>-0,98</b>	0,02	0,00
TDS (mg/L)	<b>0,94</b>	0,13	-0,17	0,10	0,00
DIM (mg/L)	<b>0,94</b>	0,11	0,20	0,10	0,00
DOM (mg/L)	-0,02	0,05	<b>-0,98</b>	0,01	-0,01
TSS (mg/L)	0,26	0,08	-0,08	<b>0,93</b>	0,02
PIM (mg/L)	0,18	-0,11	-0,07	<b>0,90</b>	-0,11
POM (mg/L)	0,32	0,48	-0,06	0,48	0,30
Tiempo (semana)	<b>0,64</b>	0,46	-0,13	0,04	0,40

De acuerdo a los resultados del ACP y del mismo modo que en el primer experimento, se seleccionaron las siguientes variables para el análisis de regresión múltiple: TDS (mg/L), clorofila *a* ( $\mu\text{g/L}$ ), bacterias totales ( $10^3$  UFC/mL), *Vibrio* spp. ( $10^2$  UFC/mL), zooplankton (org/L), DOM (mg/L), aportes en N ( $N_a$ ) y P ( $P_a$ ) a través del alimento

(g/tanque), TAN (mg/L) y DN (mg/L). Además, se incluyó SRP (mg/L) que no mostró correlación significativa con ninguno de los componentes pero que fue seleccionado con fines de comparación con el experimento de fertilización inorgánica. Las variables dependientes para cada una de las ecuaciones de regresión fueron clorofila *a*, conteos de bacterias totales y *Vibrio* spp. Todos los modelos de regresión encontrados tuvieron una predicción altamente significativa ( $p < 0,01$ ), no obstante, la variabilidad total explicada fluctuó entre 21 y 56% (Tabla 13).

Tabla 13: Regresiones múltiples obtenidas durante el experimento de fertilización orgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados. Ver en el Anexo 2 las ecuaciones con las transformaciones realizadas para cada variable.

Regresión	p	r <sup>2</sup>
$Y_{(\text{Clorofila } a)} = 0,964 + 3,029 (\text{TAN}) + 0,687 (P_a) - 0,281(\text{DN}) + 0,014(N_a) + 0,006 (\text{Vibrio spp.}) + 0,004 (\text{Zooplancton}) + 0,000013 (\text{TDS})$	<0,01	56%
$Y_{(\text{Bacterias})} = 4,562 - 11,281 (\text{SRP}) + 0,536 (P_a) - 0,005 (\text{Vibrio spp.}) + 0,003 (\text{Zooplancton}) + 0,00001 (\text{TDS}) + 0,00001 (\text{DOM})$	<0,01	31%
$Y_{(\text{Vibrio spp.})} = 29,100 - 36,264 (\text{TAN}) + 10,029 (P_a) - 4,208 (\text{Bacterias}) + 2,532 (\text{Clorofila } a) - 0,0002 (\text{TDS})$	<0,01	21%

El modelo de regresión lineal para la concentración de clorofila *a* mostró una relación positiva con el TAN, los nutrientes aportados en el alimento ( $N_a$  y  $P_a$ ), los conteos de *Vibrio* spp., el zooplancton y los TDS, mientras que mostró una relación inversa con el nitrógeno disuelto (DN) (Tabla 13). Las bacterias totales mostraron relación positiva con el P aportado por el alimento, los conteos de zooplancton, TDS y DOM e inversa con el SRP y los conteos de *Vibrio* spp. Finalmente, los conteos de *Vibrio* spp. fueron relacionados positivamente con el P aportado por el alimento y la concentración de clorofila *a* e inversamente con las concentraciones de TAN, bacterias totales y TDS.

#### 4.3. FERTILIZACIÓN INORGÁNICA VERSUS FERTILIZACIÓN ORGÁNICA:

Se compararon los resultados de ambos experimentos (fertilización inorgánica y orgánica) a través de la prueba de los rangos múltiples no paramétricos de Kruskal Wallis (Tabla 14). Se encontró que las concentraciones de clorofila *a* fueron mayores en los tanques recibiendo fertilizante inorgánico ( $p < 0,01$ ). Eso fue comprobado con los resultados de los conteos de fitoplancton, donde los valores mayores fueron obtenidos en los tanques recibiendo fertilizantes ( $p < 0,01$ ), no obstante, sin encontrar diferencia entre los regímenes inorgánico y orgánico. Además, los conteos variaron en el tiempo, con máximos alcanzados en la tercera semana durante el experimento inorgánico ( $p < 0,01$ ) y en la cuarta semana durante el experimento de fertilización orgánica ( $p < 0,01$ ).

En ambos experimentos dominaron las cianobacterias y sus conteos más altos estuvieron asociados con los grupos “10N:1P” y “Alimento” ( $p < 0,01$ ; Tabla 14). *Synechococcus* spp. y *Oscillatoria* spp., los géneros más representativos de las cianobacterias Chroococcales y Hormogonales respectivamente, mostraron diferencias entre las ocho combinaciones ( $p < 0,01$ ) con mayores concentraciones asociadas a los tanques recibiendo fertilizantes inorgánicos ó alimento. Se confirma que *Aphanotece* spp. fue favorecida por la presencia de sedimento ( $p < 0,01$ ) y que *Spirulina* spp. fue más abundante en el experimento de fertilización inorgánica ( $p < 0,01$ ).

Tabla 14: Valores p obtenidos durante la prueba de Kruskal Wallis para los efectos principales fertilización (F), sedimento (S), tiempo (T) y la interacción fertilización x sedimento (F x S) comparando las variables de calidad de agua entre los dos experimentos de fertilización (fertilización inorgánica versus fertilización orgánica).

Variable	F	S	T	F x S
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	<u>&lt;0,01</u>	0,11	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Fitoplancton (org/mL)	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Cianobacterias	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,02</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Aphanotece</i>	0,07	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,03</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Synechococcus</i>	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,02</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Oscillatoria</i>	<u>&lt;0,01</u>	0,13	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Spirulina</i>	<u>&lt;0,01</u>	0,26	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Diatomeas	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Pennales	0,38	0,95	0,07	0,42
Centrales	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,05</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Nitzchia</i>	<u>&lt;0,01</u>	0,24	0,06	<u>&lt;0,01</u>
Flagelados	<u>0,02</u>	<u>0,01</u>	0,24	<u>&lt;0,01</u>
Zooplancton (org/L)	<u>&lt;0,01</u>	0,18	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Rotíferos	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,05</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Brachionus</i>	<u>&lt;0,01</u>	0,16	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
<i>Colurella</i>	<u>&lt;0,01</u>	0,07	0,16	<u>&lt;0,01</u>
<i>Proales</i>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Nauplios de copépodos	<u>&lt;0,01</u>	0,93	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>
Copépodos adultos	0,06	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
Tintínidos	<u>&lt;0,01</u>	0,97	<u>0,01</u>	<u>0,02</u>
Bacteria total(células/mL)	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,02</u>	0,29	<u>&lt;0,01</u>
<i>Vibrio</i> spp (UFC/mL)	<u>&lt;0,01</u>	<u>0,02</u>	0,06	<u>&lt;0,01</u>
SRP (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	0,28	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TAN (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	0,63	<u>0,04</u>	<u>&lt;0,01</u>
DN (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	0,95	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TS (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TIM	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TOM	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TDS (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
DIM	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
DOM	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
TSS (mg/L)	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
PIM	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>
POM	<u>&lt;0,01</u>	0,60	<u>&lt;0,01</u>	<u>&lt;0,01</u>

La presencia de diatomeas incrementó en el experimento de fertilización orgánica, principalmente por el incremento en diatomeas centrales ( $p < 0,01$ ). En general, los conteos de diatomeas totales fueron más altos en los tanques con aportes de nutrientes ( $p < 0,01$ ). Las diatomeas pennales no mostraron diferencias significativas entre

regímenes de fertilización ( $p=0,38$ ). *Nitzschia* spp. que representó en promedio el 61 y 5% de los conteos totales de las diatomeas durante el experimento de fertilización inorgánico y orgánico, respectivamente, incrementó por efecto de la fertilización inorgánica ( $p<0,01$ ). Finalmente, los flagelados fueron representados por *Cryptomonas* spp. en el experimento de fertilización inorgánica y por *Euglena* spp. en el experimento de fertilización orgánica, sin presentar diferencias en el tiempo como grupo general.

Las densidades del zooplancton total incrementaron en los tanques con aportes de nutrientes ( $p<0,01$ ), mientras el efecto principal sedimento no fue significativo ( $p=0,18$ ). Los conteos más altos del zooplancton ocurrieron durante la primera semana y disminuyeron en la tercera semana en el primer experimento y en la cuarta semana en el segundo experimento ( $p<0,01$ ). Los rotíferos fueron el grupo más representativo en ambos experimentos y sus concentraciones incrementaron con la fertilización ( $p<0,01$ ), no obstante, no mostraron diferencia entre tipo de fertilización. Los nauplios de copépodos incrementaron en el experimento de fertilización orgánica ( $p<0,01$ ), sin embargo, este incremento no fue diferente a la concentración promedio encontrada en la combinación “10N:1P con sedimento”. Los copépodos adultos mostraron diferencias entre las ocho combinaciones ( $p<0,01$ ) con conteos más altos en general, en los tanques con sedimento ( $p<0,01$ ), con concentraciones más altas en los tanques fertilizados sin mostrar diferencia entre regímenes de fertilización ( $p=0,06$ ). Para el género *Tintinnopsis* de los tintínidos, en general, las mayores concentraciones estuvieron asociadas al régimen de fertilización inorgánico ( $p<0,01$ ).

El conteo de bacterias totales mostró los valores más altos durante el experimento de fertilización inorgánica ( $p<0,01$ ) o en los tanques sin sedimento ( $p=0,02$ ). Los conteos de

*Vibrio* spp. mostraron diferencias significativas entre combinaciones ( $p < 0,01$ ), con las mayores concentraciones asociadas a la combinación “Control inorgánico sin sedimento” y los tanques recibiendo alimento.

Las concentraciones de SRP, TAN y DN fueron generalmente más altas en los tanques recibiendo fertilizantes inorgánicos e incrementaron en el tiempo ( $p < 0,05$  para todos los casos). Para ninguna de estas variables de calidad de agua el efecto principal para el factor sedimento fue significativo ( $p > 0,05$  en todos los casos).

Las concentraciones de los sólidos, a la excepción de la fracción orgánica particulada (POM), fueron más altas en los tanques con sedimentos ( $p < 0,01$ ) y durante el experimento de fertilización inorgánica ( $p < 0,01$ ). Además, se incrementaron los valores con el tiempo durante ambos experimentos ( $p < 0,01$ ). La materia orgánica particulada (POM) tuvo un comportamiento diferente y presentó valores más altos en los tanques recibiendo fertilizantes inorgánicos ( $p < 0,01$ ), sin notar un efecto principal de la presencia del sedimento ( $p = 0,60$ ).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN INORGÁNICA:

Los cuatro componentes obtenidos a través del ACP explicaron el 78,3% de la variabilidad total de los datos y fueron retenidos para su interpretación al nivel ecológico. El primer componente estuvo fuertemente relacionado con la salinidad, confirmando que la composición de los microorganismos encontrados en el estudio es típica de un ambiente marino. No obstante, esta composición puede ser modificada en un sistema acuático artificial y dependerá también de otros factores como luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes.

Las concentraciones de los sólidos fueron más altas en los tanques con presencia de sedimento, reflejando el efecto de mezcla de la columna de agua y resuspensión de los sólidos por la aireación utilizada cada noche. Los niveles de salinidad (observados a través de TDS y DIM) incrementaron durante el experimento debido a la evaporación favorecida por las altas temperaturas y los días soleados presentes durante el desarrollo del experimento. La salinidad estaba ligeramente más alta en el tratamiento "Control", no obstante, sin presentar diferencia significativa con los tanques que recibieron fertilizantes como fue encontrado por Monserrate (2003) en su estudio. Boyd (2001) menciona que a altas concentraciones de calcio, gran parte del fósforo adicionado con el fertilizante precipita de la columna de agua como fosfato de calcio altamente insoluble. No obstante, no se encontró un incremento en la concentración de fósforo asociado con calcio ó de fósforo total en los sedimentos, lo que podría anular el efecto de la adición del fósforo sobre la precipitación de los iones calcio ó indicar que esta precipitación no fue suficientemente alta para registrarse en los niveles de fósforo en el suelo. El equilibrio

del fósforo entre el agua y el sedimento es regulado por un número de factores tales como el contenido inicial de fósforo en el sedimento, pH, potencial de óxido-reducción, tensión de oxígeno, concentraciones relativas de hierro y la toma por parte del fitoplancton (Boyd y Musig, 1981; Boyd, 1995; Shrestha y Lin, 1996a; Bhakta y Jana, 2002; Hargreaves y Tucker, 2003), lo que dificulta la interpretación de cambios de concentraciones en sedimentos durante un periodo tan corto como en este estudio.

El análisis de regresión múltiple indicó que la biomasa del fitoplancton fue positivamente relacionada con el aporte de nitrógeno, lo que se reflejó en las concentraciones de clorofila *a* más altas en los tanques recibiendo fertilizantes. El fitoplancton requiere de nutrientes minerales para su crecimiento, siendo el C, N y P los más importantes (Boyd, 2001). Una manera de suplir la deficiencia de nutrientes es a través de la fertilización, la cual ha llegado a convertirse en un protocolo de manejo rutinario en acuicultura aumentando la productividad a través de vías autótrofas y heterótrofas (Jana *et al.*, 2001). Varios estudios demostraron un incremento mayor de fitoplancton después de un programa de fertilización combinando N y P, comparado con la adición solamente de N ó P (Elser y Goldman, 1990; Yusoff y McNabb; 1997). En general, el fitoplancton contiene de 7 a 10 veces más N que P por lo que Boyd y Tucker (1998) recomiendan que los programas de fertilización aporten una relación N:P de 10:1. Monserrate (2003) no encontró diferencia en el incremento de fitoplancton entre las dos relaciones que utilizó en su experimento de fertilización (10N:1P y 5N:1P), lo que sugiere probablemente que el nitrógeno es el principal nutriente limitante en aguas oceánicas ecuatorianas. El radio molar N:P (23:1) utilizado en éste estudio fue mayor al radio Redfield (16:1) requerido para el crecimiento óptimo del fitoplancton, indicando una deficiencia en P y quizás explicando porque la adición de P no fue relacionada con un incremento en fitoplancton.

Las cianobacterias fueron el grupo dominante del fitoplancton (35–100%), seguidas por las diatomeas y los flagelados. En general, los conteos de fitoplancton fueron más abundantes en los tanques recibiendo fertilizantes, no obstante, se encontró diferencia significativa solamente para los géneros *Nitzschia* y *Cryptomonas*, ambos representativos de ambientes mesotróficos (Duarte *et al.*, 1992; Yusoff *et al.*, 2002). Estos resultados coinciden con los reportados por Monserrate (2003), Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna (2003) para estanques de cultivo semi-intensivo de camarón en el noroeste de México y Burford (1997) en estanques camaroneros en Australia, donde las cianobacterias representaron entre el 50 y 98% de la población fitoplanctónica. Normalmente, la dominancia del fitoplancton por parte de las cianobacterias es el resultado de un conjunto de factores incluyendo altas temperaturas (Tilman *et al.*, 1986; Paerl y Tucker, 1995), baja disponibilidad de luz (van Liere y Mur, 1980; Tilzer, 1987), altas concentraciones de nutrientes (Tilman *et al.*, 1986), baja relación N:P (Smith, 1983; Daniels y Boyd, 1993; Paerl, 2000), estabilidad de la columna de agua durante el día (Reynolds y Walsby, 1975; Biró, 1995) y baja incidencia de depredación por parte del zooplancton (Haney, 1987; Lampert, 1987; Paerl y Tucker, 1995). Sin embargo, Tucker y van der Ploeg (1993), Paerl y Tucker (1995) y Burford (1997) sugirieron que la luz es la variable más importante limitando el crecimiento del fitoplancton en estanques acuícolas, lo que ocasiona dominancia por parte de las cianobacterias durante los meses cálidos del cultivo.

La relación positiva encontrada entre fitoplancton y zooplancton durante el análisis de regresión múltiple podría resultar probablemente de la disminución en el tiempo del zooplancton, reduciendo pérdidas en el fitoplancton por efecto de la depredación. Adicionalmente, Bergquist *et al.* (1985) y Grigorszky *et al.* (1998) demostraron que el crecimiento del fitoplancton puede ser estimulado a través de la regeneración de

nutrientes por parte del zooplancton. Los efectos predatorios de copépodos ciclopoideos sobre el zooplancton de menor tamaño, como los protozoarios, flagelados y rotíferos, reduce la presión sobre el fitoplancton de menor tamaño favoreciendo la abundancia de pequeñas algas como *Synechococcus* spp. (Caron, 1984; Lampert, 1987; Elser y Goldman, 1990; Biró, 1995; Cottingham *et al.*, 1997).

Las concentraciones de bacterias totales mostraron una correlación lineal positiva con la biomasa del fitoplancton (estimada a través de las concentraciones de clorofila *a* y POM), sin existir necesariamente una relación causa-efecto. Varios estudios han mostrado que la abundancia bacteriana y su productividad están asociadas a la abundancia y productividad del fitoplancton, ya que una porción del carbono fijado dentro de las bacterias es excretado del fitoplancton como carbono orgánico disuelto (Cole *et al.*, 1988; Sommaruga, 1995; Hargreaves y Tucker, 2003; Monserrate, 2003; Vörös *et al.*, 2003). No obstante, la correlación puede también indicar una relación indirecta por efecto de dependencia de las dos variables por un mismo factor, como la concentración de un nutriente limitante o el efecto de depredación por parte del zooplancton (Vrede *et al.*, 1999).

Las bacterias, como el fitoplancton, respondieron positivamente a la fertilización. El análisis de regresión múltiple encontró una relación positiva entre las bacterias, SRP y el aporte de N y P a través de la fertilización, lo que indica que mayores concentraciones de fosfato soluble estimulan una mayor producción bacteriana. Las bacterias exhiben altos requerimientos de N y P debido a sus altos contenidos en proteínas y ácidos nucleicos y mantienen ratios N:P intracelulares bajos (Church *et al.*, 2000; Medina-Sánchez *et al.*, 2002). Generalmente las bacterias presentan un bajo crecimiento cuando el ratio N:P del

sustrato disponible es bajo (Tezuka, 1990), como en el presente trabajo. No obstante, los conteos estuvieron dentro del rango  $10^4$ - $10^6$  UFC/mL reportados por Bayot *et al.* (2001), Sung *et al.* (2001) y Samuelson (2003). Comparando bacteria y fitoplancton, uno puede esperar que las bacterias con su gran radio área superficial:volumen y su rápido crecimiento son más eficientes en absorber nutrientes inorgánicos disueltos (Currie y Kalff, 1984) y disminuir su disponibilidad para el fitoplancton (Cottingham *et al.*, 1997). En el presente estudio, como en el de Monserrate (2003), las bacterias totales alcanzaron su máxima concentración en la tercera semana, mientras que para el fitoplancton la biomasa más alta se registró en la cuarta semana.

Los conteos de *Vibrio* spp. fueron relacionados positivamente con el nitrógeno disuelto, lo que sugiere probablemente una respuesta positiva a la fertilización y acumulación de materia orgánica disuelta en los mesocosmos, como fue reportado por Monserrate (2003). Sin embargo, no se observó un incremento en el tiempo y el análisis de regresión múltiple indicó una relación negativa con el zooplancton. Varios trabajos reportan que ciliados, flagelados, rotíferos, cladóceros y nauplios de copépodos remueven efectivamente las bacterias, causando una disminución en sus conteos y pudiendo alterar la composición de la población bacteriana a través de la selectividad (Havens, 1998; Vrede *et al.*, 1999; Gasol *et al.*, 2002). En el presente trabajo, rotíferos de los géneros *Brachionus* y *Proales* mantuvieron altas concentraciones hasta la tercera y cuarta semana, teniendo posiblemente un efecto negativo sobre las concentraciones de *Vibrio* spp. Otro factor que puede estar contribuyendo al no incremento en los conteos de *Vibrio* spp., es la relación de mutualismo existente entre los *Vibrio* spp. y el zooplancton. Colwell (1996) y Montanari *et al.* (1999) demostraron que el zooplancton lleva bacterias adheridas en su

superficie y en su tracto digestivo, principalmente del género *Vibrio*, pudiendo ocasionar una disminución en sus conteos en forma libre en la columna de agua.

La alta tasa de producción primaria asociada al incremento en fitoplancton observado en los tanques fertilizados probablemente permitió una rápida asimilación del nitrógeno disuelto (TAN y DN), lo que fue ratificado por la relación inversa encontrada entre estas variables durante el análisis de regresión múltiple. La absorción de amonio y nitrato por parte del fitoplancton es la principal vía de remoción del nitrógeno inorgánico en piscinas acuícolas evitando la acumulación de compuestos tóxicos nitrogenados (Tucker *et al.*, 1984; Hargreaves y Tucker, 1996; Burford, 1997; Hargreaves, 1998; Burford y Glibert, 1999; Burford *et al.*, 2003). El no incremento del SRP en los tanques recibiendo fertilizante puede ser el resultado de la remoción por parte del fitoplancton y de las bacterias, como de su adsorción sobre los sedimentos (Boyd y Tucker, 1998). Como no se encontró diferencias entre los tanques con y sin sedimento, y que tampoco se observó un incremento en la concentración total de P en los sedimentos, se sugiere que el fitoplancton y las bacterias fueron la ruta principal de remoción del P inorgánico disuelto adicionado con el fertilizante.

Al comparar las concentraciones de materia orgánica en el suelo entre inicio y final del experimento, se encontró una disminución en el tiempo. Las principales fuentes de materia orgánica en los mesocosmos son el resultado de la sedimentación del fitoplancton muerto, fertilizantes y heces del zooplancton, de naturaleza lábil y suministrando una fuente esencial de carbono para la actividad bacteriana (Boyd, 1995; Baldwin *et al.*, 1997). La disminución del porcentaje de materia orgánica en el presente experimento está relacionada más probablemente al establecimiento de condiciones adecuadas para la

actividad bacteriana como: sedimentación de materia orgánica lábil con bajos radios C:N, altas temperaturas (27,3°C), pH del suelo alcalino (8,0) y condiciones aeróbicas. Sonnenholzner y Boyd (2000) describieron las características físicas y químicas de suelos camaroneros en Ecuador, encontrando radios C:N en promedio de 8,5 (rango de 6 a 10) para suelos con concentraciones de carbono orgánico menor a 2,5%. Además, se observó un efecto negativo de la presencia de sedimento sobre la concentración total de bacteria libre en la columna de agua y se sospecha que por ser organismos litotróficos, el crecimiento bacteriano fue probablemente favorecido en la interfase agua-sedimento, lo que favoreció la descomposición de la materia orgánica.

## 5.2. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN ORGÁNICA:

El ACP obtuvo cinco componentes que explicaron el 74,2% de la variabilidad total de los datos. A diferencia del primer experimento, la materia orgánica estuvo relacionada con el tercer componente y los sólidos totales suspendidos con el cuarto componente. No obstante, el primer componente que explicó el 24,1% de la variabilidad total, estuvo asociado positivamente con la salinidad (TS, TIM, TDS, DIM) y el tiempo, de igual manera que para el experimento de fertilización inorgánica. Adicionalmente, las concentraciones de los sólidos fueron más altas en los tanques con sedimento reflejando la resuspensión de los sólidos durante la aireación y la salinidad incrementó a través del tiempo, sin alcanzar las concentraciones del experimento de fertilización inorgánica, probablemente por la temperatura promedio más baja (25,1°C contra 27,3°C).

El segundo componente indicó correlaciones positivas con los nutrientes aportados a través del alimento, clorofila *a*, nitrógeno disuelto y bacterias totales, mostrando posiblemente el rol del alimento comercial sobre el ecosistema. El análisis de regresión

múltiple para el fitoplancton confirmó estas relaciones e indicó una relación positiva entre su biomasa y TAN, P y N aportados a través del alimento y *Vibrio* spp. La biomasa del fitoplancton (estimada a través de los conteos totales ó de la concentración de clorofila *a*) fue más alta en los tanques recibiendo alimento comercial. En sistemas acuícolas, el alimento comercial contribuye con 75 a 90% del aporte en nitrógeno (Funge-Smith y Briggs, 1998; Hargreaves, 1998). Una pequeña porción (15-25%) de los nutrientes que entran con el alimento balanceado es retenida por las especies en cultivo y la porción no asimilada ó no consumida entra al ciclo biogeoquímico del estanque (Hargreaves y Tucker, 2003). Una parte es inmovilizada por la absorción del suelo, otra es degradada por procesos bacterianos dando origen a nutrientes disueltos que fomentan el crecimiento del fitoplancton y de las comunidades microbianas (Briggs y Funge-Smith, 1994; Ritvo *et al.*, 1998; Burford y Glibert, 1999). La relación positiva encontrada entre la biomasa del fitoplancton y el TAN, producto de la mineralización bacteriana sobre el nitrógeno orgánico del alimento, puede estar más relacionada con el rol positivo de la mineralización bacteriana sobre el crecimiento del fitoplancton. Sin embargo, las bacterias fueron limitadas por la concentración en P, respondiendo positivamente a la adición de P a través del alimento (relación positiva) y manteniendo niveles de SRP bajos (relación inversa).

Las interacciones existentes entre las bacterias y el fitoplancton contribuyen a la complejidad de la dinámica de la materia orgánica en los sistemas acuícolas (Brock y Main, 1995). Las bacterias proveen al fitoplancton CO<sub>2</sub>, vitaminas y nutrientes liberados a partir de la mineralización de la materia orgánica, mientras el fitoplancton libera materia orgánica soluble y suministra oxígeno para el metabolismo aeróbico bacteriano (Hargreaves y Tucker, 2003). Los resultados del experimento de fertilización orgánica

indican que las concentraciones de bacterias totales incrementaron durante las dos primeras semanas, mientras que el fitoplancton incrementó paulatinamente a través del tiempo llegando a concentraciones más altas al final del experimento, coincidiendo con Monserrate (2003) quien sugiere concentraciones máximas para el fitoplancton post-mineralización bacteriana. Adicionalmente, es importante indicar que el análisis de regresión múltiple encontró una relación positiva entre los conteos de *Vibrio* spp. y la biomasa fitoplanctónica. *Vibrio* spp. alcanzó su máximo al final del experimento, coincidiendo con la biomasa máxima de cianobacterias y sus conteos fueron mayores durante el experimento de fertilización orgánica. Midlen y Redding (1998) argumentan que un incremento en las poblaciones de *Vibrio* spp. podría esperarse como resultado del incremento en la población de cianobacterias, basado en la observación de bacterias dentro de la zona mucosa y sobre la pared celular de cianobacterias coloniales y filamentosas (Paerl y Tucker, 1995; Salomon *et al.*, 2003).

La composición del fitoplancton fue dominada por las cianobacterias, seguidas por las diatomeas y los flagelados representados exclusivamente por *Euglena* spp. en el experimento de fertilización orgánica. En sistemas cerrados, las altas cargas orgánicas aportadas a través de la alimentación artificial favorecen las poblaciones de cianobacterias, principalmente de los géneros *Anabaena*, *Aphanotece*, *Oscillatoria* y *Synechococcus* (Paerl y Tucker, 1995; Burford, 1997; Boyd y Tucker, 1998; Funge-Smith y Briggs, 1998; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Pérez-Linares *et al.*, 2003). Monseratte (2003) encontró que las diatomeas respondieron mejor a la fertilización inorgánica, sin embargo, en el presente estudio, los conteos de diatomeas totales fueron más altos en el régimen de fertilización orgánica, principalmente por el incremento observado en los conteos de diatomeas centrales.

Como en el experimento de fertilización inorgánica, el zooplancton posiblemente tuvo un efecto indirecto positivo sobre el crecimiento del fitoplancton. No obstante, sus conteos se mantuvieron altos durante todo el experimento, soportando que el zooplancton puede aprovechar directamente de la fertilización orgánica (Boyd y Tucker, 1998; Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Monserrate, 2003). Al principio del experimento, el zooplancton fue dominado por rotíferos, nauplios de copépodos y tintínidos, mientras que los copépodos adultos dominaron al final. El efecto predatorio de los copépodos adultos sobre los otros grupos de menor tamaño, disminuyó probablemente el efecto de pastoreo sobre el fitoplancton de pequeño tamaño y las bacterias, favoreciendo el desarrollo de *Synechococcus* spp. y *Vibrio* spp.

El aporte continuo de alimento a los tanques se reflejó en un incremento en la concentración de materia orgánica en el suelo al final del experimento de fertilización orgánica, no obstante, sin hallar diferencias significativas con las concentraciones al inicio. Esto pudo estar más relacionando probablemente con la mineralización de la materia orgánica por parte de las bacterias que fue favorecida por el mantenimiento de condiciones aeróbicas, un pH del suelo alcalino (>8,15) y temperaturas adecuadas (>25°C). La mineralización de la materia orgánica posiblemente incrementó las concentraciones de nutrientes inorgánicos que fueron aprovechados por el fitoplancton, lo que evitó el incremento de P en el suelo.

## 6. CONCLUSIÓN

Durante el experimento de fertilización inorgánica, las concentraciones de fitoplancton y bacterias totales se vieron favorecidas por la adición de nutrientes y alcanzaron valores máximos en la segunda y cuarta semana para el fitoplancton y en la tercera semana para las bacterias. El fitoplancton respondió principalmente a la adición de N, correspondiendo con los resultados de Monserrate (2003) quien no encontró diferencia en el incremento de fitoplancton con fertilización de 1,0 mg N/L combinado con dos niveles de aporte de fósforo (0,1 y 0,2 mg/L). Ambos estudios sugieren que el nitrógeno podría ser el principal limitante en aguas oceánicas ecuatorianas para el crecimiento del fitoplancton. El fitoplancton fue dominado por *Synechococcus* spp., una pequeña cianobacteria unicelular, característica de ambientes eutróficos y resistente a la depredación por parte de los copépodos quienes dominaron el zooplancton al final del experimento. Como en el estudio de Monserrate (2003), los resultados de las regresiones múltiples sugieren una dependencia de la producción bacteriana sobre el carbono orgánico generado por el fitoplancton en los mesocosmos. Los conteos de *Vibrio* spp. se mantuvieron en el tiempo, sin embargo fueron relacionados positivamente con la concentración de nitrógeno disuelto, señalando una repuesta positiva a la acumulación de materia orgánica en el sistema. Se puede concluir que la fertilización inorgánica favoreció los niveles tróficos más bajos de la cadena trófica (fitoplancton y bacteria) y que el N fue el nutriente limitante para el crecimiento del fitoplancton.

Durante el experimento de fertilización orgánica, el desfase entre el crecimiento bacteriano y el del fitoplancton sugiere la necesidad de la mineralización bacteriana con la consecuente liberación de nutrientes, antes de poder ser aprovechada por parte del

fitoplancton. Las concentraciones de zooplancton fueron más altas que en el experimento de fertilización inorgánica y se mantuvieron altas hasta el final del experimento para los copépodos adultos, denotando que el zooplancton puede aprovechar directamente el alimento. No obstante, los conteos de rotíferos y nauplios de copépodos disminuyeron a través del tiempo, ocasionando una disminución en la presión de depredación y favoreciendo un incremento en las concentraciones de *Synechococcus* spp., bacterias totales y *Vibrio* spp. al final del experimento. Se puede concluir que la fertilización orgánica favoreció la productividad bacteriana que fue limitada posiblemente por P y que a través de la mineralización de la materia orgánica incrementó indirectamente las concentraciones del fitoplancton.

A pesar de las adiciones de nutrientes ó materia orgánica en los experimentos, no hubo incremento en las concentraciones de P o de materia orgánica en los sedimentos. Se sugiere que durante el experimento de fertilización inorgánica, la presencia de sedimento y el establecimiento de condiciones adecuadas (altas temperaturas, pH>8, condiciones aeróbicas) favorecieron el crecimiento bacteriano en la interfase agua-sedimento, lo que causó una disminución en la concentración de la materia orgánica en el suelo. Durante el experimento de fertilización orgánica, el ligero incremento de materia orgánica que se observó en el suelo no fue significativo y la materia orgánica adicionada en el sistema a través del alimento, probablemente aprovechada por parte de las bacterias.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, T.J., y R. Palaniappan. 2003. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* 232(1-4):81-90.
- Adrian, R., y B. Schneider-Olt. 1999. Top-down effects of crustacean zooplankton on pelagic microorganisms in a mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 21(11):2175-2190.
- Aguirre Guzmán, G., y F. Ascencio Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Research Development in Microbiology* 4:333-348.
- Alongi, D.L, F. Tirendi, y L.A. Trott. 1999. Rates and pathways of benthic mineralization in extensive shrimp ponds of the Mekong delta, Vietman. *Aquaculture* 175:269-292.
- Alonso-Rodríguez, R., y F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful alga blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 219:317-336.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, y Water Environment Federation. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th Edition. APHA, Washington D.C., EE.UU.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, y Water Environment Federation. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Edition. APHA, Washington D.C., EE.UU.

- Arvola, L., y T. Tulongen. 1998. Effects of allochthonous dissolved organic matter and inorganic nutrients on the growth of bacteria and algae from a highly humic lake. *Environment International* 24(5/6):509-520.
- Arulampalam, P., F.M. Yusoff, M. Shariff, A.T. Law, y P.S.S. Rao. 1998. Water quality and bacterial populations in a tropical marine cage culture farm. *Aquaculture Research* 29:671-624.
- Austin, B. 1995. *Vibrionaceae* representatives as pathogens of penaeid shrimps. Paginas 189-192 *En Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Guayaquil, Ecuador.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176:227-235.
- Avnimelech, Y., N. Mozes, S. Diab, y M. Kochba. 1995. Rates of organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds. *Aquaculture* 134:211-216.
- Baldwin D.S., A.L Mitchell, y G.N. Rees. 1997. Chemistry and Microbial Ecology: Processes at the Micro Scale. Paginas 171-179 *En* N. Klomp y L. Lunt (editores), *Frontiers in Ecology*. Elsevier Science Ltd., Oxford, Inglaterra.
- Bautista, B., R.P. Harris, P.R.G. Tranter, y D. Harbour. 1992. In situ copepod feeding and grazing rates during a spring bloom dominated by *Phaeocystis* sp. in the English Channel. *Journal of Plankton Research* 14:691-703.
- Bayot, B., R. Cedeño, I. Betancourt, F. Panchana, M. Peeters, y F. Echeverria. 2001. Monitoreo epidemiológico en tres piscinas afectadas por el WSSV. *El Mundo Acuícola* 7(1):46-50.
- Bergquist, A.M., S.R. Carpenter, y J.C. Latino. 1985. Shifts in phytoplankton size structure and community composition during grazing by contrasting zooplankton assemblages. *Limnology and Oceanography* 30(5):1037-1045.

- Bhakta, J.N., y B.B. Jana. 2002. Influence of sediment phosphorus on utilization efficiency of phosphate fertilizer: a mesocosm study. *Aquaculture Research* 33:203-215.
- Bíró, P. 1995. Management of pond ecosystems and trophic webs. *Aquaculture* 129:373-386.
- Boyd, C.E. 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, EE.UU.
- Boyd, C.E. 1995. *Bottom Soils, Sediment, and Pond Aquaculture*. Kluwer Academic Publishers, Boston, EE.UU.
- Boyd, C.E. 2001. *Water Quality. An Introduction*. Kluwer Academic Publishers, Ámsterdam, Holanda.
- Boyd, C.E., y P. Munsiri. 1996. Phosphorus adsorption capacity and availability of added phosphorus in soils from aquaculture areas in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* 27(2):160-167.
- Boyd, C.E., y Y. Musig, 1981. Orthophosphate uptake by phytoplankton and sediment. *Aquaculture* 22:165-173.
- Boyd, C.E., y C.S. Tucker. 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Kluwer Academic Publishers, Ámsterdam, Holanda.
- Boyd, C.E., E.E. Prather, y R.W. Parks. 1975. Sudden mortality of a massive phytoplankton bloom. *Weed Science* 23:61-67.
- Bratvold, D., y C.L. Browdy. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats<sup>TM</sup>) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195:81-94.

- Briggs, M., y S. Funge-Smith. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. *Aquaculture and Fisheries Management* 25:789-811.
- Brock, J.A., y K.L. Main. 1995. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Hawaii, EE.UU.
- Burford, M. 1997. Phytoplankton dynamic in shrimp ponds. *Aquaculture Research* 28:351-360.
- Burford, M.A., y P.M. Glibert. 1999. Short-term nitrogen uptake and regeneration in early and late growth phase shrimp ponds. *Aquaculture Research* 30:215-227.
- Burford, M.A., y A.R. Longmore. 2001. High ammonium production from sediments in hypereutrophic shrimp ponds. *Marine Ecology Progress Series* 224:187-195.
- Burford, L.A., P.J. Thompson, R.P. McIntosh, R.H. Bauman, y D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219:393-411.
- Burns, C.W., y M. Schallenberg. 2001. Calanoid copepods versus cladocerans: consumer effects on protozoa in lakes of different trophic status. *Limnology and Oceanography* 46(6):1558-1565.
- Buttino, I. 1994. The effect of low concentrations of phenol and ammonia on egg production rates, fecal pellet production and egg viability of the calanoid copepod *Acartia clausi*. *Marine Biology* 119:629-634.
- Calbet, A., y M.R. Landry. 1999. Mesozooplankton influences on the microbial food web: direct and indirect trophic interactions in the oligotrophic open ocean. *Limnology and Oceanography* 44(6):1370-1380.
- Calbet, A., y M.R. Landry. 2004. Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems. *Limnology and Oceanography* 49(1):51-57.

- Caron, D.A. 1984. The role of heterotrophic microflagellates in plankton communities. Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology and Woods Hole Oceanographic Institute, Joint Program in Biological Oceanography, Massachusetts, EE.UU.
- Castillo, M.M., G.W. Kling, y J.D. Allan. 2003. Bottom-up controls on bacterial production in tropical lowland rivers. *Limnology and Oceanography* 48(4):1466-1475.
- Chamberlain, G.W. 1997. Sustainability of World Shrimp Farming. *En* E.K. Pikitch, D.D. Huppert y LP. Sissenwine (editores), *Global Trends: Fisheries Management*. American Fisheries Society Symposium 20, Massachusetts, EE.UU.
- Cherrier, J., J.E. Bauer, E.R.L. Druffel, R.B. Coffin, y J.P. Chanton. 1999. Radiocarbon in marine bacteria: evidence for the ages of assimilated carbon. *Limnology and Oceanography* 44(3):730-736.
- Chien, S.N., S.L. Huang, y G.H. Kuo. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infection in cultured giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Taiwan. Páginas 196-205 *En* W. Flux y K.L. Main (editores), *Diseases of Cultured Penaeus Shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, Hawaii, EE.UU.
- Chong, V.C., y A. Sasekumar. 1981. Food and feeding habits of the white prawn *Penaeus merguensis*. *Marine Ecology Progress Series* 5:185-191.
- Chróst, R.J. 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. Páginas 29-59 *En* R.J. Chróst (editor), *Microbial Enzymes in Aquatics Environments*. Springer-Verlag, New York, EE.UU.
- Church, M.J., D.A. Hutchins, y H.W. Ducklow. 2000. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the southern ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):455-466.

- Cocke, E. 1967. *The Myxophyceae of North Carolina*. Edwards Brothers, Inc., Michigan, EE.UU.
- Cole, J.J., S. Findlay, y M.L. Pace. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43:1-10.
- Colwell, R.R. 1984. *Vibrios in the Environment*. John Wiley & Sons, Inc. New York, EE.UU.
- Colwell, R.R. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274:2025-2031.
- Coman, F.E., R.M. Connolly, y N.P. Preston. 2003. Zooplankton and epibentic fauna in shrimp ponds: factors influencing assemblage dynamics. *Aquaculture Research* 34:359-371.
- Conde-Porcuna, J.M., E. Ramos-Rodríguez, y C. Pérez-Martínez. 2002. Correlations between nutrient concentrations and zooplankton populations in a mesotrophic reservoir. *Freshwater Biology* 47:1463-1473.
- Cottingham, K.L., S.E. Knight, S.R. Carpenter, J.J. Cole, M.L. Pace, y A.E. Wagner. 1997. Response of phytoplankton and bacteria to nutrients and zooplankton: a mesocosm experiment. *Journal of Plankton Research* 19(8):995-1010.
- Cowan, V.J., K. Lorenze, y S.J. Funge-Smith. 1999. Impact of culture intensity and monsoon season on water quality in Thai commercial shrimp ponds. *Aquaculture Research* 30:123-133.
- Currie, D.J., y J. Kalff. 1984. Can bacteria outcompete phytoplankton for phosphorus? A chemostat test. *Microbial Ecology* 10:205-216
- Daniels, H., y C.E. Boyd. 1993. Nitrogen, phosphorus and silica fertilization of brackish water ponds. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 8:103-110.

- Dawidowicz, P. 1990. Effectiveness of phytoplankton control by large-bodied and small-bodied zooplankton. *Hydrobiologia* 200/201:43-47.
- Devaraja T.N., F.M. Yusoff, y M. Shariff. 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture* 206:245-256.
- Direkbusarakom, S., M. Yoshimizu, Y. Ezura, L., Ruangpan, y Y. Danayadol. 1998. *Vibrio* spp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *Journal of Marine Biotechnology* 6:266-267.
- Duarte, C., S. Agusti, y D.E. Canfield. 1992. Patterns in phytoplankton community structure in Florida lakes. *Limnology and Oceanography* 37(1):155-161.
- Elser, J.J., y C.R. Goldman. 1990. Experimental separation of the direct and indirect effects of herbivorous zooplankton on phytoplankton in a subalpine lake. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 24:493-498.
- Flegel, T. 1996. A turning point for sustainable aquaculture: the white spot virus crisis in Asian shrimp culture. *Aquaculture Asia*: 29-34.
- Focken, U., A. Groth, R.M. Coloso, y K. Becker. 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture* 164:105-116.
- Fraga, F. 2001. Phytoplanktonic biomass synthesis: application to deviations from Redfield stoichiometry. *Scientia Marina* 65(2):153-169.
- Funge-Smith, S.J., y M.R.P. Briggs. 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture* 164:117-133.

- Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda, y C. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research* 34:1403-1411.
- Gasol, J.M., M. Comerma, J.C. García, J. Armengol, E.O. Casamayor, P. Kojacká, y K. Simek. 2002. A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography* 47(1):62-77.
- Gómez-Gil, B., L. Tron-Mayén, A. Roque, J.F. Turnbull, V. Inglis, y A.L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- Goldman, J.C., D.A. Caron, y L.R. Dennet. 1987. Regulation of the gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography* 32:1239-1252.
- Golterman, H.L. 1995. The labyrinth of nutrient cycles and buffers in wetlands, results based on research in the Camargue (Southern France). *Hydrobiologia* 315:39-58.
- Grigorszky, I., S. Nagy, A. Tóth, C. Máthé, Z. Müller, y G. Borbély. 1998. Effect of large- and of small-bodied zooplankton on phytoplankton in a eutrophic oxbow. *Journal of Plankton Research* 20(10):1989-1995.
- Gross, A., C.E. Boyd, y C.W. Wood. 2000. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. *Aquacultural Engineering* 24:1-14.
- Haney, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21:467-475.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166:181-212.

- Hargreaves, J.A., y C.S. Tucker. 1996. Evidence for control of water quality in channel catfish *Ictalurus punctatus* ponds by phytoplankton biomass and sediment oxygenation. *Journal of the World Aquaculture Society* 27:21-29.
- Hargreaves, J.A., y C.S. Tucker. 2003. Defining loading limits of static ponds for catfish aquaculture. *Aquacultural Engineering* 28:47-63.
- Havens, K.E. 1998. Size structure and energetics in a plankton food web. *Oikos* 81:346-358.
- Havskum, H., T.F. Thingstad, R. Scharek, F. Peters, E. Berdalet, M.M. Sala, M. Alcaraz, J.C. Bangsholt, U.L. Zweifel, A Hagström, M. Perez, y J.R. Dolan. 2003. Silicate and labile DOC interfere in structuring the microbial food web via algal—bacterial competition for mineral nutrients: Results of a mesocosm experiment. *Limnology and Oceanography* 48(1):129-140.
- Hopkins, J.S., P.A. Sandifer, y C.L. Browdy. 1994. Sludge management in intensive pond culture of shrimp: effect of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp production. *Aquacultural Engineering* 13:11-30.
- Hulot, F.D., P.J. Morin, y M. Loreau. 2001. Interactions between algae and the microbial loop in experimental microcosms. *Oikos* 95:231-238.
- Jackson, C., N. Preston, P.J. Thompson, y M. Burford. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture* 218:397-411.
- Jana, B.B, y S.K. Roy. 1985. Distribution patterns of protein mineralizing and ammonifying bacterial populations in fish farming ponds under different management systems. *Aquaculture* 44:57-65.

- Jana, B.B., P. Chakraborty, J.K. Biswas, y S. Ganguly. 2001. Biogeochemical cycling bacteria as indices of pond fertilization: importance of CNP ratios of input fertilizers. *Journal of Applied Microbiology* 90:733-740.
- Jiménez, R. 1983. Diatomeas y Silicoflagelados del Fitoplancton del Golfo de Guayaquil. *Acta Oceanográfica del Pacífico, Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador (INOCAR)*, 2(2), Guayaquil, Ecuador.
- Kassila, J. 2003. Effects of lining and drying on the chemical composition of sediments and influence of organic carbon on carp growth in aquaculture ponds. *Aquaculture Research* 34:333-343.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren, y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.
- Kristensen, E., S.I. Ahmed, y A.H. Devol. 1995. Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: which is fastest? *Limnology and Oceanography* 40(8):1430-1437.
- Lampert, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21:483-490.
- Lavilla-Pitogo, E., M. Leñaño, y M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture* 164:337-349.
- Lightner, D.V. 1978. Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32:139-150.
- Lightner, D.V. 1992. Shrimp pathology: major diseases of concern to the farming industry in the Americas. Paginas 177-195 *En Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Guayaquil, Ecuador.

- Martin, J.-L.M., Y. Veran, O. Guelorget, y D. Pham. 1998. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. *Aquaculture* 164:135-149.
- Martinez-Cordova, L.R., L.A. Porchas-Cornejo, H. Villarreal-Colemnares, J.A. Calderon-Perez, y J. Naranjo-Paramo. 1998a. Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. *Aquacultural Engineering* 17:21-28
- Martinez-Cordova, L.R., L.A. Porchas-Cornejo, H. Villarreal-Colmenares, J.A. Calderon-Perez. 1998b. Evaluation of three feeding practices on the winter culture of yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* (Holmes), in low water exchange ponds. *Aquaculture Research* 29:573-578.
- Martinez-Córdova, L.R., A. Campaña-Torres, y M.A. Porchas-Cornejo. 2002. Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquaculture Research* 33:27-32.
- Masuda, K., y C.E. Boyd. 1994. Phosphorus fractions in soil and water of aquaculture ponds built on clayey ultisols at Auburn, Alabama. *Journal of the World Aquaculture Society* 25(3):379-395.
- McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz, y A. Horowitz. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering* 21:215-227.
- Medina-Sánchez, J.M., M. Villar-Argaiz, y P. Carrillo. 2002. Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshwater Biology* 47:2191-2204.

- Midlen, A., y T.A. Redding. 1998. Environmental Management for Aquaculture. Aquaculture Series 2, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Monserrate, M.E. 2003. Efecto de diferentes regímenes de fertilización sobre la relación fitoplancton-bacterioplancton en mesocosmos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Montanari, M.P., C. Pruzzo, L. Pane, y R.R. Colwell. 1999. Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). FEMS Microbiology Ecology 29:241-247.
- Nagata, T. 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. Páginas 121-152 En D.L. Kirchman (editor), Microbial Ecology of the Oceans. John Wiley & Sons, Inc., New York, EE.UU.
- Nejstgaard, J.C., B. H. Hygum, L.-J. Naustvoll, y U. Bamstedt. 2001. Zooplankton growth, diet and reproductive success compared in simultaneous diatom- and flagellate-microzooplankton-dominated plankton blooms. Marine Ecology Progress Series 221:77-91.
- Nunes, A.J.P., T.C.V. Gesteira, y S. Goddard. 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. Aquaculture 149:121-136.
- Olsen, S.R., y L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. . Páginas 403-430 En A.L. Page, R.H. Miller, y D.R. Keeney (editors), Methods of Soil Analysis. Part 2 – Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Number 9 (Part 2) in the series Agronomy, Wisconsin, EE.UU.

- Paerl, H.W. 2000. Marine Plankton. Páginas 121-148 *En* B. Whitton y P. Malcolms (editores), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holanda.
- Paerl, H.W., y C.S. Tucker. 1995. Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(2):109-131.
- Paerl, H.W., B. Bebout, y L. Prufert. 1989. Bacterial associations with marine *Oscillatoria* sp. (*Trichodesmium* sp.) populations: ecophysiological implications. *Journal of Phycology* 25:773-784.
- Pasharawipas, T., S. Sriurairatana, S. Direkbusarakom, Y. Donayadol, S. Thaikua, L. Ruangpan, y T.W. Flegel 1998. Luminous *Vibrio harveyi* associated with tea brown gill syndrome in black tiger shrimp. Páginas 213-216 *En* T.W. Flegel (editos), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Tailandia.
- Pechar, L. 1987. Use of an acetone:metanol mixture for the extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll-a in phytoplankton. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 78:99-117.
- Pérez-Linares, J., M. Cadena, C. Rangel, M.-L. Unzueta-Bustamante, y J.-L. Ochoa. 2003. Effect of *Schizothrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture* 218:55-65.
- Pinckney, J.L., H.W. Paerl, P. Tester, y T.L. Richardson. 2001. The role of nutrient loading and eutrophication in estuarine ecology. *Environmental Health Perspectives* 109(5):699-706.
- Pla, L. 1986. *Análisis Multivariado: Métodos de Componentes Principales*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, D.C., EE.UU.

- Powlson, D.S. 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use and Management* 9(3): 86-94.
- Prayitno, S.B., y J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132:105-112.
- Preston, N.P., F.E. Coman, y V.M. Fry. 2003. Shrimp pond zooplankton dynamics and the efficiency of sampling effort. *Aquaculture Research* 34:373-381.
- Ravera, O., y S. Scotto. 1999. A sampler-incubator for studying zooplankton grazing and phytoplankton production. *Journal Limnology* 58(1):49-57.
- Reynolds, C.S., y A.E. Walsby. 1975. Water blooms. *Biological Review* 50:437-481.
- Richardot, M., D. Debroas, A. Thouvenot, D. Sargos, J.L. Berthon, y J. Dévaux. 2001. Influence of cladoceran grazing activity on dissolved organic matter, enzymatic hydrolysis and bacterial growth. *Journal of Plankton Research* 23(11):1249-1261.
- Ritvo, G., J. Dixon, A.L. Lawrence, T.M. Samocha, W. Niell, y L. Speed. 1998. Accumulation of chemical elements in Texas shrimp ponds solids. *Journal of the World Aquaculture Society* 29(4):422-431.
- Rodrigues, R.M.N.V., y P.J. le B. Williams. 2001. Heterotrophic bacterial utilization of nitrogenous and non-nitrogenous substrates, determined from ammonia and oxygen fluxes. *Limnology and Oceanography* 46(7):1675-1683.
- Salomon, P.S., S. Janson, y E. Granéli. 2003. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae* 2:261-272.
- Samuelsson, K. 2003. Mechanisms structuring the pelagic microbial food web – Importance of resources and predation. Doctoral Dissertation, Umea University, Suecia.

- Santacruz Reyes, R., C. Velásquez López, y P. Reyes Nieto. 2003. Fósforo en estanques de cultivo de camarón: acumulación en sedimentos y disponibilidad de fósforo reactivo en la columna de agua. CIVA 2003, II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, [www.civa2003.org](http://www.civa2003.org), 141-153.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, y D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191:133-144.
- Shrestha, M.K., y C.K. Lin. 1996a. Phosphorus fertilization strategy in fish ponds based on sediment phosphorus saturation level. *Aquaculture* 142:207-219.
- Shrestha, M.K., y C.K. Lin. 1996b. Determination of phosphorus saturation level in relation to clay content in formulated pond muds. *Aquacultural Engineering* 15(6):441-459.
- Smith, H.V. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221:669-671.
- Smith, P.T. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). *Toxicon* 24(4): 857-869.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by phenol-hypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14:799-801.
- Sommaruga, R. 1995. Microbial and classical food webs: A visit to a hypertrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 17:257-270.
- Sommer, U., F. Sommer, B. Santer, C. Jamieson, M. Boersma, C. Becker, y T. Hansen. 2001. Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. *Ecology Letters* 4:545-550.
- Sonnenholzner, S., y C.E. Boyd. 2000. Chemical and physical properties of shrimp pond bottom soils in Ecuador. *Journal of the World Aquaculture Society* 31(3):358-375.

- Strauss, E.A., y G.A. Lamberti. 2002. Effect of dissolved organic carbon quality on microbial decomposition and nitrification rates in stream sediments. *Freshwater Biology* 47:65-74.
- Subas, S. 1994. *Applied Multivariate Techniques*. Johniley and Sons Inc., New York, EE.UU.
- Sung, H.-H., H.-C. Li, F.-M. Tsai, Y.-Y. Ting y W.-L. Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 236:261-271.
- Sung, H.-H., S.-F. Hsu, C.-K. Chen, Y.-Y. Ting, y W.-L. Chao. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* 192:101-110.
- Tacon, A.G.J., J.J. Cody, L.D. Conquest, S. Divakaran, I.P. Forster, y O.E. Decamp. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8:121-137.
- Tamplin, L.L., A.L. Gauzens, A. Huq, D.A. Sack, y R.R. Colwell. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Applied Environmental Microbiology* 56:1977-1980.
- Teichert-Coddington, D.R., D. Martinez, y E. Ramírez. 2000. Partial nutrient budgets for semi-intensive shrimp farms in Honduras. *Aquaculture* 190:139-154.
- Tezuka, Y. 1990. Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology* 19:227-238.

- Tilman, D., R. Kiesling, R. Sterner, S. Kilham, y F.A. Jonson. 1986. Green, bluegreen, and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorous, silicon and nitrogen. *Archive of Hydrobiology* 106(4):473-485.
- Tilzer, M.M. 1987. Light-dependence of photosynthesis and growth in Cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21:401-412.
- Tomas, C.R. 1997. *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, California, EE.UU.
- Tucker, C.S., y M. van der Ploeg. 1993. Seasonal changes in water quality in commercial channel catfish ponds in Mississippi. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:473-481.
- Tucker, C.S., S.W. Lloyd, y R.L. Busch. 1984. Relationships between phytoplankton periodicity and the concentrations of total and unionized ammonia in channel catfish ponds. *Hydrobiologia* 111:75-79.
- Tungaraza, C., N. Brion, V. Rousseau, W. Baeyens, y L. Goeyens. 2003. Influence of bacterial activities on nitrogen uptake rates determined by the application of antibiotics. *Oceanologia* 45(3):473-489.
- Vadstein, O., L.M. Olsen, A. Busch, T. Andersen, y H.R. Reinertsen. 2003. Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited systems? A microcosm study. *FEMS Microbiology Ecology* 46:307-316.
- van Liere, L., y L.R. Mur. 1980. Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. *Developments in Hydrobiology* 2:67-77.

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

Zimba, P.V., y C.C. Grimm. 2003. A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) production ponds. *Aquaculture* 218:81-87.

- Vörös, L., K. V.-Balogh, E. Koncz, y A. Kovács. 2003. Phytoplankton and bacterioplankton production in a reed-covered water body. *Aquatic Botany* 77:99-110.
- Vrba, J. J. Nedoma, K. Simek, y J. Seda. 1992. Microbial decomposition of polymer organic matter related to plankton development in a reservoir: activity of  $\alpha$ -,  $\beta$ -glucosidase, and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine. *Archiv für Hydrobiologie* 126:193-211.
- Vrede, K., T. Vrede, A. Isaksson, y A. Karlsson. 1999. Effects of nutrients (phosphorous, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton—a seasonal study. *Limnology and Oceanography* 44(7):1616-1624.
- Walker, H.L., y L.R. Higginbotham. 2000. An aquatic bacterium that lyses cyanobacteria associated with off-flavor of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biological Control* 18:71-78.
- Wellsbury, P, R.A. Herbert, y R.J. Parkes. 1996. Bacterial activity and production in near-surface estuarine and freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 19:203-214.
- White, D. 1986. *Biological Principles of Ponds Culture: Sediment and Benthos*. Paginas 15-19 En E. Lannan, R. Oneal, y G. Tchobanoglous (editores), *Principles and Practices of Pond Aquaculture*. Oregon State University Press, Oregon, EE.UU.
- Wickham, S.A. 1998. The direct and indirect impact of *Daphnia* and *Cyclops* on a freshwater microbial food web. *Journal of Plankton Research* 20:739-755.
- Yamaji, I. 1973. *Illustrations of the Marine Plankton of Japan*. Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japón.
- Yusoff, F.M., y C.D. McNabb. 1997. The effects of phosphorus and nitrogen on phytoplankton dominance in tropical fish ponds. *Aquaculture Research* 28:591-597.

## ANEXO 1

Tabla resumen de las transformaciones realizadas sobre cada variable para cumplir con la asunción de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), durante los análisis de varianza (ANOVA, medidas repetidas). “Sin Transformación” indica que no hubo necesidad de transformación y “\*” que se realizó un análisis no paramétrico vía la prueba de Kruskal Wallis con rangos múltiples.

Variable	Transformación realizada		
	Exp. inorgánico	Exp. orgánico	Inorgánica vs. orgánica
Clorofila <i>a</i>	*	*	*
Conteos totales fitoplancton	$\text{Log}_{10} x$	$\text{Log}_{10} x$	*
Cianobacterias	$\text{Log}_{10} x$	$\text{Log}_{10} x$	*
<i>Aphanotece</i> spp.	$\text{Log}_{10} (x+1)$	$\sqrt{x+0,375}$	*
<i>Synechococcus</i> spp.	$\text{Log}_{10} (x)$	$\text{Log}_{10} (x+1)$	*
<i>Oscillatoria</i> spp.	$\text{Log}_{10} (x+1)$	$\sqrt{x+0,375}$	*
<i>Spirulina</i> spp.	$\text{Log}_{10} (x+1)$	Sin Transformación	*
Diatomeas	$\text{Log}_{10} (x+1)$	$\text{Log}_{10} (x+1)$	*
Diatomeas pennales	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
Diatomeas centrales	$1/(x+1)$	$1/(x+1)$	*
<i>Nitzschia</i> spp.	$1/\sqrt{x+1}$	Sin Transformación	*
Flagelados	Sin Transformación	Sin Transformación	*
Conteos totales zooplancton	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
Rotíferos	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
<i>Brachionus</i> spp.	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
<i>Colurella</i> spp.	*	*	*
<i>Proales</i> spp.	Sin Transformación	$\text{Log}_{10} (x+1)$	*
Nauplios de copépodos	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
Copépodos adultos	$\sqrt{x+0,5}$	Sin Transformación	*
Tintínidos	Sin Transformación	$\sqrt{x+0,375}$	*
Bacteria total	$\text{Log}_{10} x$	$\text{Log}_{10} x$	*
<i>Vibrio</i> spp	$\text{Log}_{10} (x+1)$	$\text{Log}_{10} (x+1)$	*
SRP	*	*	*
TAN	*	*	*
DN	$1/\sqrt{x}$	$1/\sqrt{x}$	*
TS	Sin Transformación	$\text{Log}_{10} x$	*
TIM	Sin Transformación	Sin Transformación	*
TOM	Sin Transformación	Sin Transformación	*
TDS	Sin Transformación	$\text{Log}_{10} x$	*
DIM	Sin Transformación	Sin Transformación	*
DOM	Sin Transformación	Sin Transformación	*
TSS	$1/\sqrt{x}$	Sin Transformación	*
PIM	$1/\sqrt{x}$	$\text{Log}_{10} x$	*
POM	$1/\sqrt{x}$	Sin Transformación	*

## ANEXO 2

Ecuaciones de regresión múltiple con variables transformadas obtenidas durante el experimento de fertilización inorgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados.

Regresión	p	r <sup>2</sup>
$Y(\text{Log } \textit{Clorofila } a) = 1,930 - 0,717 (1/\sqrt{DN}) - 0,359 (\text{Log } TAN) + 0,141 (N_f) + 0,000086 (\textit{Zooplancton}) - 0,000011 (TDS)$	<0,01	62%
$Y(\text{Log } \textit{Bacterias } \textit{totales}) = 3,850 + 0,434(\sqrt{SRP} + \sqrt{SRP + 1}) + 0,069 (\text{Log } \textit{Clorofila } a) + 0,032 (N_f) - 0,000021 (DOM)$	<0,01	36%
$Y(\textit{Vibrio } \textit{spp.}) = - 19,332 + 117,016 (1/\sqrt{DN}) - 0,037 (\textit{Zooplancton})$	<0,01	10%

Ecuaciones de regresión múltiple con variables transformadas obtenidas durante el experimento de fertilización orgánica con sus respectivos coeficientes de determinación ajustados.

Regresión	p	r <sup>2</sup>
$Y(\text{Log } (\textit{Clorofila } a + 1)) = 0,964 + 3,029 (TAN) + 0,687 (P_a) - 0,281(1/\sqrt{DN}) + 0,014 (N_a) + 0,006 (\sqrt{\textit{Vibrio} + 0,375}) + 0,004 (\sqrt{\textit{Zooplancton} + 0,375}) + 0,000013 (TDS)$	<0,01	56%
$Y(\text{Log } \textit{Bacterias } \textit{totales}) = 4,562 - 11,281 (SRP) + 0,536 (P_a) - 0,005 (\sqrt{\textit{Vibrio} + 0,375}) + 0,003 (\sqrt{\textit{Zooplancton} + 0,375}) + 0,00001 (TDS) + 0,00001 (DOM)$	<0,01	31%
$Y(\sqrt{\textit{Vibrio} + 0,375}) = 29,100 - 36,264 (TAN) + 10,029 (P_a) - 4,208 (\text{Log } \textit{Bacterias}) + 2,532 (\text{Log } (\textit{Clorofila } a + 1)) - 0,0002 (TDS)$	<0,01	21%