



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARA MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PROGRAMA REGIONAL DE POSGRADO EN ACUACULTURA

CRECIMIENTO Y PERFIL PIGMENTARIO DE *Chaetoceros muelleri*  
(Bacillariophyceae), DURANTE TRES ESTACIONES DEL AÑO,  
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO Y AL EXTERIOR



que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS, con especialidad en cultivo de crustáceos  
presenta:

**GRISELDA FRANCISCA GALLEGOS SIMENTAL**

Hermosillo, Sonora, México.

Octubre de 1997.

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## RESUMEN.

Se evaluó la producción de biomasa y el perfil pigmentario de la microalga marina *Chaetoceros muelleri* en cultivos masivos de 300 y 3000 litros, en el laboratorio del CREMES en Bahía de Kino, Sonora, México durante las estaciones de verano, invierno y primavera, comparando la producción de los cultivos al interior; bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con los del exterior, los cuales estaban sujetos a los cambios medioambientales.

Se obtuvieron registros de la incidencia de luz diaria acumulada. Las lecturas de la temperatura, el pH y el crecimiento de los cultivos, así como las muestras para los análisis de peso seco y pigmentos fueron tomadas cada 6 horas. Los cultivos se mantuvieron hasta las 48 horas (columnas y tanques), tiempo en el cual una columna se cosechaba, una segunda columna servía como inóculo para un tanque y una más se mantenía para ser monitoreada a las 60 y 72 horas, como referencia del comportamiento de los cultivos.

En general, los mejores crecimientos son obtenidos en los cultivos al exterior para ambos sistemas (columna y tanque), sólo que durante el invierno la presencia de bajas temperaturas llegan a retardar el crecimiento. La mayor producción de número de células por ml a las 48 hrs fue obtenido durante la primavera con  $4.939 \times 10^6$  cel/ml, en el sistema columnas. Los cultivos de 300 litros fueron los más productivos en todos los experimentos.

Las mayores tasas de duplicación fueron observadas a las 24 hrs de cultivo, invariablemente de la estación climática, condición y sistema de cultivo.

El peso seco se mostró mayor en el verano y la primavera para los cultivos al exterior, en ambos sistemas.

En el verano y la primavera los porcentajes en base a peso seco de la clorofila "a" fueron mayores en los cultivos en columnas al exterior, aun cuando se registraron altas incidencias de luz en ambas estaciones. La clorofila "c" muestra un comportamiento similar al de clorofila "a", pero en menores proporciones y sus mayores valores son observados al interior en invierno. Los valores de carotenos en el verano se mostraron altos para los cultivos al exterior, probablemente como protectores de la clorofila "a" contra las altas incidencias de luz.

# TABLA DE CONTENIDO.

	Página
RESUMEN.	I
ÍNDICE DE FIGURAS.	V
ÍNDICE DE TABLAS.	VII
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. OBJETIVOS.	4
II.1. Objetivo General.	4
II.2. Objetivos Específicos.	4
III. ANTECEDENTES.	5
III.1. Microalgas.	5
III.1.1. Generalidades.	5
III.1.2. Importancia.	6
III.1.3. Descripción de la Microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> .	7
III.2. Factores que Afectan el Crecimiento del Fitoplancton.	9
III.2.1. Luz.	10
III.2.2. Adaptación a la Luz y a la Sombra.	10
III.2.3. La Intensidad de la Luz.	15
III.2.4. La Composición Espectral de la Luz.	16
III.2.5. Temperatura.	17
III.3. Cultivos Masivos de Microalgas al Exterior.	19
III.4. Costos de Producción de Cultivos de Microalgas.	21

	Página
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>26</b>
<b>IV.1. Selección de la Microalga.</b>	<b>26</b>
<b>IV.2. Área de Experimentación.</b>	<b>26</b>
<b>IV.3. Diseño Experimental.</b>	<b>27</b>
<b>IV.4. Medición de la Biomasa.</b>	<b>30</b>
IV.4.1. Conteo Celular.	30
IV.4.2. Biomasa en Base Seca.	31
IV.4.2.1. Peso Seco.	32
<b>IV.5. Determinación de Pigmentos.</b>	<b>32</b>
<b>IV.6. Pruebas Estadísticas.</b>	<b>33</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>V.1. Biomasa.</b>	<b>34</b>
V.1.1. Columnas.	34
V.1.1.1. Verano.	34
V.1.1.2. Invierno.	39
V.1.1.3. Primavera.	45
V.1.1.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.	50
V.1.1.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.	53
V.1.2. Tanques.	56
V.1.2.1. Verano.	56
V.1.2.2. Invierno.	59
V.1.2.3. Primavera.	63
V.1.2.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.	67
V.1.2.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.	69
V.1.3. Comparaciones Generales de Biomasa en Columnas y Tanques.	71
<b>V.2. Pigmentos.</b>	<b>75</b>
V.2.1. Comparación de Solventes.	75
V.2.2. En Base a Peso Seco (%).	76
V.2.2.1. Columnas.	76
V.2.2.1.1. Verano.	76
V.2.2.1.2. Invierno.	77

## Continuación...

	<b>Página</b>
V.2.2.1.3. Primavera.	81
V.2.2.1.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.	83
V.2.2.1.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.	85
V.2.2.2. Tanques.	87
V.2.2.2.1. Verano.	87
V.2.2.2.2 Invierno.	89
V.2.2.2.3. Primavera.	91
V.2.2.2.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.	93
V.2.2.2.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.	95
V.2.3. Comparaciones Generales de Pigmentos en Columnas y Tanques.	97
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>100</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.</b>	<b>103</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>126</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
1. Curvas de F comparadas con I para células adaptadas a la sombra (línea continua) y al sol (línea punteada) expresadas como: fotosíntesis por célula, <i>a</i> ) y fotosíntesis por unidad de clorofila <i>b</i> ).	14
2. Concentración celular promedio de cultivos en columnas para <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de verano.	35
3. Cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> en verano, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco.	36
4. Concentración celular promedio de cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de invierno.	41
5. Cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> en invierno, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso.	43
6. Concentración celular promedio de cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de primavera	46
7. Cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> en primavera, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco.	47
8. Concentración celular promedio de cultivo en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de verano.	57
9. Cultivos en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> en verano, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco.	58
10. Concentración celular promedio de cultivos en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de invierno.	60
11. Cultivos en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> en invierno, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco.	61
12. Concentración celular promedio de cultivos en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de primavera.	65
13. Cultivos en tanques de <i>Chaetoceros muelleri</i> en primavera, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco.	66
14. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas para la estación de verano.	78
15. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas para la estación de invierno.	80
16. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas para la estación de primavera.	82

Continuación...

Figura	Página
17. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques para la estación de verano.	88
18. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques para la estación de invierno.	90
19. Promedio de pigmentos en cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques para la estación de primavera	92



## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Costo de producción de microalgas (peso/ton).	23
2. Estimación para los costos de producción de microalgas en Corporación de Investigación Acuacultural para 1983.	24
3. Constituyentes de la solución madre para el medio F.	29
4. Intensidad luminosa registrada para verano durante los cultivos en columna.	38
5. Concentración celular a las 48 hrs (célX10 <sup>6</sup> /ml), tasas de duplicación (div/día) y peso seco (g/l) para cultivos al exterior de <i>Chaetoceros muelleri</i> para la estación de invierno.	40
6. Intensidad luminosa registrada para invierno durante los cultivos en columna.	44
7. Intensidad luminosa registrada para primavera durante los cultivos en columna.	49
8. Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10 <sup>6</sup> /ml) y tasas de duplicación (divisiones/día) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas con respecto a las estaciones climáticas.	51
9. Peso seco promedio de los cultivos en columnas de <i>Chaetoceros muelleri</i> para las distintas estaciones climáticas.	52
10. Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10 <sup>6</sup> /ml) y tasas de duplicación (divisiones/día) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas con respecto a las condiciones de cultivo.	54
11. Peso seco promedio de cultivos en columnas a las 48 hrs de <i>Chaetoceros muelleri</i> para las dos condiciones de cultivo en las tres estaciones climáticas.	55
12. Intensidad luminosa registrada para verano durante los cultivos en tanques.	59
13. Intensidad luminosa registrada para invierno durante los cultivos en tanques.	63
14. Intensidad luminosa registrada para primavera durante los cultivos en tanques.	64
15. Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10 <sup>6</sup> /ml), tasas de duplicación (divisiones/día) y peso seco para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques con respecto a las estaciones climáticas.	68
16. Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10 <sup>6</sup> /ml), tasas de duplicación (divisiones/día) y peso seco para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques con respecto a la condición de cultivo.	70
17. Comparación en base a mg/m <sup>3</sup> de clorofila "a".	76

## Continuación...

Tabla	Página
18. Concentración promedio de clorofila "a", "c" y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas a las 48 hrs con respecto a las estaciones climáticas.	84
19. Concentración promedio de clorofila "a", "c" y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en columnas a las 48 hrs con respecto a las condiciones de cultivo.	86
20. Concentración promedio de clorofila "a", "c" y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques a las 48 hrs con respecto a las estaciones climáticas.	94
21. Concentración promedio de clorofila "a", "c" y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> en tanques a las 48 hrs con respecto a las condiciones de cultivo.	96

# I. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad el estudio de las microalgas marinas ha adquirido gran importancia para la acuicultura de moluscos y crustáceos (Claus, 1981; Donaldson, 1991; López-Muñoz *et al.*, 1992), dado que constituyen la base de la cadena trófica en los ambientes acuáticos donde se cultivan los organismos de importancia económica, cuya sobrevivencia y crecimiento están sujetos a la disponibilidad de alimento del ecosistema donde se desarrollan (Margalef, 1972). Además, constituyen la principal o la única dieta de la mayoría de los estadios larvarios de estos organismos (Coutteau y Sorgeloos, 1992), que es necesario cultivar en números siempre mayores para hacer frente a la creciente demanda de juveniles para su siembra y engorda.

El crecimiento de las poblaciones microalgales depende de múltiples factores entre los que destacan por su importancia: la luz y la temperatura. La luz, además de su papel primario en la fotosíntesis, puede actuar modificando los requerimientos de desarrollo para cada una de las diferentes especies microalgales. Las variaciones en la disponibilidad e intensidad de la energía luminosa están acompañadas de variaciones en la tasa de crecimiento, volumen celular, actividad enzimática y composición bioquímica (Falkowski y Owens, 1980; Brand y Guillard, 1981; Coper, 1982; Redaije y Laws, 1983; Hervé-Claustre, 1987; Brown *et al.*, 1993).

La temperatura es otro parámetro fundamental que tiene gran influencia sobre el crecimiento, la fotosíntesis, la posibilidad de cambios metabólicos y de la composición bioquímica de las microalgas (Jorgensen, 1968; Goldman, 1977; Nelson *et al.*, 1992). Estos factores están estrechamente relacionados y sus interacciones son muy marcadas. Por ejemplo, a mayores temperaturas las microalgas toleran intensidades de luz mucho más altas que a temperaturas inferiores (Nelson *et al.*, 1992), existiendo para cada temperatura una tasa máxima de crecimiento asociada a una intensidad óptima de luz (López-Muñoz *et al.*, 1992).

De todos los factores que controlan el crecimiento de las microalgas en condiciones naturales, la luz y la temperatura son los que presentan mayores variaciones, tanto diarias como estacionales, de forma tal que el éxito ecológico de cada especie depende de su capacidad de modificar sus respuestas fisiológicas para adaptarse a los cambios medioambientales.

Uno de los mayores problemas en la acuicultura marina es la producción de cantidades suficientes de microalgas, que sirvan como alimento vivo para el segundo eslabón de la cadena alimenticia (Witt *et al.*, 1980), que en este caso comprende las larvas de los organismos de interés comercial que son el objetivo de la acuicultura, además de varios consumidores secundarios como *Artemia* sp., rotíferos y copépodos, entre otros (De Pauw y Persoone, 1988), que sirven como alimento para estadios larvarios o juveniles de estos mismos organismos. Por este motivo muchos criaderos de larvas han optado por utilizar tanques de grandes volúmenes para la producción masiva de microalgas, aunque esto implica costos importantes (Walsh *et al.*, 1987; Coutteau y Sorgeloos, 1992; Samonte *et al.*, 1993) por el gasto que

implica el mantenimiento de un clima artificial, adecuado para el crecimiento de estas microalgas.

Con base en lo anterior, ha sido importante la experiencia de llevar a cabo cultivos masivos de microalgas al exterior, en volúmenes adecuados a los requerimientos de las granjas productoras de juveniles de moluscos, crustáceos y peces, que puedan soportar las condiciones medio ambientales y a la vez tener una buena producción en cuanto a biomasa durante todas o algunas de las estaciones del año, ya que con el solo costo de inversión se puede tener un mayor número de tanques para el cultivo, por lo cual disminuyen los costos de producción (Nelson *et al.*, 1992).

En el presente trabajo de investigación se estudiaron las posibles diferencias en la producción de biomasa y del perfil pigmentario de la diatomea *Chaetoceros muelleri* cultivada en forma masiva en el laboratorio y al exterior, en tres diferentes estaciones climáticas del año en Bahía Kino, Sonora.

## **II. OBJETIVOS.**

### **II.1. Objetivo General.**

Detectar el efecto conjunto de luz y temperatura sobre la producción de biomasa y el perfil pigmentario de *Chaetoceros muelleri*, en cultivos masivos al exterior, en situaciones estacionales diferentes.

### **II.2. Objetivos Específicos.**

Describir el crecimiento en términos de número de células y de biomasa de *Chaetoceros muelleri* en cultivos masivos bajo condiciones controladas de laboratorio y al exterior, durante verano, invierno y primavera.

Establecer el perfil pigmentario de la microalga en cultivos masivos, bajo las condiciones antes mencionadas.

Determinar la eficiencia de extracción pigmentaria con acetona y utilizando dimetilsulfóxido (DMSO).

## III. ANTECEDENTES.

### III.1. Microalgas.

#### III.1.1. Generalidades.

El fitoplancton (plancton autótrofo) consta principalmente de algas microscópicas unicelulares que se pueden encontrar solos o en agrupaciones multicelulares, que se caracterizan por no poseer un movimiento capaz de contrarrestar la velocidad de las corrientes (Darley, 1987), y que dependen en general de la energía solar para realizar la fotosíntesis, utilizando bióxido de carbono y otras sustancias inorgánicas disueltas en el agua (Newell y Newell, 1977; Lee, 1980). Pueden ser procarióticas y eucarióticas, dependiendo de la organización de su material genético (Radmer y Parker, 1994) y la mayoría posee pigmentos fotosintéticos y accesorios, entre los cuales dominan los carotenoides (Richardson *et al.*, 1983). En el mar, en términos de biomasa, los principales componentes del fitoplancton son diatomeas, dinoflagelados y algunos otros flagelados (Campbell, 1993).

### III.1.2. Importancia.

Las algas son extremadamente importantes para la acuicultura (Chen y Long, 1991; Benemann, 1992). Por ejemplo los crustáceos, incluyendo a los peneidos, requieren microalgas como fuente de alimento durante sus primeros estadíos larvarios (Sato, 1991) y los bivalvos requieren de una gran cantidad de algas unicelulares durante toda su vida. Es por este motivo que las microalgas juegan un papel muy importante en la nutrición de larvas o adultos de organismos acuáticos en criaderos comerciales (De Pauw y Persoone, 1988) y es por lo mismo que varios autores estudian la morfología, la sistemática, la genética y la composición química de las diversas especies y sus variaciones en dependencia de los medios de cultivo (López-Elías y Voltolina, 1993), de la salinidad, de la temperatura (Goldman y Mann, 1980; Redaije y Laws, 1983; Nelson *et al.*, 1992) y de la luz (Renaud *et al.*, 1991; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996), entre los varios factores susceptibles de provocar respuestas que puedan resultar en diferencias importantes en las características de las microalgas en cultivo.

Durante el cultivo de organismos como el camarón, el ostión y las almejas, se utilizan para su alimentación diferentes especies de microalgas marinas, las cuales deben de poseer ciertas características como de no ser tóxicas, el tener un tamaño adecuado para poder ser ingerida, una pared celular digerible y contener los constituyentes bioquímicos esenciales adecuados para que los organismos crezcan y se reproduzcan con resultados favorables (Nelson *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Trujillo-Valle y Voltolina, 1994).



### III.1.3. Descripción de la Microalga *Chaetoceros muelleri*.

El fitoplancton está representado por una diversidad considerable de grupos algales. Entre las características más importantes para definir los principales grupos de algas se considera: la pigmentación, la presencia o ausencia de flagelos y sus características (número, longitud, presencia o ausencia de ramificaciones o escamas), composición de la pared celular y tipo de productos fotosintéticos almacenados (Margalef, 1972; Lee, 1980; Darley, 1987).

El grupo de las diatomeas es frecuentemente dominante en el fitoplancton. Muchos géneros son unicelulares, pero algunos forman filamentos y hasta asociaciones coloniales. Tal vez el rasgo más característico de las diatomeas es que la célula tiene la capacidad de formar un esqueleto externo, completamente de sílice, llamado frústula y compuesto de dos mitades (valvas) superpuestas. El grado de silificación es muy variable, pudiendo ser de 1 a 40% o más (como SiO<sub>2</sub>) del peso seco total. Estos organismos se dividen en dos ordenes (centrales y penales) y se clasifican sobre la base de la estructura y la forma de sus frústulas silíceas. Algunas especies son móviles. Sus pigmentos son similares a los de las *Chrysophyceae* (pardo dorado o café pardo) y su reproducción puede ser asexual o sexual. Las diatomeas son casi siempre el principal componente de los florecimientos de primavera y otoño en aguas costeras templadas y en el verano en los mares del Ártico y Antártico. Entre los géneros más importantes de las centrales se pueden citar a: *Biddulphia*, *Chaetoceros*, *Rhizosolenia*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* y *Triceratium* (Bold y Wynne, 1978; Lee, 1980; Darley, 1987).

El género *Chaetoceros* y en especial su sección simplicia es de gran importancia en la acuicultura, ya que muchas especies de este género se han demostrado excelentes alimentos

para organismos marinos (Brown *et al.*, 1989). Entre éstas, sin llegar a dudas, *Chaetoceros muelleri* es la más popular en la acuicultura mexicana (Trujillo-Valle, 1993).

*Chaetoceros muelleri* es una microalga fitoplanctónica, la cual se presenta en forma de células individuales, no forma unidades en cadena, es pequeña y rectangular en vista lateral. Las valvas muestran una marcada complejidad en la ornamentación de las puntas, las cuales se pueden presentar en forma de espina, alvéolas o en forma de canales tubulares. Tiene un diámetro de valva de 6 a 10  $\mu\text{m}$  (Raymont, 1980). Todas las especies de *Chaetoceros* están caracterizadas por tolerar altas temperaturas del agua y en el caso de *Chaetoceros muelleri* la máxima temperatura para el crecimiento es de 37°C, con un intervalo óptimo de temperatura de 25 a 30°C, dentro del cual generalmente se encuentran las condiciones para el cultivo masivo de esta especie (McVey, 1983), pero en un estudio realizado por Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo (1996), reportan registros de temperaturas de hasta 42°C en cultivos masivos al exterior para esta especie en particular. La mínima salinidad para su desarrollo es de 6 ‰, pero puede crecer hasta salinidades arriba de 50‰, con un óptimo de 17 a 25‰. La tasa de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* se incrementa bajo iluminaciones de 500 a 10,000 lux (McVey, 1983).

### **Posición Taxonómica:**

DIVISIÓN	Crisofitas.
CLASE	Bacillariophyceae.
ORDEN	Diatomeas Centrales.
GÉNERO	Chaetoceros.

### III.2. Factores que Afectan el Crecimiento del Fitoplancton.

La producción de fitoplancton de buena calidad depende del medio ambiente donde crece: cambios en el medio de cultivo, en la temperatura, en el pH (Chen y Durbin, 1994), así como la edad del cultivo, fotoperíodo y diferencias en el ciclo luz-obscuridad o en la irradiancia pueden causar variaciones notorias en la calidad de los cultivos (Thompson *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993). Mientras la luz puede ser considerada como el factor físico más importante en el medio ambiente para las plantas fotosintéticas, la temperatura es indudablemente el factor que más afecta a todos los organismos a causa de sus efectos en la actividad metabólica (Lobban *et al.*, 1985; Cabrera y Montecino, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992). De esta forma, los dos factores antes mencionados han sido considerados como los más importantes en la regulación de la producción primaria de las poblaciones de fitoplancton de las latitudes medias y altas (Harrison y Platt, 1986) y sus efectos han sido reportados como difícilmente cuantificables en forma individual, a causa de las interacciones entre la velocidad de las reacciones metabólicas y disponibilidad de los substratos para las mismas, que dependen en último análisis, de la calidad de la luz disponible (Richardson *et al.*, 1983; Richmond, 1986). La adaptación de las algas planctónicas a variaciones de temperatura y a cambios en la intensidad o calidad de la luz, son factores que pueden determinar variaciones importantes en las respuestas fotosintéticas y de crecimiento (Jorgensen, 1968; Rivkin, 1989; Falkowski y LaRoche, 1991).

### III.2.1. Luz.

La luz se debe considerar en términos del fotoperíodo y de su calidad (longitud de onda) e intensidad, que son todos factores de importancia fundamental para las algas. Aparte de su importancia obvia como fuente de energía para la fotosíntesis, el hecho de que la luz fluctúe considerablemente tanto en espacio (profundidad y latitud) como en tiempo (diaria y estacionalmente) sugiere que con frecuencia es un factor limitante para el crecimiento del fitoplancton (Cabrera y Montecino, 1987). Aparte del hecho que la radiación luminosa disminuye exponencialmente con la profundidad en la columna de agua, su calidad espectral varía en dependencia de factores diversos, desde la absorción preferencial de diferentes longitudes de onda de parte del agua, al contenido de sustancias orgánicas y de material biológico con diferentes propiedades ópticas, por lo cual los pigmentos accesorios como los carotenoides, las biliproteínas y las clorofilas accesorias pueden asumir funciones importantes en la absorción y utilización de la energía luminosa (Cabrera y Montecino, 1987; Darley, 1987).

### III.2.2. Adaptación a la Luz y a la Sombra.

Fisiológicamente la aclimatación a cambios en la intensidad y calidad espectral de la luz es un factor importante ya que determina las variaciones en la respuesta fotosintética y de velocidad de crecimiento de la algas en la naturaleza (Richardson *et al.*, 1983; Rivkin; 1989; Falkowski y LaRoche, 1991).

Morfológicamente esto es acompañado por cambios en volumen celular, el número y densidad de membranas de tilacoides, el tamaño de pirrenoides y otros cuerpos almacenados dentro de plastidios y algunas veces por cambios en el número de plastidios por célula (Falkowski y LaRoche, 1991). A nivel celular existen cambios en la composición y contenido de pigmentos y lípidos (Falkowski y Owens, 1980).

Las algas modifican su respuesta fotosintética a la intensidad de luz ambiental para aumentar al máximo su potencial de crecimiento bajo diferentes condiciones de luz, el significado de la adaptación resulta obvio (Casper, 1982). La adaptación a la luz y a la sombra o adaptación al sol y a la sombra, se puede lograr modificando las reacciones luminosas (cambiando la pendiente de la cadena inicial de reacciones relativas a la síntesis de ATP y NADPH), las reacciones oscuras (cambiando la tasa máxima de fotosíntesis o  $F_{m\acute{a}x}$ ) o ambas (Richardson *et al.*, 1983), dependiendo de la clase de alga y su medioambiente. Así una célula que se encuentre cerca del fondo de la zona fótica crecerá lentamente debido a las condiciones limitadas de luz, pero hará que la mayor parte de esa energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. Muchas algas pueden ser clasificadas por tener una de dos estrategias básicas de fotoaclimatación: la primera consiste de una alteración en el “tamaño” pero no en el número de unidades fotosintéticas (PSU); en la segunda se altera el “número” pero no el tamaño de las PSU (Falkowski y Owens, 1980). El tamaño de PSU es usualmente definido como la proporción de clorofila total en los centros de reacción (ya sea en PSI o PSII).

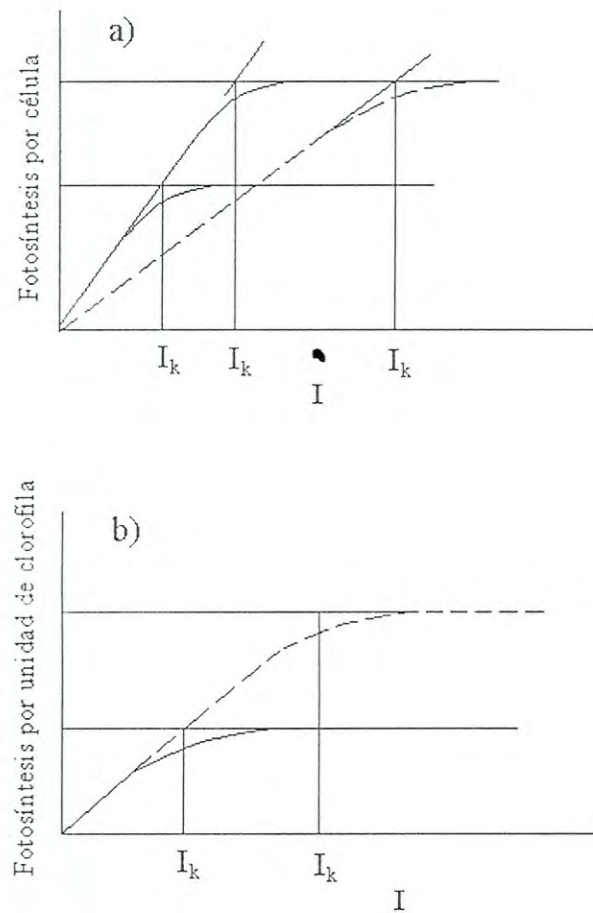
La típica adaptación a la sombra, como se observa bajo condiciones de cultivo, implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula que resulta en una

menor constante de saturación ( $I_k$ ) y una pendiente inicial más pronunciada de la curva de saturación  $F$  vs  $I$  (Fig 1a). El cambio se puede efectuar sin que cambie la  $F_{m\acute{a}x}$ , pero más comúnmente, la adaptación a la sombra va acompañada de una caída de la  $F_{m\acute{a}x}$ . Observándose que la pendiente y no  $I_k$ , mide la eficiencia fotosintética debido a que la misma pendiente se asocia a valores crecientes de  $I_k$  conforme la  $F_{m\acute{a}x}$  aumenta (Dubinsky, 1986). Dado que una célula expuesta a la sombra experimenta intensidades limitantes de luz, carece de ventaja particular alguna para mantener  $F_{m\acute{a}x}$  alta. Por lo tanto, es posible que dicha célula utilice sus recursos para aumentar la síntesis de clorofila “a” a expensas de la síntesis de las enzimas de las reacciones oscuras que contribuyen a las  $F_{m\acute{a}x}$  (Richardson *et al.*, 1983; Duke *et al.*, 1986). Las células cultivadas con ciclos de luz-oscuridad tienden a mostrar características propias para la adaptación a la sombra cuando se comparan con células cultivadas bajo luz continua de la misma intensidad (Humphrey, 1979). Aunque las células adaptadas a la sombra son más eficientes para absorber la energía luminosa, su rendimiento cuántico permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia.

Si la intensidad de la luz es alta, se necesitan menos unidades antena para su captación y el crecimiento celular es limitado más bien por la tasa de fijación del carbono, o sea por la velocidad de las reacciones oscuras (Cabrera y Montecino, 1987). Así, las células expuestas a una mayor irradiancia utilizan menos recursos para la síntesis de clorofila y más para la síntesis de la RuBP carboxilasa y de las demás enzimas de las reacciones oscuras (Cosper, 1982; Duke *et al.*, 1986; Mortrain-Bertrand *et al.*, 1987). Como resultado, dichas células se caracterizan por mostrar menos clorofila por célula (a veces correlacionada con una

disminución de tamaño del cloroplasto), una menor pendiente inicial, mayor  $I_k$  y con frecuencia mayor  $F_{m\acute{a}x}$ . Las células adaptadas al sol también son menos sensibles a la fotoinhibición a altas intensidades de luz. La adaptación a la sombra o al sol típicamente requiere de uno a tres días (Darley, 1987).

Cuando las curvas de  $F$  comparadas con  $I$  se grafican como fotosíntesis por unidad de clorofila (Fig. 1b) más que como fotosíntesis por célula (Fig. 1a), se sobreponen las pendientes iniciales de las células adaptadas al sol y a la sombra. Este resultado es de esperarse si las reacciones luminosas son además independientes de la mayoría de los factores ambientales, como generalmente se supone. Sin embargo, se ha informado de desviaciones de este patrón esperado en cultivos (Falkowski y Owens, 1980) y en poblaciones naturales de fitoplancton. En estos estudios, la pendiente disminuyó con la adaptación a la sombra o disminución de la irradiancia, un cambio opuesto al esperado en células quizá adaptadas para aumentar al máximo la absorción de luz. La importancia de estos cambios en la pendiente (por unidad de clorofila) aún no es clara, pero se han propuesto varios mecanismos (Richardson *et al.*, 1983). Los cambios en las proporciones de clorofila "a" y pigmentos accesorios durante la adaptación a la luz y a la sombra alterarían la eficiencia de captura de la luz por unidad de clorofila "a" y cambiarían por lo tanto la pendiente (Falkowski y Owens, 1980; Richardson *et al.*, 1983). También es posible que las células más pequeñas tengan mayor eficiencia que las más grandes a proporciones idénticas de clorofila que se sombrearan. Los mismos efectos se podrían observar en una especie individual; es decir, conforme la concentración de clorofila disminuye durante la adaptación al sol, el menor sombreado dentro de una célula del mismo tamaño puede aumentar la pendiente.



**Figura 1.** Curvas de  $F$  comparadas con  $I$  para células adaptadas a la sombra (línea continua) y al sol (línea punteada) expresadas como fotosíntesis por célula, *a*) y fotosíntesis por unidad de clorofila *b*).

Fuente: Darley, 1987.



### III.2.3. La Intensidad de la Luz.

A intensidades bajas de luz la tasa de fotosíntesis del fitoplancton se incrementa en proporción a la intensidad de luz. A intensidades moderadas la tasa de incremento llega a ser menor y se alcanza la saturación de la luz (Richardson *et al.*, 1983). Si la intensidad de la luz se incrementa esto promueve la aparición de inhibición de la fotosíntesis (Nalewajko, 1966) como resultado de una menor eficiencia de los fotorreceptores y/o a daños funcionales del aparato fotosintético (Cabrera y Montecino, 1987), debido a la excesiva liberación de energía de los fotosistemas a causa de la falta de sustrato para el ciclo de Calvin (Richardson *et al.*, 1983). Esto explica el hecho de que la profundidad con una máxima productividad en el mar, con frecuencia no se encuentre en la superficie, durante el verano en latitudes templadas y a través del año en los trópicos. A intensidades muy altas de luz (>1.5 ly/min.) la foto-oxidación de los sistemas enzimáticos y de las clorofilas resulta en una inhibición permanente de la fotosíntesis.

La intensidad de saturación varía de una especie de alga a otra. Ryther (1956b) encontró que las intensidades de saturación para miembros de las Chlorophyta, Diatomeas y Dinoflagelados entran en los intervalos de 5.0-7.5, 10-20 y 25-30 k lux respectivamente, pero Richardson *et al.*, (1983) las clasifica en forma inversa con respecto a su preferencia por la luz de mayor a menor, Chlorophyta>Diatomeas>Dinoflagelados. En cada caso un incremento posterior de 10 k lux causa inhibición.

De todas maneras la relación entre la intensidad de luz y la productividad primaria no deberá ser considerada en forma aislada puesto que está influenciada en una forma compleja

por la concentración de nutrientes así como por la temperatura (Cabrera y Montecino, 1987; Riley y Chester, 1989).

#### III.2.4. La Composición Espectral de la Luz.

Sólo la luz que tiene longitud de onda que entra en el intervalo de aproximadamente 300-720 nm puede ser usada por el fitoplancton para la fotosíntesis. A longitudes de onda inferiores a los 380 nm la eficiencia de la fotosíntesis cae rápidamente y cuando la radiación cae en el espectro del ultravioleta con longitud de onda de 300 nm o menos, ocurre una inhibición completa con daño irreversible de las células (Richardson *et al.*, 1983; Cullen y Lesser, 1991).

La capacidad de algunos carotenoides y de los complejos ficobilina-proteína para actuar como transportadores de energía tienen una importante implicación para la productividad primaria marina. Como la luz de longitud de onda absorbida por la clorofila penetra únicamente algunos metros por debajo de la superficie, es sólo en la capa más superficial que la luz desarrolla una contribución directa a la fotosíntesis. Dado que las longitudes de onda azul-verde ( $\lambda_{\text{máx}}$  500-550 nm) dominan los ambientes de baja intensidad de luz de los sistemas acuáticos naturales, una adaptación selectiva sería un cambio en las proporciones de los pigmentos para aumentar al máximo la absorción de dichas longitudes de onda (Cabrera y Montecino, 1987), es decir, deben existir mayores proporciones de pigmentos accesorios a clorofila de acuerdo a la profundidad (Darley, 1987). Parece además probable que los carotenoides de las plantas marinas tengan una función secundaria adicional y que

sirvan para proteger a la clorofila contra la foto-oxidación a intensidades altas de luz (Lüning, 1981), tal vez actuando como aceptor de sustancias altamente oxidantes, como oxígeno atómico, peróxido y radicales oxidrilos, resultante de la disociación de la molécula de agua bajo altas condiciones energéticas.

### III.2.5. Temperatura.

Dado que las variaciones diarias de la temperatura de los grandes cuerpos de agua no son muy importantes y que por lo general la temperatura promedio es inferior a 30°C, los ecólogos del fitoplancton se ocupan más del impacto estacional y latitudinal de la temperatura y de la adaptación a largo plazo a este factor, que del impacto de las fluctuaciones diarias de temperatura. Uno de los efectos indirectos más importantes de la temperatura sobre el fitoplancton es su importancia sobre la estabilidad de la columna de agua.

Los organismos del fitoplancton exhiben la relación habitual entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando su tasa de crecimiento cuando se incrementa la temperatura hasta un valor óptimo, después del cual la reproducción disminuye, con frecuencia drásticamente (Goldman, 1979; Redaije y Laws, 1983). Los óptimos de temperatura para el crecimiento de muchos de los organismos del fitoplancton, marinos y de agua dulce, están dentro del intervalo de 18 a 25°C, aunque las formas de aguas frías tienen generalmente óptimos menores. Algunas diatomeas del Antártico tienen óptimos de temperatura de 4 a 6°C y dejan de crecer a temperaturas superiores, mientras que las diatomeas tropicales pueden interrumpir su crecimiento a menos de 17°C (Darley, 1987; Fulks y Main, 1991). Las algas son capaces de adaptarse, dentro de ciertos límites, a temperaturas subóptimas, pero los

mecanismos de adaptación no son bien conocidas. Es interesante notar que la temperatura óptima en los cultivos es por lo general mayor que la temperatura máxima a la cual el organismo se encuentra creciendo en la naturaleza. Esta observación no necesariamente significa que las algas estén limitadas por la temperatura en su ambiente natural, en cual están con frecuencia limitadas por la baja intensidad de luz o por la deficiencia de nutrientes (Darley, 1987).

La fotosíntesis se puede desarrollar de manera eficiente en el intervalo total de las temperaturas encontradas en el medio ambiente marino desde  $-2^{\circ}\text{C}$  en las regiones polares a  $>30^{\circ}\text{C}$  en las áreas tropicales o en las barras de fango y arena. En cualquier localidad, las especies que allí prosperan tendrán adaptaciones propias a la temperatura prevaleciente, al igual que a las demás condiciones ambientales, existiendo una considerable evidencia sobre la interdependencia de la fotosíntesis, de las condiciones de luz y de temperatura (Cabrera y Montecino, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992).

Pequeños cambios de temperatura (de  $4$  a  $5^{\circ}\text{C}$ ) tienen poco efecto sobre la pendiente inicial de la curva de la fotosíntesis/intensidad luminosa. No obstante, bajo condiciones de saturación de luz un incremento de temperatura conduce a un incremento apreciable de la tasa fotosintética (Jorgensen, 1968; Mortrain-Bertrand *et al.*, 1988). Por ejemplo, Wimpenny (1958) observó que la tasa de absorción de carbono por *Rhizosolenia* iluminada con  $16$  k lux se incrementa de un  $40\%$  cuando la temperatura aumenta de  $10^{\circ}$  a  $15^{\circ}\text{C}$ . Además, un incremento de la temperatura aumenta la intensidad a la cual ocurre la saturación de la luz (Mortrain-Bertrand *et al.*, 1988). La disminución de la tasa de fotosíntesis que se presenta a intensidades de luz supraóptimas es acentuada por la elevación de la temperatura. Parece

probable que los efectos de la temperatura en la fotosíntesis involucren el Estado 3 (la reacción oscura) del proceso de la fotosíntesis, en el cual están involucrados muchos sistemas enzimáticos (Richmond, 1986), en vez del segundo estado, el cual es comparativamente insensible a los cambios de temperatura (Riley y Chester, 1989).

### **III.3. Cultivos Masivos de Microalgas al Exterior.**

El uso de fitoplancton como alimento para larvas de peces, crustáceos y moluscos es un componente básico de la operación de criaderos, los cuales requieren de cantidades masivas de microalgas de buena calidad para poder soportar el crecimiento de cultivos de larvas producidas en dichos criaderos. Estas algas no pueden ser suplidas por el agua de mar, la cual es caracterizada por su bajo contenido de fitoplancton, ya que éste sólo es abundante en ciertas épocas del año cuando se presentan los florecimientos, pero aún así los niveles pueden ser bajos debido a la limitación de nutrientes y el intensivo consumo por numerosos competidores naturales fitoalimentadores (Walsh *et al.*, 1987).

Como parte de un esfuerzo para el desarrollo comercial de los acuicultores ha sido experimentar con técnicas para la obtención de cultivos masivos que puedan producir altas densidades celulares de especies de microalgas seleccionadas que puedan garantizar buenos valores nutricionales.

El desarrollo de técnicas de producción de cultivos masivos de microalgas al interior en los criaderos no pueden desarrollarse adecuadamente por razones económicas, dado que resultan muy costosos (Claus, 1981; Samonte *et al.*, 1993). Por lo que se ha probado el desarrollo de técnicas para la producción masiva de algas en tanques de gran escala el exterior, tal es el caso de la República Popular China quienes utilizan tanques de concreto con capacidad de hasta 145 m<sup>3</sup> en invernaderos y en los cuales ellos mantienen densidades de 1X10<sup>6</sup> cel/ml (Chen y Long, 1991); en Tailandia utilizan tanques de fibra de vidrio de 1 tonelada y de concreto de 10 toneladas, donde se mantienen densidades de 50,000 cel/ml, utilizan un techo transparente para amortiguar la intensidad luminosa y la temperatura incidentes hacia los cultivos (Kongkeo, 1991); en Taiwan utilizan tanques de concreto hasta de 20 ton., los cuales son cosechados después de 30 hrs y se pueden obtener densidades de 1,500 a 4,000 cel/ml de *Skeletonema costatum* y de 1,000 cel/ml de *Isochrysis aff. galbana* (Liao, 1991); en Filipinas (SEAFDC/AQD) han trabajado con cultivos masivos de las microalgas que son incluidas en la dieta del camarón *P. monodon*, principalmente con *Chaetoceros calcitrans* de la cual se han obtenido densidades de 2.65X10<sup>6</sup> cel/ml en cultivos en tanques al exterior de 1 ton. (Samonte *et al.*, 1993); en los criaderos de los distintos países antes mencionados han obtenido buenas producciones microalgales con la mayoría de las especies importantes para las dietas de crustáceos y bivalvos, y dado que los sistemas de producción de microalgas al exterior utilizan la energía luminosa natural de la luz solar y no se mantiene regulación de temperatura, por lo cual los costos por energía eléctrica se ven disminuidos (Nelson *et al.*, 1992). Muchos autores han observado que en los sistemas abiertos son buenos pero existe siempre un problema potencial que es la contaminación de los cultivos algales así

como el riesgo de cambios bruscos en las condiciones medioambientales (temperatura y lluvias principalmente), por lo que algunos criaderos han iniciado pruebas con los cultivos masivos de algas ya sea en invernaderos (Liao, 1991; Nelson *et al.*, 1992) o utilizando techos transparentes (Kongkeo, 1991).

### III.4. Costos de Producción de Cultivos de Microalgas.

Para llevar a cabo una estimación de los costos de producción de cultivos de microalgas que puedan servir como alimento vivo, se deben considerar ciertos factores como vienen siendo los geográficos, climáticos y tecnológicos (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Para enfatizar la complejidad en la que intervienen estos factores, se pueden citar algunos estudios relacionados con dichos factores. El Centro de Desarrollo de Pesquerías del Sudeste de Asia realizó un estudio donde se compararon cinco especies de algas con el propósito de obtener mediante experimentación cual era la microalga que pudiera proporcionar la tasa de sobrevivencia más alta para una especie de en larvas de camarón en particular, *Penaeus monodon*, siendo obtenida mediante una dieta con *Chaetoceros calcitrans* (SEAFDEC, 1980).

Los resultados obtenidos en el estudio anterior es probable que no lleguen a ser repetibles en otras regiones, dado a la incidente complejidad de los factores geográficos, climáticos y tecnológicos sobre la producción del cultivo de microalga, y la medida en la cual

cada uno de ellos influye, no puede ser posible llegar a determinarlo a un costo razonable y a corto plazo. Lo anterior hace mucho más complejo la comparación de costos entre las tecnologías aplicadas en diferentes condiciones.

Samonte *et al.* (1993) realizaron un estudio produciendo en forma masiva *Chaetoceros calcitrans* en el Departamento de Acuicultura (SEAFDEC/AQD), usando el método multipasos, donde el costo del inóculo fue de 2 dólares, el cultivo de las microalgas se realizó utilizando el medio F modificado por Guillard y Ryther (1962), estandarizados con 50,000 cel/ml, se mantuvieron con aireación e iluminación constante a través de todo el período de cultivo y los cuales estaban en un área mantenida a una temperatura de 18 a 27°C por una unidad de acondicionador de aire. Los cultivos al exterior sólo fueron provistos de aireación, se usó el medio TMRL modificado, además de un enriquecimiento con urea, fosfato amónico y sulfato amónico. Se obtuvo una densidad celular promedio de  $2.65 \times 10^6$  cel/ml después de 4 días de cultivo. El costo de producción usando el método multipasos fue de \$28.62 USA Dlls/ton, (\$1.00 Dlls = 25.00 pesos Filipinos) Tabla 1. El 84% del costo total es usado en la adquisición de equipo especial para cultivo de microalgas durante una inversión inicial de un criadero de camarón. El costo mínimo involucrado en la utilización de éste método hace de esta técnica de fácil adquisición para los acuicultores y así tener buenas producciones de cultivos monoespecíficos de microalgas a bajos costos.



**Tabla 1.** Costo de producción de microalgas (peso/ton).

ARTÍCULO	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	TOTAL
Inóculo	25 ml	0.05	1.25
Medio F modificado	3 ml	0.38	1.13
Agar	5 g	22.03	110.13
TMRL enriquecido	220 ml	0.06	13.89
Fosfato amónico (16-20-0)	12 g	0.01	0.10
Urea 46	12 g	0.01	0.10
Sulfato amónico 21-0-0)	100 g	0.01	0.80
Gas	2 kg	3.00	6.00
HCl	5 l	21.43	107.14
Electricidad	100 kWh	2.20	220.00
Labor	32 hrs	6.25	200.00
Depreciación			54.96
Total de costos de operación/ton			715.50
Costo por litro			0.72

Fuente: Samonte *et al.*, 1993.

En Massachusetts (USA) Walsh *et al.* (1987), trabajaron con tres especies de microalgas para alimentar semillas de bivalvos utilizando el método multipasos hasta alcanzar volúmenes de  $3.24 \times 10^7$  litros en los cuales obtuvieron una producción total de microalgas (en 1983) de  $4.46 \times 10^{16}$  células, estos cultivos fueron llevados en tanques de concreto en invernaderos con una temperatura promedio de 18°C. Por lo que ellos obtuvieron un costo total de \$149,000 dólares (Tabla 2) para producir las semillas, de los cuales sólo el 29% es utilizado en la producción de microalgas.

**Tabla 2.** Estimación para los costos de producción de microalgas en Corporación de Investigación Acuacultural para 1983. El contenido de carbón de alga supuesto a un promedio de  $5 \times 10^{12}$  g/cel representa el 37% del almidón en peso seco libre (AFDW).

<b>COSTOS FIJOS.</b>	
Labor (4): salario & beneficios suplementarios	\$48,000
Mantenimiento: tareas & materiales	25,000
Gastos Grales. (admón., seguridad, aseguranza, viajes, licencias, etc.)	35,000
Depreciación	15,000
	\$123,000
<b>COSTOS VARIABLES</b>	
Energía @ \$0.08/KW	\$20,000
Nutrientes	3,000
Agua dulce	1,000
Artículos de consumo	2,000
	26,000
<b>Costo Total de Producción</b>	<b>\$149,000</b>
Producción Total de Alga	\$ Costo/ Unidad de Prod.
1) $4.46 \times 10^7$ litros @ $10 \times 10^9$ cel/l	\$0.003/litro
2) $2.2 \times 10^5$ gC	0.68/gC
3) $5095 \times 10^5$ gAFDW	0.25/gAFDW

Fuente: Walsh *et al.*, 1987.

Un factor crítico en la producción de microalgas en las granjas productoras de larvas de molusco y crustáceos es la mano de obra, debido a que es muy intensivo el manejo de los cultivos y además de que se requiere de bastante espacio para el asentamiento de los cultivos, ya sea al interior o al exterior (Fulks y Main, 1991).

Los costos de energía eléctrica en la producción de microalgas dentro de un laboratorio (para iluminación, bombas, aireación/mezcla y calentamiento/enfriamiento) son altos, los cuales pueden llegar a ser reducidos si dichos cultivos son llevados al exterior con algas que puedan soportar las condiciones medioambientales (Fulks y Main, 1991). La mayoría de los

laboratorios de regiones cálidas como lo es el estado de Sonora, hasta hace poco, cultivaban microalgas en ambientes controlados, con sistema de alumbrado artificial total o parcial. Los costos en términos de energía eléctrica, aunque variantes en dependencia de las dimensiones del laboratorio, de la ubicación geográfica, del clima y del sistema de climatización y de alumbrado entre otros, pueden en algunos casos representar hasta el 30% del costo total de operación. Por este motivo, se ha sugerido el uso de cultivos al exterior, con previa aclimatación y estudio de las condiciones límite dentro de las cuales cada especie o cepa de microalgas puede ser utilizada (Tinoco-Villa, 1996; Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo, 1996; Torres-Rodríguez, 1997).

Según lo reportado por Fulks y Main (1991) y Coutteau y Sorgeloos (1992) los costos de producción de microalgas puede alcanzar hasta un 50%, lo anterior hace ver que si se logra una disminución en los costos de producción de la microalga, por mínima que sea, se habrá logrado una importante reducción de los costos totales, dando con ello un impulso a la industria de acuicultura.

El presente trabajo tiene como uno de sus objetivos la comparación de los cultivos al interior y al exterior con una microalga en particular, *Chaetoceros muelleri*. El realizar dicha comparación puede llevarnos a conocer que tan factible sería la producción de cultivos de dicha microalga al exterior, y en dado caso que lo sea, esto implicaría una reducción en cuanto a los costos asociados a energía eléctrica, área disponible, entre otros.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **IV.1. Selección de la Microalga.**

*Chaetoceros muelleri* (CH-GRA) es entre las microalgas de mayor uso como dieta en los criaderos comerciales de larvas de moluscos y crustáceos. En investigaciones anteriores se han observado buenos crecimientos en amplios intervalos de temperatura (Nelson *et al.*, 1992), posee una elevada tasa de duplicación celular y se adapta bien a diferentes medios y condiciones de cultivo (Trujillo-Valle, 1993).

### **IV.2. Área de Experimentación.**

El laboratorio donde se realizó el presente trabajo es el Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), localizado frente a la Isla de Tiburón, a 8 km del poblado de Bahía Kino, Sonora. La escasez de agua dulce en esta región sobre una franja costera de 15 km., anula toda posibilidad de desarrollo industrial y agrícola, por lo cual no existen acarreos de desechos químicos, fertilizantes o insecticidas al medio marino.

En el laboratorio del CREMES la sección de microalgas incluye un laboratorio de 395 m<sup>2</sup>, en el cual la temperatura se mantiene aproximadamente a 25°C y donde se producen volúmenes progresivos de microalgas, desde cepas de 150 ml hasta cultivos masivos en columnas de fibra de vidrio transparentes de 300 litros o en tanques de 3,000 litros de capacidad. Dentro del laboratorio la luz se suministra en forma continua con lamparas de luz fluorescente de 75 watts y los cultivos se mantienen con aireación constante para evitar procesos de sedimentación. Periódicamente el aire es enriquecido con CO<sub>2</sub> para el control del pH, hasta nivel de cultivos en columna. Otra área para los cultivos masivos se encuentra en el exterior del laboratorio, donde se les proporciona aire, periódicamente enriquecido con CO<sub>2</sub>, nuevamente hasta nivel de columna de 300 litros. En esta área no hay alumbrado artificial y la temperatura depende de la situación estacional.

### **IV.3. Diseño Experimental.**

El estudio consistió en la producción masiva de la microalga *Chaetoceros muelleri*, obtenida del cepario del CREMES, en columnas de 300 litros y en tanques de 3,000 litros de capacidad, tanto en el interior del laboratorio bajo condiciones aproximadamente controladas de luz y de temperatura, así como en el exterior bajo las condiciones medioambientales prevalecientes al momento del cultivo. Los ensayos se llevaron a cabo durante el verano y el invierno de 1995 y en la primavera de 1996, para cada estación se realizaron dos cultivos

experimentales. En cada caso, el CREMES proporcionaba dos cultivos de 20 litros con los cuales se inoculaban una columna madre al interior y otra al exterior. Después de 48 hrs de aclimatación, estas columnas se usaron para inocular las tres columnas experimentales al interior y un número igual al exterior.

Antes de usar las columnas y tanques fueron lavados con una solución de ácido clorhídrico al 10%, enjuagados con agua de mar y llenados con agua de mar filtrada a través de filtros de arena y de cartuchos de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ ; después de esta operación se añadieron 300 ml de solución "stock" para el medio F/2 enriquecido con silicatos por cada columna. En el caso de los tanques se agregaron 1.5 litros de cada solución, para obtener el medio F/4. El medio F/2 utilizado es el descrito por Guillard y Ryther (1962), que es ampliamente utilizado a nivel mundial para el cultivo de una gran variedad de especies planctónicas y bentónicas de microalgas de importancia en la acuicultura (Tabla 3), ya que no tiene limitantes en cuanto a cantidad de nutrientes orgánicos o inorgánicos específicos. El medio para los cultivos de volúmenes inferiores a los 15 litros se preparó con agua de mar con una salinidad de cerca de 35 ‰, esterilizada en autoclave a 121°C y a 15 PSI por 20 min., dejándose enfriar por 24 hrs antes de su uso. Para cultivos mayores se usó la técnica de esterilización con hipoclorito al 5% (5 ml por cada 10 litros de agua), neutralizado con 50 mg de tiosulfato de sodio por ml de hipoclorito.

Después de inocular las columnas donde se desarrollaron los cultivos experimentales, cada 6 horas se obtuvieron muestras para el conteo celular, para la determinación del peso seco, de los pigmentos y adicionalmente se tomaron lecturas de temperatura y pH.

El período de cultivo de las columnas fue de 48 horas; llegado a este punto, una de ellas por cada situación se seleccionaba para usarse como inóculo de un tanque, en el interior como en el exterior. Otra de las columnas se dejaba para continuar con su monitoreo a las 60 y 72 horas de cultivo y la tercera se usaba para las necesidades normales del CREMES.

El cultivo en los tanques tenía una duración de 48 horas y se monitoreaban los mismos parámetros que para las columnas.

**Tabla 3.** Constituyentes de la solución madre para el medio F.

COMPUESTO	Moles/Litro
Nitrato de Sodio	1.760
Fosfato de Sodio Monobásico	0.072
Metasilicato de Sodio	0.107
Hierro Secuestreno	0.023
Sulfato de Cobre	$7.90 \times 10^{-5}$
Sulfato de Zinc	$1.53 \times 10^{-4}$
Cloruro de Cobalto	$8.50 \times 10^{-5}$
Cloruro de Manganeso	$1.83 \times 10^{-3}$
Molibdato de Sodio	$5.20 \times 10^{-5}$
Biotina	1.00 mg
Cianocobalamina	1.00 mg
Tiamina	200 mg

NOTA: Utilizar 1 ml de cada uno de los nutrientes para un litro de medio F. (Guillard y Ryther, 1962).

Las muestras para peso seco y pigmentos fueron filtradas por triplicado para cada tipo de análisis. Los volúmenes de cultivo filtrado dependieron de la densidad celular observada y

los filtros utilizados fueron de fibra de vidrio Whatman GFC o Poretic GC-50 de 47 mm de diámetro para peso seco y de 25 mm para pigmentos.

Las lecturas de pH se realizaron mediante un potenciómetro de pluma marca Hach y la temperatura fue medida con un termómetro de escala amplia (-10 a 50 °C) con precisión de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

La incidencia luminosa ambiental para las distintas estaciones del año fue registrada mediante un sensor cuántico LI-190SA, MCA LI-COR, dichos datos pertenecen a la incidencia luminosa acumulada diaria. La información fue proporcionada por el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

## **IV.4. Medición de la Biomasa.**

### **IV.4.1. Conteo Celular.**

En el cultivo de microalgas la medición de la biomasa que se emplea en forma rutinaria es el conteo celular directo, para lo cual se utilizó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, que es recomendado para el conteo de algas pequeñas (2 a 30  $\mu$ ) y cultivos con densidades de  $5.0 \times 10^4$  a  $1.0 \times 10^7$  cel/ml. El más común es el de dos cámaras con reglilla Neubauer, con 9 cuadros de 1 mm por lado. El volumen total de ambas cámaras es de 0.8 ml. Se recomienda usar los objetivos de 10 y 20 X, y para cerciorarse de que lo observado sea



realmente una microalga se usa el de 40 X (López-Elías *et al.*, 1995). Para una mayor precisión de conteo se utilizan por lo menos tres submuestras, contando en cada caso por lo menos cinco cuadros de 1 mm<sup>2</sup> de las dos reglillas y la concentración celular se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{cél/ml} = (\text{Total de células/No de cuadros contados}) \times 10^4.$$

#### IV.4.2. Biomasa en Base Seca.

La determinación de biomasa en base seca es una de las metodologías que más se usan para cuantificar la producción de microalgas en un cultivo. Primeramente los filtros de fibra de vidrio deben ser lavados con agua deionizada, secados en una estufa a 100°C por 30 min. y posteriormente colocados en una mufla a 500°C por 2 horas con el fin de eliminar los remanentes de materia orgánica que pudiese estar presente. Los filtros incinerados se dejan enfriar dentro de un desecador por 1 hora, para evitar su contaminación y que absorban humedad antes de ser pesados. Los filtros se pesan en una balanza analítica y después se colocan en cucharillas de aluminio con su identificación correspondiente, hasta su uso.

#### **IV.4.2.1. Peso Seco.**

El volumen de cultivo de microalgas a filtrar depende de la especie y de la densidad del cultivo. En este caso, por tratarse de una diatomea de dimensiones relativamente pequeñas, se recomienda filtrar por lo menos un volumen equivalente a 50 ml de un cultivo con una concentración de  $4 \times 10^6$  cel/ml. Los filtros con muestra se colocan en una estufa a  $65^\circ\text{C}$  de 4 a 6 horas, se enfrían en un desecador por 1 hora y se pesan en la misma balanza empleada para la calibración (López-Elías *et al.*, 1995).

### **IV.5. Determinación de Pigmentos.**

La cuantificación de clorofilas es uno de los métodos químicos más empleados para cuantificar el fitoplancton en el agua de mar, que se basa en la extracción de los pigmentos con un solvente medianamente polar como lo es la acetona. El contenido de clorofilas presentes en la muestra se estima midiendo la extinción de la luz de las longitudes de onda características para cada pigmento. Existen varias publicaciones metodológicas, en las cuales se recomiendan longitudes ligeramente diferentes y distintas ecuaciones y coeficientes. En nuestro caso, se empleó el método tricromático recomendado por SCOR-UNESCO (Strickland y Parsons, 1972), Para las clorofilas “a” y “c” y para los carotenoides la técnica descrita por Strickland y Parsons (1968).

Además, se comparó la eficiencia de extracción del método tradicional con acetona contra la sugerida por Shoaf y Lium (1976) que emplearon dimetilsulfóxido (DMSO), un compuesto que aumenta la permeabilidad de las membranas y paredes celulares para la extracción, procediendo después a las lecturas de extinción empleando las mismas longitudes de onda de los métodos ya mencionados.

#### **IV.6. Pruebas Estadísticas.**

Para comparar el crecimiento de los cultivos al interior y al exterior se realizó una prueba de pendientes, evaluando por separado el crecimiento en columnas y tanques hasta las 48 hrs, para cada una de las situaciones estacionales.

Además se analizaron los valores promedio obtenidos (número de células, peso seco y contenido de pigmentos) a las 48 hrs de los cultivos en columnas y en tanques en las tres estaciones climáticas, además de los obtenidos con las condiciones de cultivo al interior y al exterior. Se realizó una prueba de t de student para comparar entre condiciones de cultivo en las tres estaciones del año y un ANOVA para comparar entre las tres estaciones del año para ambas condiciones de cultivo; cuando no se comprobó la hipótesis de normalidad, se empleó la prueba de Mann-Whitney (Zar, 1984) para la comparación entre condiciones de cultivo y la de Kruskal-Wallis con subsiguiente prueba de rangos múltiples (Zar, 1984) para la comparación entre estaciones climáticas.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

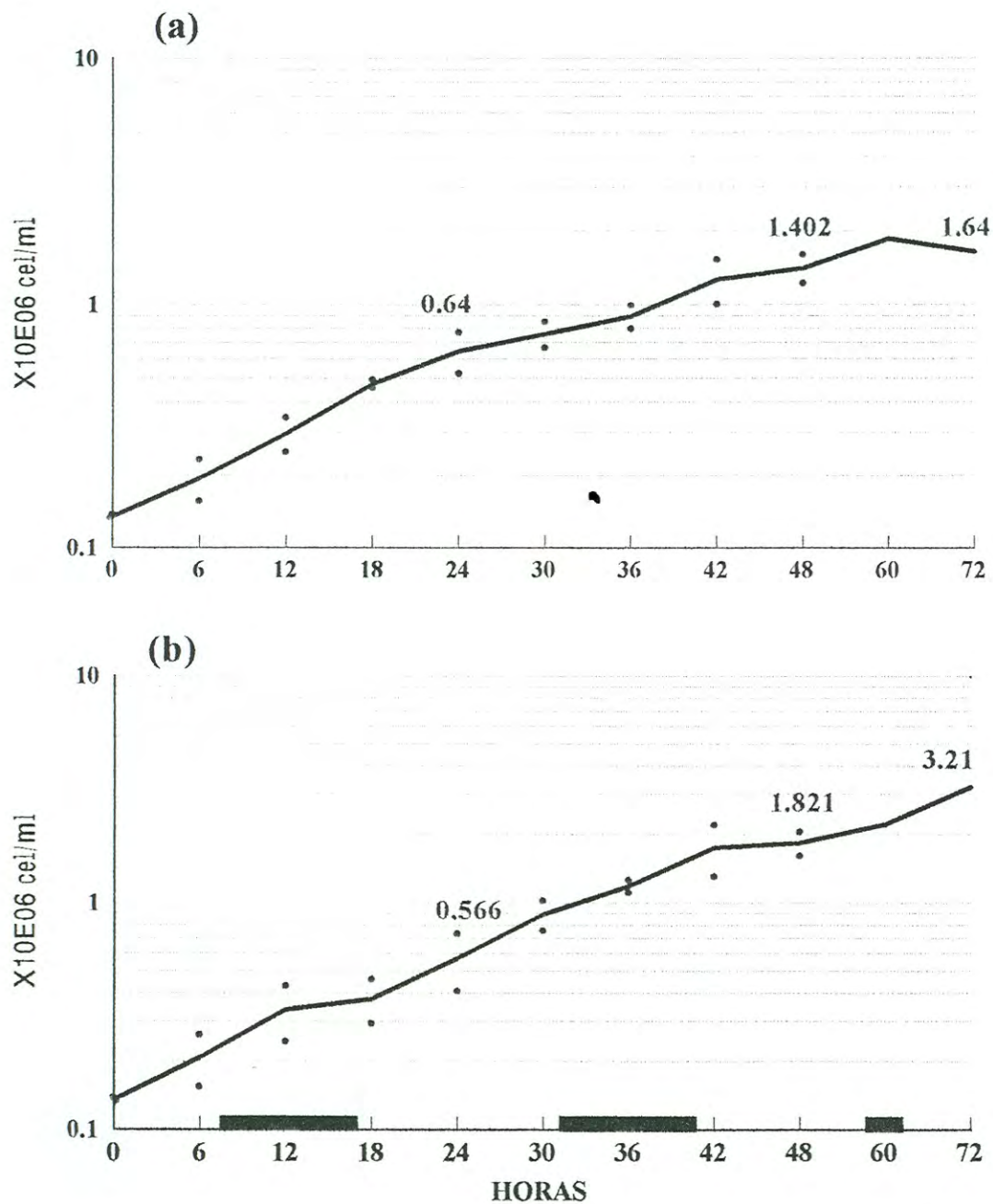
### V.1. Biomasa.

#### V.1.1. Columnas.

##### V.1.1.1. Verano.

En verano se encontró que los cultivos al interior tuvieron un crecimiento regular alcanzando concentraciones de cerca de  $0.642 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs hasta  $1.402 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hrs y por último  $1.640 \times 10^6$  cel/ml a las 72 hrs (Fig. 2a). Al comparar los valores de crecimiento a las 48 hrs de este estudio con lo reportado de otros trabajos, se observa que estos valores se encuentran ligeramente por arriba a lo reportado por Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo (1996) para la estación de verano al interior ( $1.371 \times 10^6$  cel/ml), pero por debajo a los valores registrados de  $2.0 \times 10^6$  cel/ml para los cultivos regulares en el CREMES (J. Valdez, CREMES, com. pers.), y de  $1.75 \times 10^6$  cel/ml en el Centro Oceanológico del Pacífico (Aquacop, 1983).

La máxima tasa de duplicación fue a las 24 hrs con 2.2 div/día, que decayó a 1.1 div/día para el siguiente día y hasta 0.2 div/día a las 72 hrs. El aumento del cultivo en las últimas 24 hrs (tercer día) fue solo un 17.0%, lo cual sugiere que esta rutina de 3 días es incosteable.



**Figura 2.** Concentración celular promedio de cultivos en columnas para *Chaetoceros muelleri* para la estación de verano, donde: (a) cultivos al interior y (b) cultivos al exterior. ■ Horas oscuridad • Desviación estándar.

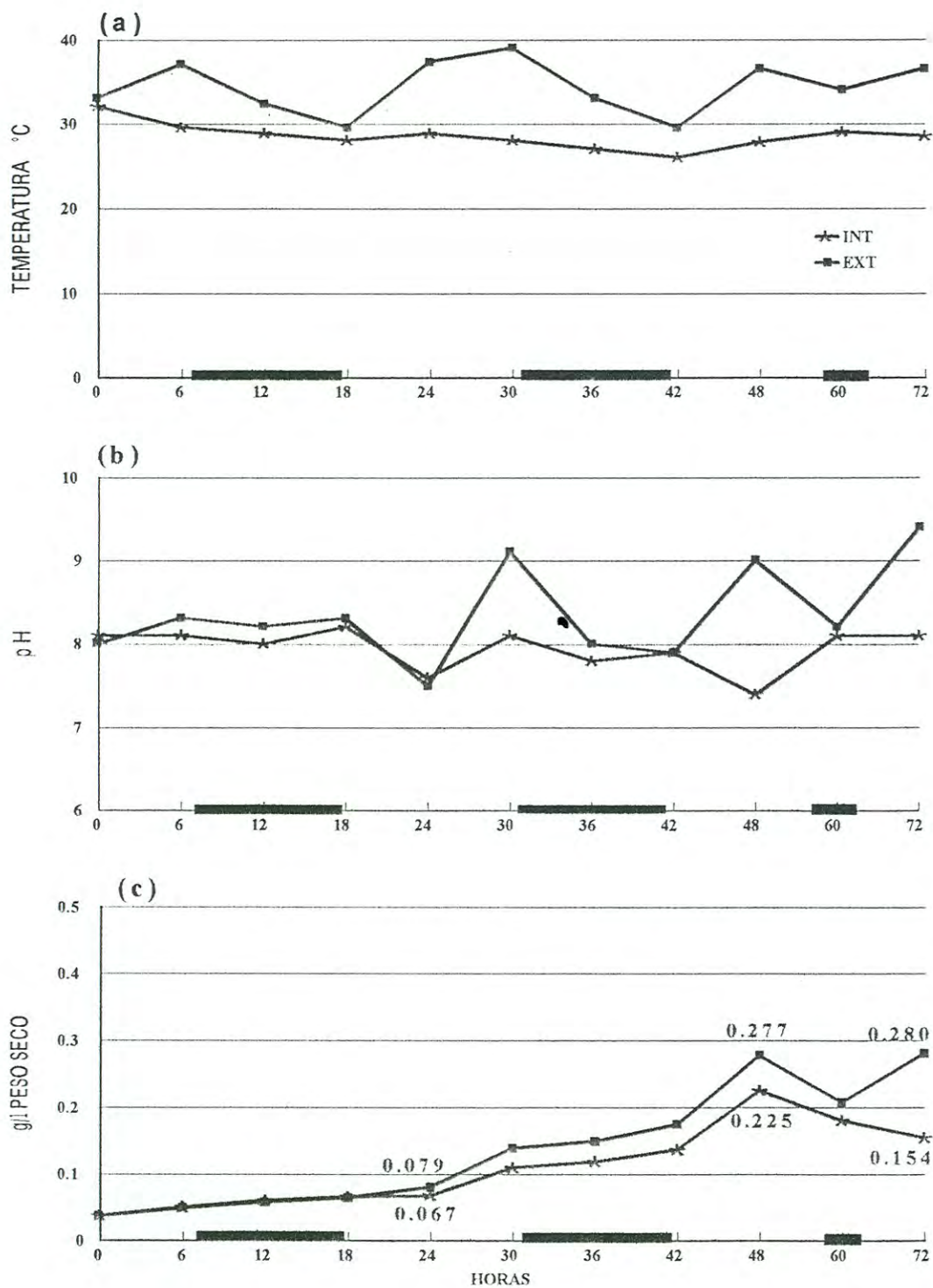


Figura 3. Cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* en verano, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco. ■ Horas de oscuridad.

La temperatura fluctuó entre 26 a 32°C (Fig. 3a) y el pH de 7.4 a 8.2 (Fig. 3b). El control del pH en los cultivos de microalgas en columnas se realizaba mediante la inyección en forma discontinua de CO<sub>2</sub> para tratar de mantenerlo dentro de un rango de 7.5 y 8.5, que son los valores óptimos de crecimiento de las mismas. Otra forma de expresar la producción de microalgas es en base a peso seco, el cual fue de 0.067, 0.225 y 0.154 g/l para las 24, 48 y 72 hrs respectivamente (Fig. 3c), como se puede observar el valor de peso seco entre el segundo y tercer día tuvo un descenso que corresponde a 31.55%.

La energía luminosa o irradiancia proporcionada por las lamparas a los cultivos llevados a cabo en el interior fue de 26.6 Wm<sup>2</sup>, esta condición permanece constante durante todas las estaciones del año.

Al exterior el crecimiento fue inicialmente similar, llegando a un promedio de 0.566X10<sup>6</sup> cel/ml a las 24 hrs, pero se mantuvo en niveles superiores en los días sucesivos, durante los cuales se obtuvieron concentraciones de 1.821X10<sup>6</sup> cel/ml a las 48 hrs, hasta un total de 3.210X10<sup>6</sup> cel/ml a las 72 hrs (Fig. 2b), para este tipo de condiciones Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo (1996) y Torres-Rodríguez (1997) reportan valores de concentración celular superiores para las 48 hrs con 2.123X10<sup>6</sup> y 3.43X10<sup>6</sup> cel/ml respectivamente, lo cual puede ser atribuido a que el presente estudio fue llevado a cabo durante los últimos días del verano, por lo que se trabajo con menores irradiancias y temperaturas.

Al igual que en los cultivos al interior, al exterior también presentaron las máximas tasas de crecimiento a las 24 hrs con 2.014 div/día, disminuyendo a las 48 y 72 hrs con 1.736 y 0.839 div/día respectivamente. El aumento de concentración celular entre el segundo y tercer

día fue del 76.28%, además de que los cultivos al exterior a las 48 hrs son superiores en un 30.0% a lo observado al interior, lo cual sugiere que en esta estación es factible cultivar esta microalga al exterior, con una importante disminución en los costos de la energía utilizada para el mantenimiento de áreas refrigeradas.

Tanto para temperatura y pH se presentaron fluctuaciones, desde 29.5 a 39.0°C y 7.5 a 9.4, respectivamente (Fig. 3a y b). En esta condición de cultivo la producción en base a peso seco fue mayor que al interior, de 0.079 g/l a las 24 hrs, a 0.277 g/l para las 48 hrs, manteniéndose más o menos estable a las 72 hrs con 0.280 g/l (Fig. 3c). La biomasa en base a peso seco presentó un ligero aumento entre el segundo y tercer día (1.08%), pero los cultivos al exterior mostraron una biomasa de peso seco 23.11% mayor a lo observado en los cultivos al interior a las 48 hrs.

Durante los dos periodos de cultivo en columnas, la intensidad luminosa varió entre 6134 y 6715 Wm<sup>2</sup> para esta estación climática (Tabla 4).

**Tabla 4.** Intensidad luminosa registrada para verano durante los cultivos en columna.

DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP Wm <sup>2</sup>		2 <sup>DO</sup> EXP Wm <sup>2</sup>	PROM. Wm <sup>2</sup>
0	10-SEPT-95	6715	20-SEPT-95	6646	6680.5
1	11-SEPT-95	6134	21-SEPT-95	6559	6346.5
2	12-SEPT-95	6626	22-SEPT-95	6376	6501.0
3	13-SEPT-95	6611	23-SEPT-95	6150	6380.5

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.



### V.1.1.2. Invierno.

En invierno los cultivos al interior mantuvieron un crecimiento con una tendencia suave, alcanzando un promedio de  $0.547 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs,  $1.082 \times 10^6$  cel/ml para las 48 hrs y para el tercer día  $1.650 \times 10^6$  cel/ml (Fig. 4a), Tinoco-Villa (1996) reporta para esta condición de cultivo un crecimiento mayor ( $1.790 \times 10^6$  cel/ml) al observado en este estudio a las 48 hrs.

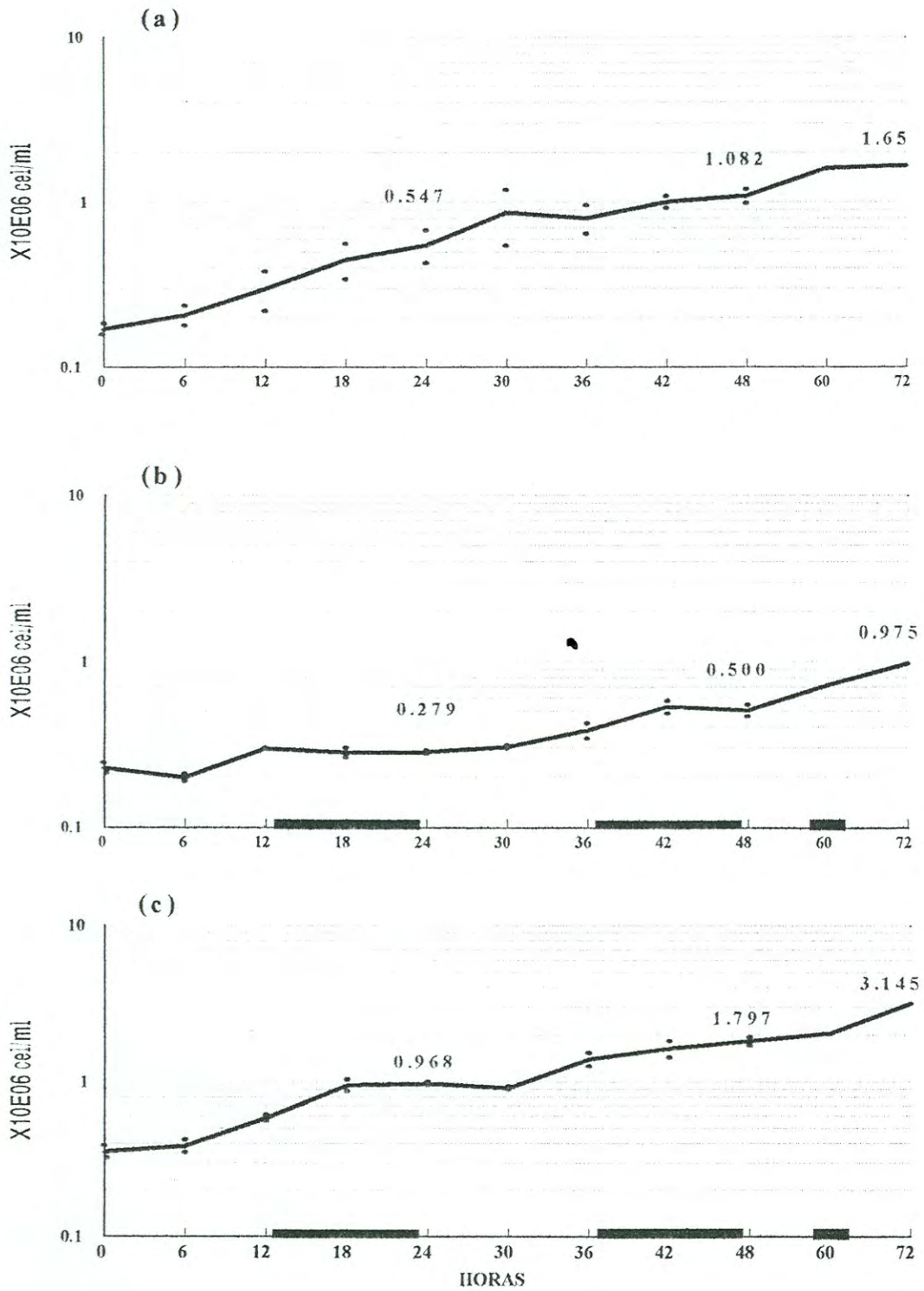
Las tasas de crecimiento fueron de 1.660 div/día para las 24 hrs, que fue la máxima registrada en estos cultivos, disminuyendo 1.015 div/día a las 48 hrs y 0.631 div/día a las 72 hrs. El aumento de la concentración celular entre el segundo y tercer día fue del 52.49%, la cual puede no ser suficiente para justificar el mantenimiento del cultivo un tercer día, ya que implica elevar los costos por gasto de energía en el área de microalgas durante las horas más frías del día.

A pesar de que los cultivos se mantienen en el laboratorio se presentan fluctuaciones de temperatura (entre 20.6 y 24.3°C) y de pH (entre 7.0 y 9.0), Fig. 5a y b. En peso seco, la producción fue de 0.094, 0.164 y de 0.283 g/l para las 24, 48 y 72 hrs, respectivamente (Fig. 5c), registrando un aumento del 72.56% entre el segundo y tercer día de cultivo.

Al exterior se encontraron diferencias entre el primer y segundo experimento ( $p < 0.0042$  y  $t = 3.5535$ ) en cuanto a la producción del número de células por ml (Anexo 1), que puede ser atribuido a la presencia de un frente frío durante el primer experimento que mantuvo temperaturas bajas, que son la causa más probable de esta baja producción y del lento crecimiento de las microalgas, por lo cual solo se obtuvo un promedio inicial de  $0.279 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs, de  $0.500 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hrs, logrando alcanzar  $0.975 \times 10^6$  cel/ml al

**Tabla 5.** Concentración celular a las 48 hrs (célX10<sup>6</sup>/ml), tasas de duplicación (div/día) y peso seco (g/l) para cultivos al exterior de *Chaetoceros muelleri* para la estación de invierno.

	EXTERIOR	INVIERNO
CONCENTRACIÓN CELULAR	Exp-1	0.500
	Exp-2	1.797
TASAS DE DUPLICACIÓN 24 hrs	Exp-1	0.323
	Exp-2	1.474
TASAS DE DUPLICACIÓN 48 hrs	Exp-1	0.840
	Exp-2	0.890
TASAS DE DUPLICACIÓN 72 hrs	Exp-1	0.961
	Exp-2	0.871
PESO SECO 48 hrs	Exp-1	0.095
	Exp-2	0.132
PESO SECO 72 hrs	Exp-1	0.213
	Exp-2	0.280



**Figura 4.** Concentración celular promedio de cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* para la estación de invierno, donde: (a) cultivos al interior, (b) cultivos al exterior experimento 1 y (c) cultivos al exterior experimento 2. ■ Horas oscuridad • Desviación estándar.

tercer día, con ligeras disminuciones en la producción de biomasa durante las horas de oscuridad (Fig. 4b y Tabla 5), Torres-Rodríguez (1997) reporta un crecimiento promedio muy similar ( $0.494 \times 10^6$  cel/ml) al observado en este estudio a las 48 hrs.

El registro para las tasas de crecimiento a las 24 hrs es de 0.323 div/día y de 0.840 div/día a las 48 hrs, con un valor máximo de 0.961 div/día a las 72 hrs (Tabla 5). Aún cuando la producción de microalgas fue lenta, el aumento de la concentración celular entre el segundo y el tercer día fue del 95.0%, lo que nos indica que es bueno dejar un día mas el cultivo.

La temperatura varió entre 12.2 y 21.9 °C (Fig. 5a) y el pH de 7.8 a 8.9 (Fig. 5b). Los valores de peso seco para las 24 hrs fue de tan solo 0.050 g/l, aumentando a las 48 y 72 hrs con 0.095 y 0.213 g/l respectivamente (Fig. 5c), el incremento de peso seco observado entre las 48 y 72 hrs corresponde a 124.21% y al comparar los valores a las 48 hrs entre los cultivos al exterior y al interior, estos últimos son superiores en un 42.07%. La incidencia luminosa para estos cultivos vario entre 4680 y 4755  $Wm^2$  (Tabla 6).

Durante el segundo experimento el crecimiento al exterior fue superior, alcanzando valores de  $0.968 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs,  $1.797 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hrs y casi el doble a las 72 hrs con  $3.145 \times 10^6$  cel/ml (Fig. 4c y Tabla 5), Tinoco-Villa (1996) reporta un crecimiento de  $1.227 \times 10^6$  cel/ml para este tipo de cultivos a las 48 hrs con *Chaetoceros muelleri*.

La máxima tasa de duplicación fue a las 24 hrs con 1.474 div/día, tendiendo a disminuir el segundo y el tercer día de cultivo con 0.890 y 0.871 div/día respectivamente (Tabla 5). De forma similar al verano, la producción del número de células

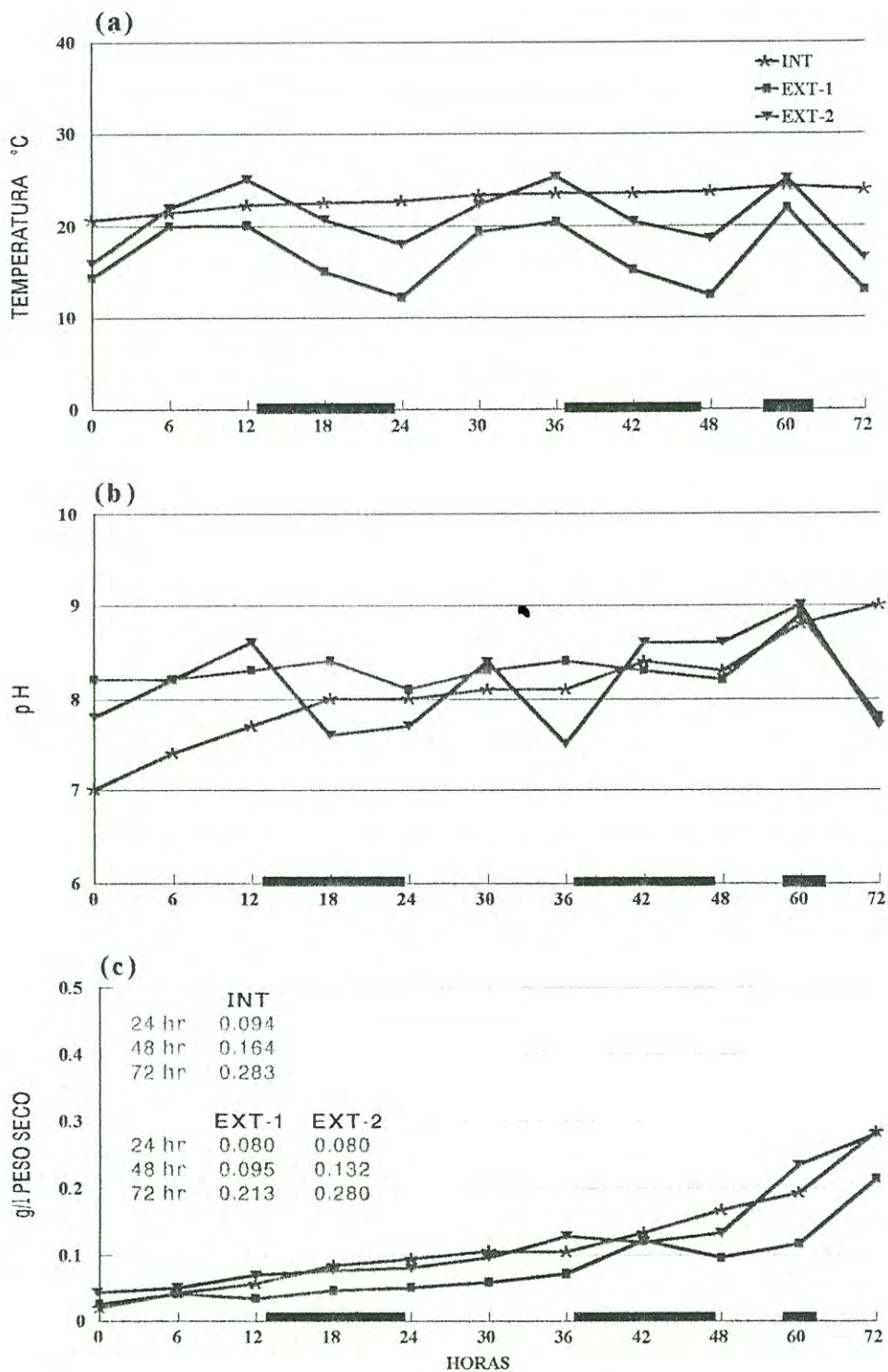


Figura 5. Cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* en invierno, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco  Horas oscuridad.

por ml alcanzada fue de 75.01% entre las 48 y 72 hrs de cultivo, siendo también para este caso recomendable dejar los cultivos por un día mas, después de las 48 hrs que es el tiempo normal en que se detienen los cultivos. Los cultivos al exterior del segundo experimento a las 48 hrs presentaron una producción del 66.08% mayor a la observado en los cultivos al interior.

La temperatura y el pH variaron de 15.9 a 25.3 °C y 7.5 a 9.0 respectivamente (Fig. 5a y b). El peso seco de los cultivos producido fue de 0.080, 0.132 y de 0.280 g/l para el primer, el segundo y el tercer día respectivamente (Fig. 5c y Tabla 5), observándose un incremento del 112.12% entre el segundo y tercer día de cultivo y al comparar los valores de peso seco a las 48 hrs se puede observar que los cultivos al exterior son 19.51% menor a lo encontrado en los cultivos al interior.

La incidencia luminosa durante este segundo experimento fluctuó entre 3859 y 4756  $Wm^2$  (Tabla 6).

**Tabla 6.** Intensidad luminosa registrada para invierno durante los cultivos en columna.

DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP $Wm^2$		2 <sup>DO</sup> EXP $Wm^2$	PROM. $Wm^2$
0	23-Enero-96	4680	30-Enero-96	4756	4718
1	24-Enero-96	4699	31-Enero-96	3859	4279
2	25-Enero-96	4702	01-Enero-96	3918	4310
3	26-Enero-96	4755	02-Enero-96	4293	4524

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.

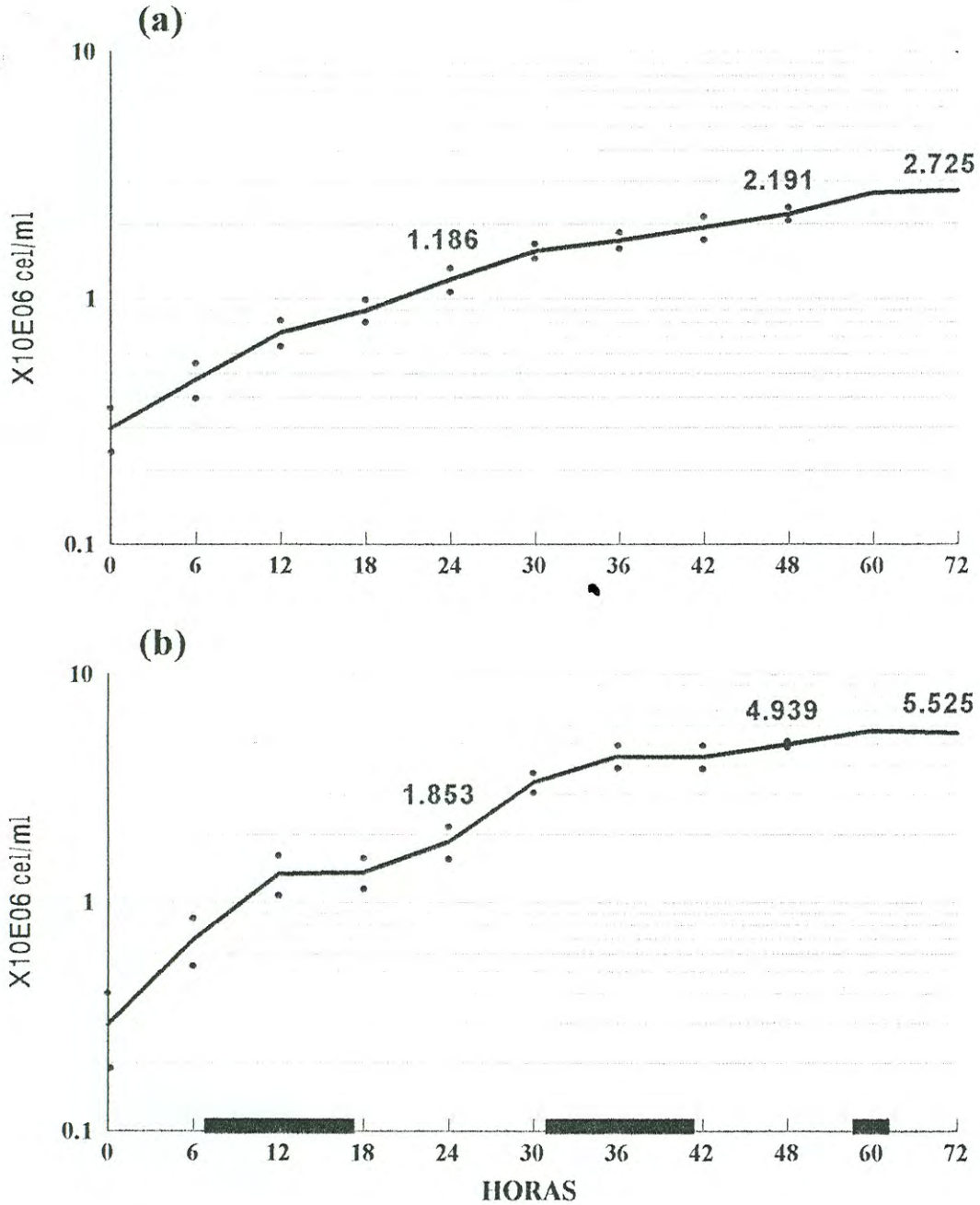
### V.1.1.3. Primavera.

En primavera el crecimiento al interior fue ascendiendo suavemente desde  $1.186 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs a  $2.191 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hrs hasta llegar a  $2.725 \times 10^6$  cel/ml a las 72 hrs del cultivo (Fig. 6a), el crecimiento promedio obtenido a las 48 hrs es superior al reportado por Tinoco-Villa (1996) bajo condiciones similares ( $1.790 \times 10^6$  cel/ml).

La tasa de crecimiento a las 24 hrs fue de 2.017 div/día, con tendencia a disminuir con 0.891 div/día y 0.368 div/día a las 48 y 72 hrs respectivamente. El alto valor de tasa de duplicación a las 24 hrs es similar a lo reportado por Tinoco-Villa (1996). El aumento del número de células por ml del segundo al tercer día fue solo de un 24.37%, lo cual aumenta los gastos de producción del sistema de cultivo de microalgas en el CREMES.

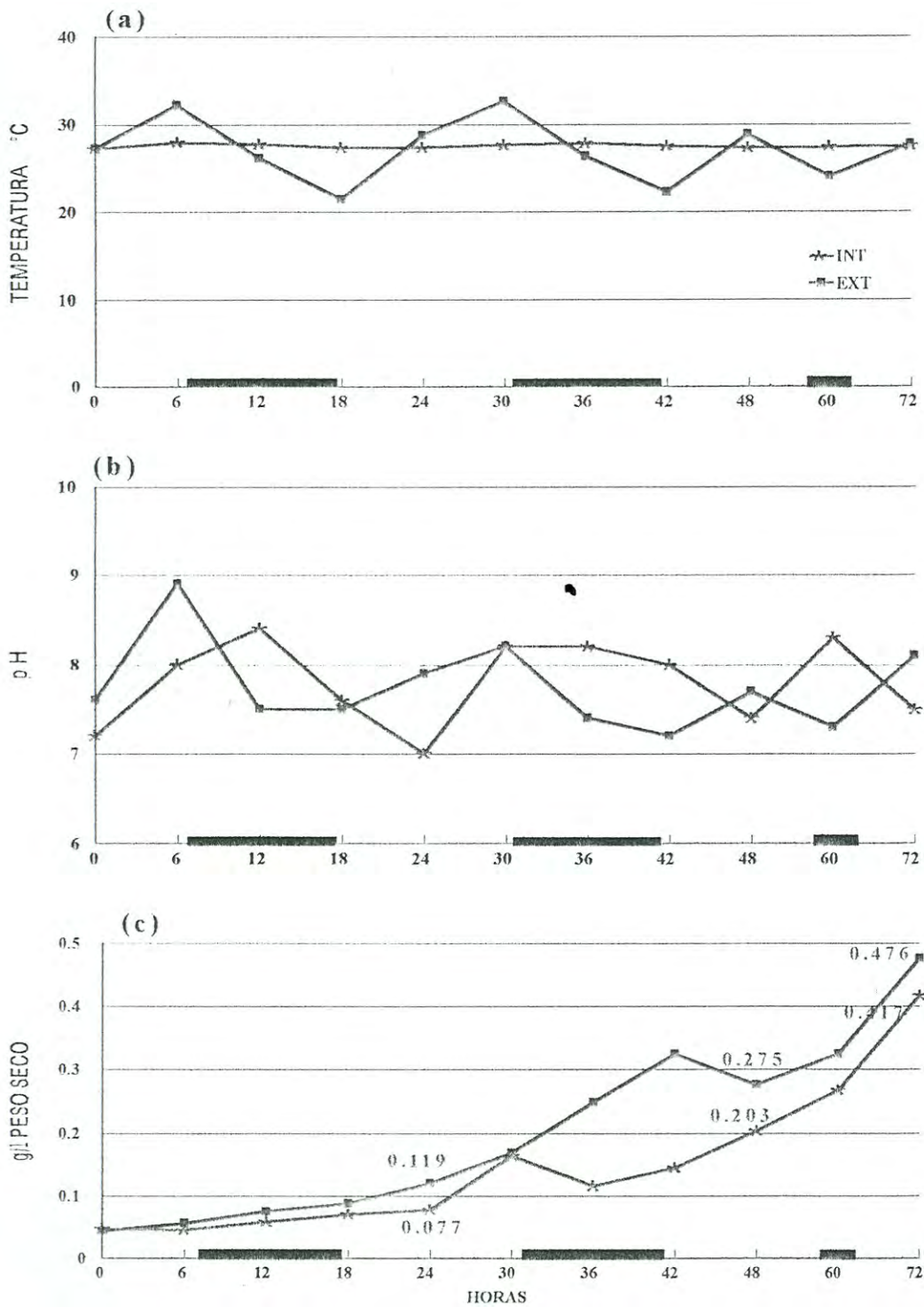
Las condiciones del cultivo se mantuvieron estables entre 27.2 y 27.9°C (Fig. 7a) y 7.0 a 8.4 unidades de pH (Fig. 7b). El peso seco obtenido en estos cultivos fue de 0.077, 0.203 y 0.417 g/l para el primer, el segundo y el tercer día (Fig. 7c), donde el incremento registrado entre las 48 y 72 hrs corresponde a 105.42%.

Al exterior en los cultivos fueron creciendo de forma consistente hasta obtenerse un promedio de  $1.853 \times 10^6$  cel/ml a las 24 hrs y de  $4.939 \times 10^6$  cel/ml a las 48 hrs de cultivo para finalizar con  $5.525 \times 10^6$  cel/ml al tercer día de cultivo (Fig. 6b), el crecimiento alcanzado a las 48 hrs es un 40% mayor al reportado por Tinoco-Villa (1996) con  $2.964 \times 10^6$  cel/ml y tan solo un 24% por arriba al registrado por Torres-Rodríguez (1997) con  $3.71 \times 10^6$  cel/ml para condiciones similares de cultivo de la misma especie de diatomea.



**Figura 6.** Concentración celular promedio de cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* para la estación de primavera, donde: (a) cultivos al interior y (b) cultivos al exterior ■ Horas oscuridad • Desviación estándar.





**Figura 7.** Cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* en primavera, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco. Horas oscuridad.

La tasa máxima de crecimiento fue a las 24 hrs con 2.77 div/día, decreciendo hasta 1.43 div/día a las 48 hrs y 0.26 div/día al final del cultivo. Tinoco-Villa (1996) también para esta condición reporta valores similares para la tasa de duplicación a las 24 hrs. En este caso el aumento del número de células por ml entre el segundo y tercer día fue solo del 11.87%, lo cual aunado a la alta concentración celular encontrada para las 48 hrs, significa que no es necesario un día más del cultivo al exterior. Los cultivos al exterior a las 48 hrs son superiores en cuanto a la producción celular en un 125.42% comparado a lo observado en los cultivos al interior.

Las condiciones del cultivo fluctuaron tanto para temperatura como pH, entre 21.4 a 32.6°C y de 7.2 a 8.9, respectivamente (Fig. 7a y b). En esta condición de cultivo se alcanzó para las 24 hrs 0.119 g/l, a las 48 hrs una producción de 0.275 g/l de peso seco de las microalgas y de 0.476 g/l para las 72 hrs (Fig. 7c), donde el aumento observado entre las 48 y 72 hrs es de 73.09% y al compara los valores de peso seco a las 48 hrs entre ambas condiciones de cultivo se observa que los cultivos al exterior son mayores en un 35.47%.

Para esta estación del año se registraron las incidencias luminosas más altas durante los periodos de cultivos en columnas de la microalga *Chaetoceros muelleri* en comparación con las otras dos estaciones, presentando una fluctuación desde 7521 a 8276 Wm<sup>2</sup> (Tabla 7).

**Tabla 7.** Intensidad luminosa registrada para primavera durante los cultivos en columna.

DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP Wm <sup>2</sup>		2 <sup>DO</sup> EXP Wm <sup>2</sup>	PROM. Wm <sup>2</sup>
0	10-Abril-96	7521	17-Abril-96	7886	7703.5
1	11-Abril-96	7605	18-Abril-96	7788	7696.5
2	12-Abril-96	7591	19-Abril-96	7934	7762.5
3	13-Abril-96	7542	20-Abril-96	8276	7909.0

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.

#### V.1.1.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.

Las máximas producciones de biomasa a las 48 hrs, tanto al interior como al exterior, fueron en primavera, seguidas por las de verano e invierno, lo cual es un reflejo del efecto de la temperatura, que no es tan extrema en primavera. Verano al interior guarda una posición intermedia debido al control de la temperatura en el área de cultivo (Tabla 8).

La máxima tasa de crecimiento se presentó invariablemente para ambas condiciones de cultivo a las 24 hrs, aunque fue significativamente mayor en primavera y en verano que en condiciones de invierno, posiblemente debido a las bajas temperaturas que suelen presentarse en dicha estación climática, que afectan sobre todo los cultivos llevados a cabo al exterior. Para las tasas de crecimiento a las 48 hrs, no se presentaron diferencias significativas para los cultivos al interior, lo cual puede ser atribuido a una limitación de luz causada por el autosombreado debido al crecimiento mismo de las microalgas, cuyo efecto es más notorio al interior debido a que la luz proporcionada por las lámparas en el laboratorio es entre el 0.32 y el 0.69% de la medida al exterior. Los cultivos al exterior a las 48 hrs presentan el mismo comportamiento estadístico que el observado en las tasas de crecimiento a las 24 hrs (Tabla 8).

En cuanto a la producción de biomasa en términos de peso seco, los valores más bajos se registraron durante el invierno tanto al interior como al exterior, a las 48 hrs y las diferencias, aunque con algunos traslapes, fueron en general significativas. En cuanto a los valores registrados a las 72 hrs, es notoria la tendencia a valores mayores de los registrados el día anterior, en condición de invierno y de primavera, mientras que en verano los cultivos decayeron al interior y se mantuvieron aproximadamente constantes al exterior (Tabla 9).

**Tabla 8.** Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10<sup>6</sup>/ml) y tasas de duplicación (divisiones/día) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas con respecto a las estaciones climáticas.

		VERANO	INVIERNO	PRIMAVERA
CONCENTRACIÓN CELULAR 48 hrs	INTERIOR Q=2.39 p<0.05	1.402 <sup>ab</sup> (0.203)	1.082 <sup>a</sup> (0.115)	2.191 <sup>b</sup> (0.148)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	1.821 <sup>a</sup> (0.240)	1.149 <sup>a</sup> (0.716)	4.939 <sup>b</sup> (0.166)
TASAS DE DUPLICACIÓN 24 hrs	INTERIOR F= 4.13 p<0.037	2.231 <sup>b</sup> (0.329)	1.660 <sup>a</sup> (0.348)	2.017 <sup>ab</sup> (0.363)
	EXTERIOR F=17.19 p<0.001	2.014 <sup>b</sup> (0.488)	0.898 <sup>a</sup> (0.646)	2.769 <sup>b</sup> (0.521)
TASAS DE DUPLICACIÓN 48 hrs	INTERIOR F=1.41 p<0.28	1.140 <sup>a</sup> (0.317)	1.015 <sup>a</sup> (0.276)	0.891 <sup>a</sup> (0.151)
	EXTERIOR F=25.98 p<0.001	1.736 <sup>b</sup> (0.279)	0.865 <sup>a</sup> (0.087)	1.433 <sup>b</sup> (0.224)
TASAS DE DUPLICACIÓN 72 hrs	INTERIOR	0.245	0.631	0.368
	EXTERIOR	0.839	0.916	0.264

NOTA: Los valores de las tasas de crecimiento a las 72 hrs no fueron tratados estadísticamente. Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

**Tabla 9.** Peso seco promedio de los cultivos en columnas de *Chaetoceros muelleri* para las distintas estaciones climáticas.

		VERANO	INVIERNO	PRIMAVERA
PESO SECO g/l 48 hrs	INTERIOR F=16.56 p<0.0001	0.225 <sup>b</sup> (0.0402)	0.164 <sup>a</sup> (0.0322)	0.203 <sup>ab</sup> (0.0294)
	EXTERIOR F=51.40 p<0.0001	0.277 <sup>ab</sup> (0.0440)	0.116 <sup>a</sup> (0.0166)	0.275 <sup>b</sup> (0.0484)
PESO SECO g/l 72 hrs	INTERIOR	0.154	0.283	0.417
	EXTERIOR	0.280	0.247	0.476

NOTA: Los valores de peso seco a las 72 hrs no fueron tratados estadísticamente.  
Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

#### **V.1.1.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.**

A las 48 hrs de cultivo se encontró que la producción en base al número de células fue significativamente mayor al exterior en verano y en primavera y solo en invierno no hubo diferencias significativas (Tabla 10), por lo cual los cultivos al exterior ofrecen mayores ventajas que los cultivos tradicionales, dado que se eliminan completamente los costos en energía eléctrica para el alumbrado y la climatización ambiental.

Las tasas de crecimiento a las 24 hrs de los cultivos al exterior en primavera son significativamente mayores, mientras que en invierno fueron mayores al interior, lo cual es posiblemente un efecto de las bajas temperaturas, que afectan el desarrollo de los cultivos al exterior. En verano, no se encontraron diferencias significativas. Las tasas de duplicación a las 48h registran valores mayores significativamente para los cultivos al exterior durante verano y primavera y en invierno no se presentan diferencias significativas (Tabla 10).

Los valores de peso seco fueron significativamente mayores en los cultivos al exterior para verano y primavera y en invierno fueron mayores al interior (Tabla 11).

**Tabla 10.** Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10<sup>6</sup>/ml) y tasas de duplicación (divisiones/día) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas con respecto a las condiciones de cultivo.

		INTERIOR	EXTERIOR
CONCENTRACIÓN CELULAR 48 hrs	VERANO t=3.27 p<0.01	1.402 <sup>a</sup> (0.203)	1.821 <sup>b</sup> (0.240)
	INVIERNO t=0.23 p<0.83	1.082 <sup>a</sup> (0.115)	1.149 <sup>a</sup> (0.716)
	PRIMAVERA t=30.21 p<0.001	2.191 <sup>a</sup> (0.148)	4.939 <sup>b</sup> (0.166)
TASAS DE DUPLICACIÓN 24 hrs	VERANO t=0.90 p<0.4	2.231 <sup>a</sup> (0.329)	2.014 <sup>a</sup> (0.488)
	INVIERNO t=2.54 p<0.1	1.660 <sup>b</sup> (0.348)	0.898 <sup>a</sup> (0.646)
	PRIMAVERA t=2.90 p<0.1	2.017 <sup>a</sup> (0.363)	2.769 <sup>b</sup> (0.521)
TASAS DE DUPLICACIÓN 48 hrs	VERANO t=3.46 p<0.01	1.140 <sup>a</sup> (0.317)	1.736 <sup>b</sup> (0.279)
	INVIERNO t=1.27 p<0.24	1.015 <sup>a</sup> (0.276)	0.865 <sup>a</sup> (0.087)
	PRIMAVERA t=4.92 p<0.001	0.891 <sup>a</sup> (0.151)	1.433 <sup>b</sup> (0.224)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.



**Tabla 11.** Peso seco promedio de cultivos en columnas a las 48 hrs de *Chaetoceros muelleri* para las dos condiciones de cultivo en las tres estaciones climáticas.

		INTERIOR	EXTERIOR
PESO SECO g/l	VERANO t=3.23 p<0.003	0.225 <sup>a</sup> (0.040)	0.277 <sup>b</sup> (0.044)
	INVIERNO t=5.15 p<0.0001	0.164 <sup>b</sup> (0.032)	0.116 <sup>a</sup> (0.017)
	PRIMAVERA t=5.36 p<0.0001	0.203 <sup>a</sup> (0.029)	0.275 <sup>b</sup> (0.048)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

## V.1.2. Tanques.

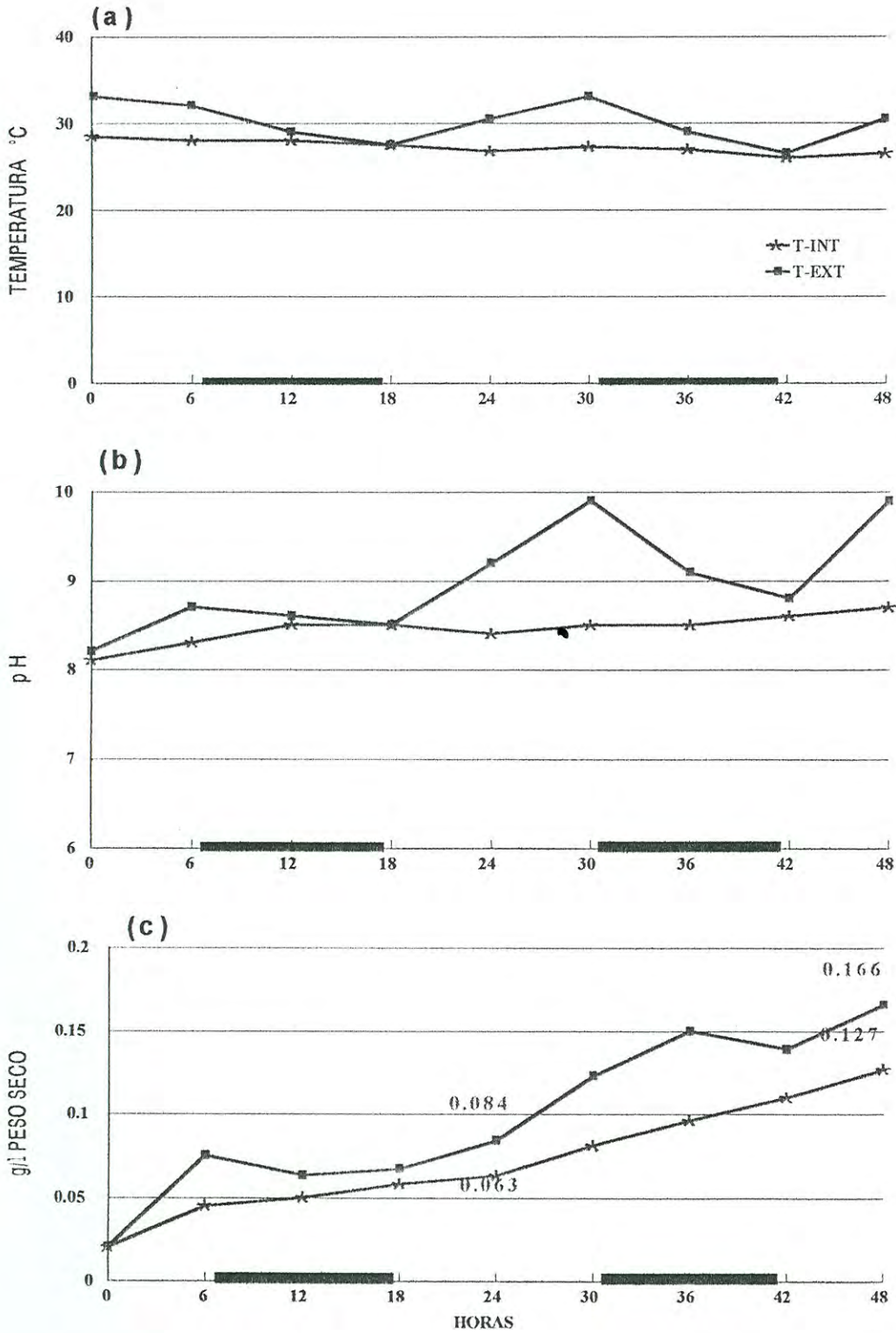
### V.1.2.1. Verano.

Los cultivos al interior en verano tuvieron un crecimiento lento, con un registro promedio a las 24 hrs de  $0.417 \times 10^6$  cél/ml y para las 48 hrs de  $0.743 \times 10^6$  cél/ml (Fig. 8a), Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo (1996) reportaron un crecimiento mayor ( $1.123 \times 10^6$  cél/ml) al alcanzado en este estudio a las 48 hrs.

La máxima tasa de duplicación fue a las 24 hrs con 1.71 div/día y fue menor para las 48 hrs, con 0.869 div/día. Las variaciones en las condiciones de cultivo no fueron amplias ya que la temperatura varió entre 26.0 y 28.5°C (Fig. 9a) y el pH de 8.1 a 8.7 (Fig. 9b). Al interior se obtuvieron también bajos valores de peso seco, que fueron de 0.063 g/l a las 24 hrs y de 0.127 g/l al día siguiente (Fig. 9c).

El crecimiento del cultivo fue mas rápido al exterior, con  $0.590$  y  $1.490 \times 10^6$  cél/ml para las 24 y 48 horas respectivamente (Fig. 8b); no se registraron cambios de la velocidad de crecimiento durante las horas de oscuridad. Borbón-Muñoz y Victoria-Gallardo (1996) reportan un crecimiento mayor ( $1.525 \times 10^6$  cél/ml) para las 48 hrs bajo condiciones similares. Al comparar la concentración celular de los cultivos al exterior a las 48 hrs estos fueron superiores en un 100.53%, que lo observado en los cultivos al interior.

La máxima tasa de duplicación fue a las 24 hrs con 2.090 div/día y se mantuvo relativamente elevada hasta las 48 hrs, con 1.347 div/día. La temperatura y el pH variaron ampliamente, desde 26.5 a 33.0°C y de 8.2 a 9.9, respectivamente (Fig. 9a y b). Los valores de peso seco fueron mayores al exterior que los del interior, a las 24 hrs se alcanzaron valores



**Figura 9.** Cultivos en tanques de *Chaetoceros muelleri* en verano, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco. ■ Horas oscuridad.

de 0.084 g/l y de 0.166 g/l a las 48 hrs (Fig. 9c), al comparar los valores de peso seco entre las condiciones de cultivo a las 48 hrs se observa que los cultivos al exterior fueron superiores en un 30.71% a los del interior. La incidencia luminosa para este periodo de cultivo vario entre 5410 y 6626 Wm<sup>2</sup> (Tabla 12).

**Tabla 12.** Intensidad luminosa registrada para verano durante los cultivos en tanques.

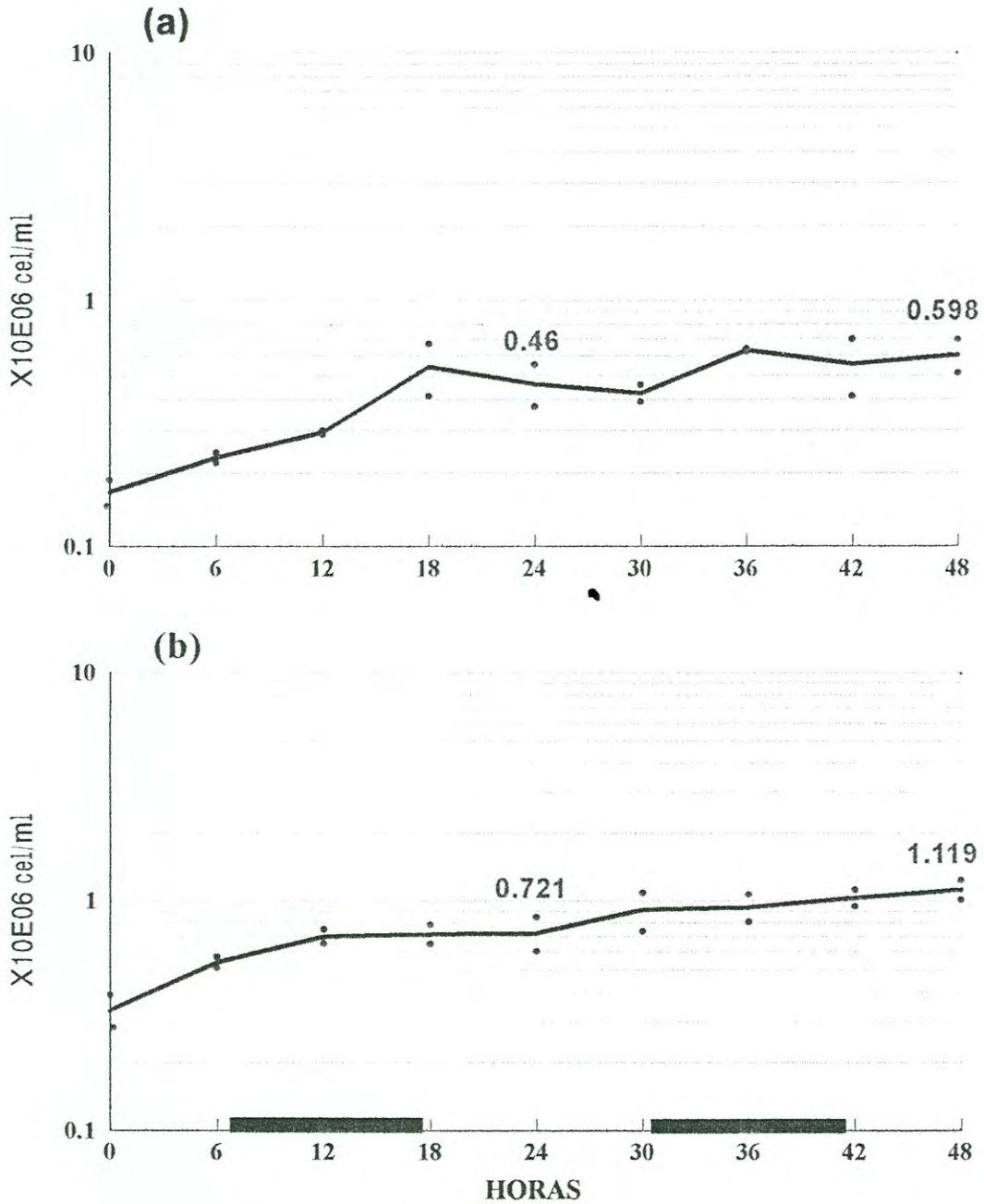
DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP Wm <sup>2</sup>		2 <sup>DO</sup> EXP Wm <sup>2</sup>	PROM. Wm <sup>2</sup>
0	12-Sept-95	6626	22-Sept-95	6376	6501.0
1	13-Sept-95	6611	23-Sept-95	6150	6380.5
2	14-Sept-95	5849	24-Sept-95	5410	5629.5

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.

### V.1.2.2. Invierno.

Durante el invierno se registra el menor crecimiento para los cultivos al interior, que alcanzaron solamente 0.460 y 0.598X10<sup>6</sup> cél/ml a las 24 y 48 hrs de cultivo, respectivamente (Fig. 10a), el crecimiento alcanzado a las 48 hrs representa tan solo el 52.97% del valor reportado para condiciones similares de cultivo de la microalga *Chaetoceros muelleri*, con 1.129X10<sup>6</sup> cél/ml por Tinoco-Villa (1996).

A las 24 hrs se registró la máxima tasa de crecimiento con 1.459 div/día, disminuyendo a 0.444 div/día para las 48 hrs. Las condiciones de cultivo permanecieron estables; la temperatura se mantuvo entre 20.3 y 21.3°C (Fig. 11a) y el H entre 8.2 a 8.3 (Fig. 11b).



**Figura 10.** Concentración celular promedio de cultivos en tanques de *Chaetoceros muelleri* para la estación de invierno, donde: (a) cultivos al interior y (b) cultivos al exterior ■ Horas oscuridad • Desviación estándar.

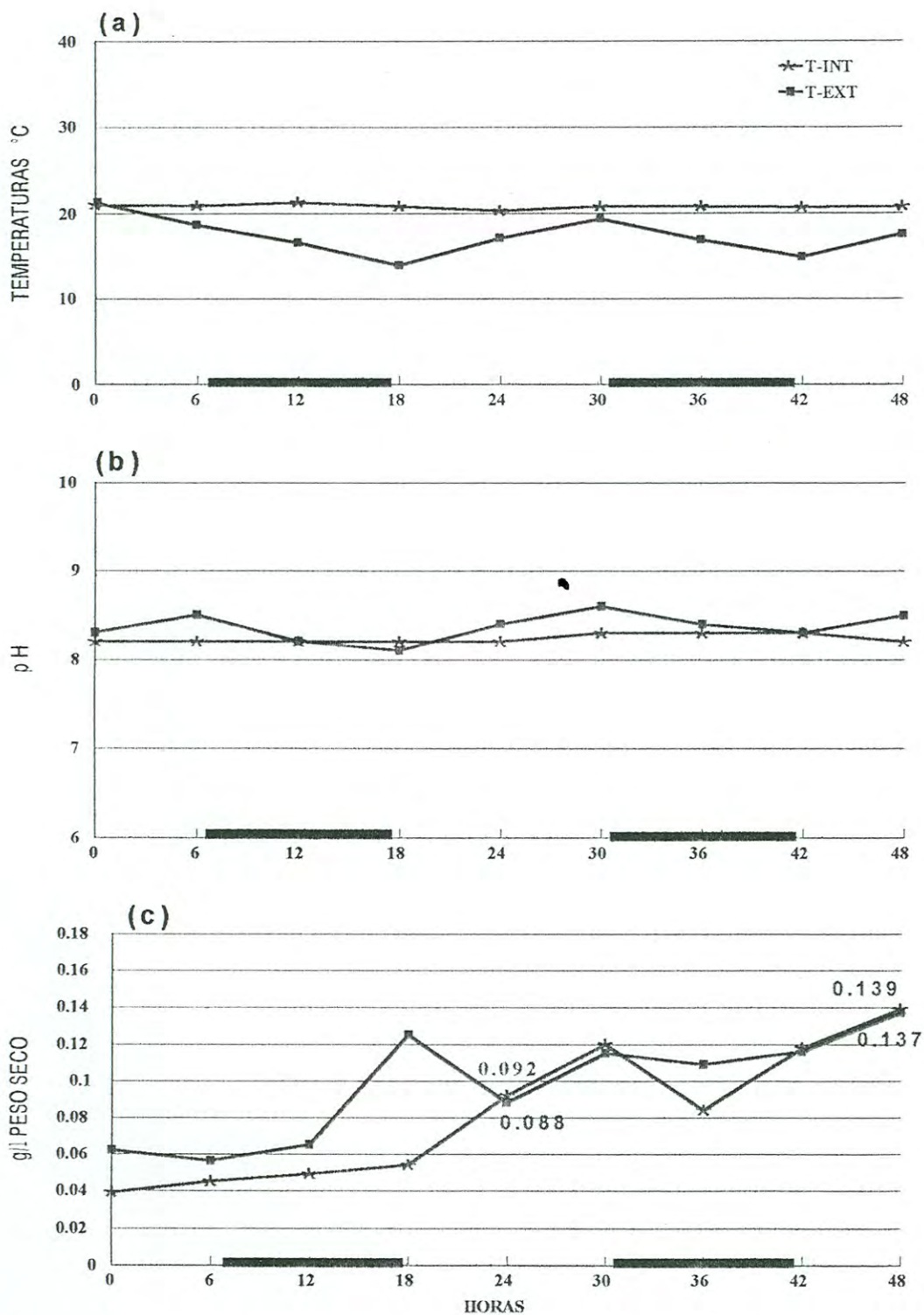


Figura 11. Cultivos en tanques de *Chaetoceros muelleri* en invierno, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco. ■ Horas oscuridad.

Los valores de peso seco tienden a subir lentamente las primeras 18 horas de cultivo, para después aumentar rápidamente por lo que a las 24 hrs se obtuvieron valores de 0.092 g/l y a las 48 hrs de 0.139 g/l (Fig. 11c).

En los cultivos al exterior la concentración celular fue ascendiendo suavemente hasta llegar a  $0.721$  y  $1.119 \times 10^6$  cél/ml para las 24 y 48 hrs, respectivamente (Fig. 10b), en forma inversa al comportamiento de los cultivos al interior, el crecimiento alcanzado en los cultivos al exterior a las 48 hrs fueron mayores un 35.12% a lo reportado por Tinoco-Villa (1996) con  $0.726 \times 10^6$  cél/ml bajo condiciones similares. La producción celular en los cultivos al exterior a las 48 hrs se mostraron superiores un 87.12% en comparación a los cultivos al interior.

La mayor tasa de duplicación para estos cultivos se obtuvo a las 24 hrs con 1.112 div/día que descendió a las 48 hrs, con 0.648 div/día. La temperatura varió ampliamente entre  $13.8$  y  $21.3^\circ\text{C}$  (Fig. 11a), con los valores menores registrados en las últimas horas de la noche; para el pH el intervalo fue de 8.1 a 8.6 (Fig. 11b). Al exterior el peso seco registró valores de 0.088 g/l a las 24 hrs y de 0.137 g/l a las 48 hrs (Fig. 11c), al comparar los valores de peso seco entre ambas condiciones de cultivo se pudo observar que los cultivos al interior fueron superiores tan solo 1.44% a los del exterior a las 48 hrs. La incidencia luminosa para este experimento fluctuó entre 3918 y 4755  $\text{Wm}^2$  (Tabla 13).

**Tabla 13.** Intensidad luminosa registrada para invierno durante los cultivos en tanques.

DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP Wm <sup>2</sup>		2 <sup>DO</sup> EXP Wm <sup>2</sup>	PROM. Wm <sup>2</sup>
0	25-Enero-96	4702	01-Enero-96	3918	4310.0
1	26-Enero-96	4755	02-Enero-96	4293	4524.0
2	27-Enero-96	4635	03-Enero-96	3978	4306.5

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.

### V.1.2.3. Primavera.

En primavera el crecimiento de *Chaetoceros muelleri* al interior fue lento, alcanzando un promedio de  $0.647 \times 10^6$  cél/ml a las 24 hrs y de  $0.964 \times 10^6$  cél/ml a las 48 hrs (Fig. 12a), el valor promedio de crecimiento a las 48 hrs fue similar al reportado por Tinoco-Villa (1996) con  $0.968 \times 10^6$  cél/ml.

La máxima tasa de duplicación se registró a las 24 hrs con 1.263 div/día, descendiendo a 0.57 div/día para el segundo día. Las temperaturas de los cultivos se mantuvieron aproximadamente estables, entre 23.0 y 24.3°C (Fig. 13a) y el pH registró fluctuaciones entre 8.0 y 8.5 (Fig. 13b). La mayor parte del tiempo de cultivo los valores de peso seco fueron ascendentes, con 0.076 g/l a las 24 hrs y 0.112 g/l a las 48 hrs (Fig. 13c).

Al exterior el crecimiento fue más rápido que al interior: a las 24 hrs se obtuvo un promedio de  $0.571 \times 10^6$  cél/ml y de  $1.332 \times 10^6$  cél/ml a las 48 hrs (Fig. 12b), nuevamente sin que la oscuridad tuviera influencia sobre el crecimiento; el crecimiento observado a las 48 hrs



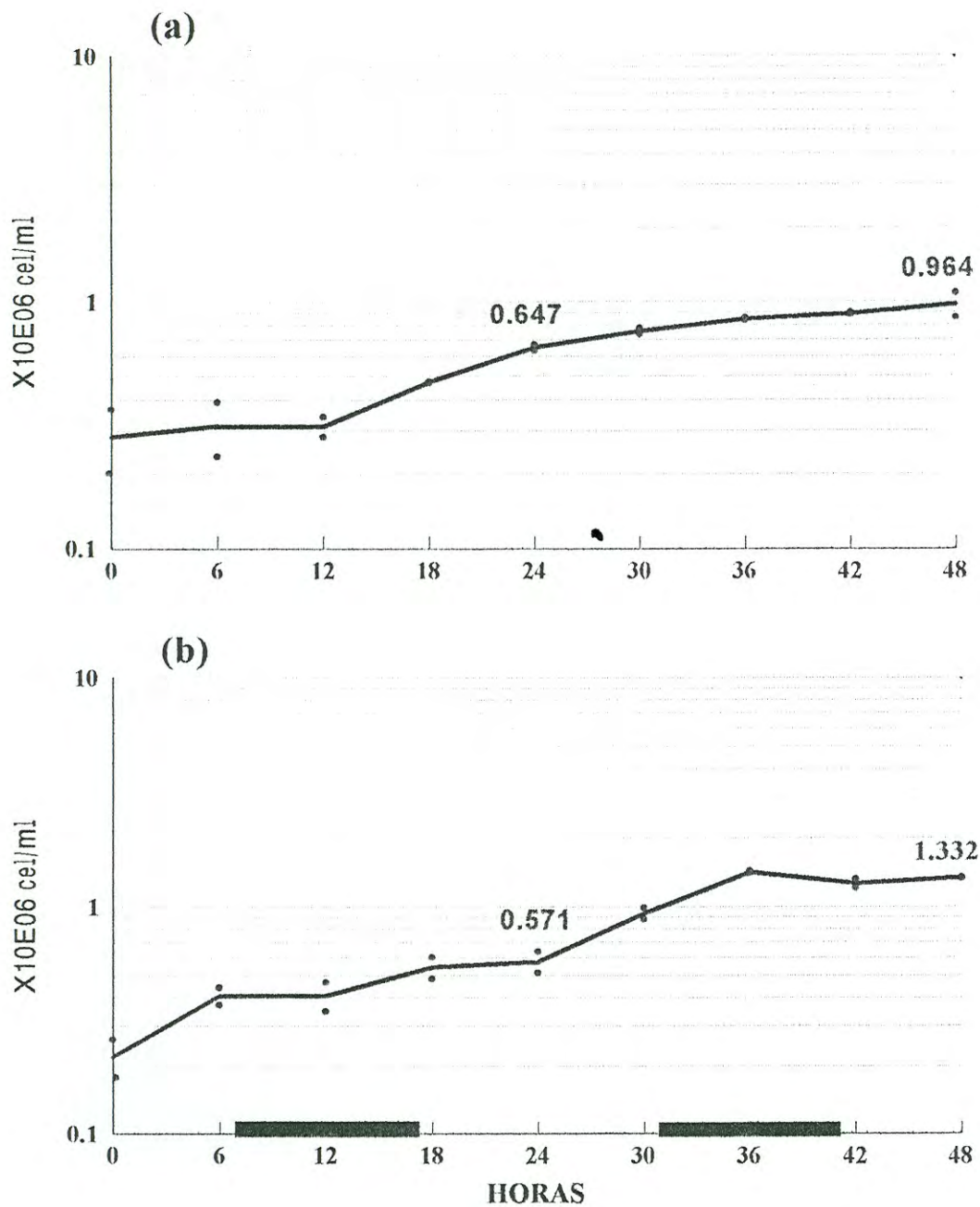
fue menor al reportado por Tinoco-Villa (1996) con  $1.945 \times 10^6$  cél/ml. Los cultivos al exterior mostraron una producción celular mayor en un 38.17% a lo observado en los cultivos al interior a las 48 hrs.

La máxima tasa de duplicación se presentó a las 24 hrs y descendió hacia las 48 hrs con 1.404 y 1.230 div/día, respectivamente. La temperatura y el pH variaron ampliamente, de 17.0 a 25.5°C y de 8.1 a 9.8, respectivamente (Fig. 13a y b). Al exterior, el peso seco tuvo una tendencia ascendente y similar a la registrada al interior hasta las 30 hrs; después de ese muestreo la biomasa aumentó más rápidamente al exterior, con un descenso después del penúltimo muestreo, de forma tal que a las 24 y a las 48 hrs se registraron valores similares que al interior de 0.065 g/l y 0.132 g/l, respectivamente (Fig. 13c), la producción de biomasa en base a peso seco fue 17.86% superior en los cultivos al exterior a las 48 hrs en comparación a los cultivos al interior. La incidencia luminosa registrada durante el periodo de este experimento fluctuó entre 7542 a 8276  $Wm^2$  (Tabla 14).

**Tabla 14.** Intensidad luminosa registrada para primavera durante los cultivos en tanques.

DÍA		1 <sup>ER</sup> EXP Wm <sup>2</sup>		2 <sup>DO</sup> EXP Wm <sup>2</sup>	PROM. Wm <sup>2</sup>
0	12-Abril-96	7591	19-Abril-96	7934	7762.5
1	13-Abril-96	7542	20-Abril-96	8276	7909.0
2	14-Abril-96	7792	21-Abril-96	8069	7930.5

Fuente: Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.



**Figura 12.** Concentración celular promedio de cultivos en tanques de *Chaetoceros muelleri* para la estación de primavera, donde: (a) cultivos al interior y (b) cultivos al exterior. ■ Horas oscuridad • Desviación estándar.

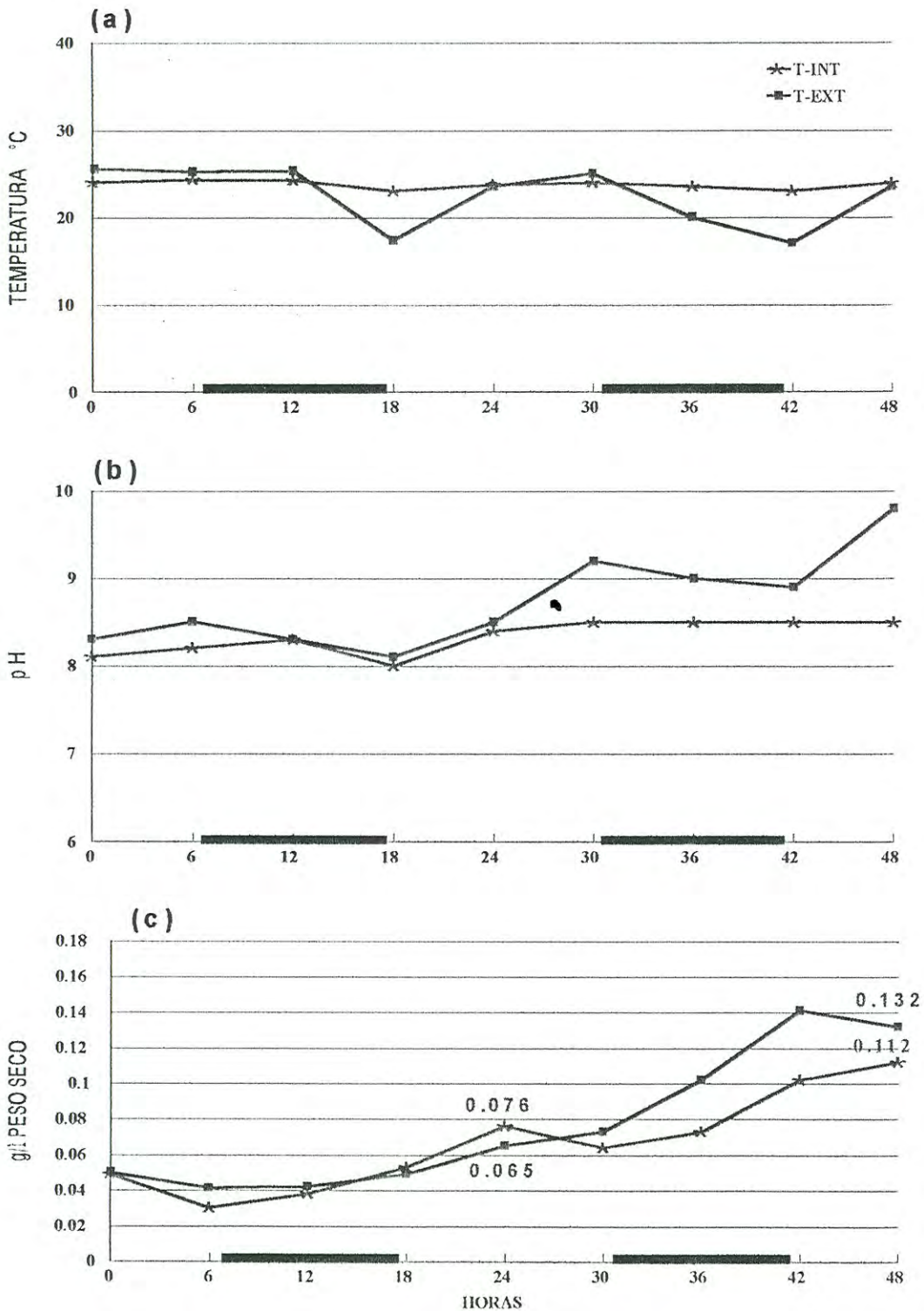


Figura 13. Cultivos en tanques de *Chaetoceros muelleri* en primavera, donde: (a) temperatura, (b) pH y (c) peso seco. ■ Horas oscuridad.

#### V.1.2.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.

Se encontraron diferencias significativas entre las tres estaciones climáticas al interior, donde se obtuvo la menor producción en invierno y la mayor en primavera. Los cultivos el exterior no presentaron diferencias significativas entre las estaciones climáticas (Tabla 15).

En cuanto a las tasas de crecimiento, éstas fueron máximas a las 24 hrs, invariablemente al interior como al exterior. No se notaron diferencias estacionales significativas en los cultivos al interior, tanto para las 24 como para las 48 hrs. Al exterior no se presentaron diferencias para las tasas de duplicación a las 24 hrs, pero a las 48 hrs se registraron valores significativamente mayores tanto en verano como en primavera (Tabla 15).

El peso seco presentó valores significativamente más altos al interior durante el invierno y al exterior éstos se dieron en la estación de verano (Tabla 15).

**Tabla 15.** Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10<sup>6</sup>/ml), tasas de duplicación (divisiones/día) y peso seco para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques con respecto a las estaciones climáticas.

		VERANO	INVIERNO	PRIMAVERA
CONCENTRACIÓN CELULAR 48 hrs	INTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.743 <sup>ab</sup> (0.016)	0.598 <sup>a</sup> (0.105)	0.964 <sup>b</sup> (0.129)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	1.490 <sup>a</sup> (0.324)	1.119 <sup>a</sup> (0.128)	1.332 <sup>a</sup> (0.010)
TASAS DE DUPLICACIÓN 24 hrs	INTERIOR Q= 2.39 p<0.05	1.711 <sup>a</sup> (0.458)	1.459 <sup>a</sup> (0.530)	1.263 <sup>a</sup> (0.545)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	2.090 <sup>a</sup> (0.315)	1.112 <sup>a</sup> (0.015)	1.404 <sup>a</sup> (0.499)
TASAS DE DUPLICACIÓN 48 hrs	INTERIOR F=1.43 p<0.3	0.869 <sup>a</sup> (0.348)	0.444 <sup>a</sup> (0.512)	0.565 <sup>a</sup> (0.145)
	EXTERIOR F=32.03 p<0.001	1.347 <sup>b</sup> (0.056)	0.648 <sup>a</sup> (0.116)	1.230 <sup>b</sup> (0.189)
PESO SECO g/l 48 hrs	INTERIOR F=4.52 p<0.035	0.127 <sup>ab</sup> (0.013)	0.139 <sup>b</sup> (0.021)	0.112 <sup>a</sup> (0.004)
	EXTERIOR F=12.62 p<0.001	0.166 <sup>b</sup> (0.015)	0.137 <sup>a</sup> (0.011)	0.132 <sup>a</sup> (0.010)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

#### **V.1.2.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.**

Los resultados de la concentración celular a las 48 hrs que se obtuvieron durante las tres estaciones del año fueron significativamente superiores al exterior (Tabla 16). Al igual que para los cultivos en columnas, la información que se obtuvo con los cultivos en los tanques refuerza la opinión de que los cultivos al exterior son de gran utilidad, ya que se obtienen mayores producciones de biomasa y al mismo tiempo se disminuyen los costos de producción.

En las tasas de duplicación a las 24 hrs no se encontraron diferencias entre las condiciones de cultivo, pero a las 48 hrs los cultivos al exterior en verano y primavera tuvieron crecimientos significativamente mayores que los del interior y solamente en invierno no se encontraron diferencias significativas (Tabla 16).

Los cultivos al exterior presentaron además una mayor producción de biomasa en términos de peso seco durante el verano y la primavera y solo en invierno no se registraron diferencias entre los cultivos del interior y los del exterior (Tabla 16).

**Tabla 16.** Concentración celular promedio a las 48 hrs (célX10<sup>6</sup>/ml), tasas de duplicación (divisiones/día) y peso seco para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques con respecto a la condición de cultivo.

		INTERIOR	EXTERIOR
CONCENTRACIÓN CELULAR 48 hrs	VERANO t=4.62 p<0.004	0.743 <sup>a</sup> (0.016)	1.490 <sup>b</sup> (0.324)
	INVIERNO t=6.31 p<0.001	0.598 <sup>a</sup> (0.105)	1.119 <sup>b</sup> (0.128)
	PRIMAVERA t=5.70 p<0.002	0.964 <sup>a</sup> (0.129)	1.332 <sup>b</sup> (0.010)
TASAS DE DUPLICACIÓN 24 hrs	VERANO t=1.36 p<0.3	1.711 <sup>a</sup> (0.458)	2.090 <sup>a</sup> (0.315)
	INVIERNO t=1.31 p<0.3	1.459 <sup>a</sup> (0.530)	1.112 <sup>a</sup> (0.015)
	PRIMAVERA t=0.38 p<0.8	1.263 <sup>a</sup> (0.545)	1.404 <sup>a</sup> (0.499)
TASAS DE DUPLICACIÓN 48 hrs	VERANO t=2.71 p<0.04	0.869 <sup>a</sup> (0.348)	1.347 <sup>b</sup> (0.056)
	INVIERNO t=0.78 p<0.5	0.444 <sup>a</sup> (0.512)	0.648 <sup>a</sup> (0.116)
	PRIMAVERA t=5.58 p<0.002	0.565 <sup>a</sup> (0.145)	1.230 <sup>b</sup> (0.189)
PESO SECO g/l 48 hrs	VERANO Z=2.33 p<0.02	0.127 <sup>a</sup> (0.013)	0.166 <sup>b</sup> (0.015)
	INVIERNO Z=0 p<1	0.139 <sup>a</sup> (0.021)	0.137 <sup>a</sup> (0.011)
	PRIMAVERA Z=2.56 p<0.0106	0.112 <sup>a</sup> (0.004)	0.132 <sup>b</sup> (0.010)

NOTA: Los valores entre paréntesis son la desviación estándar.

### V.1.3. Comparaciones Generales de Biomasa en Columnas y Tanques.

En algunos centros acuícolas la producción de microalgas ha sido realizado por mucho tiempo en cultivos masivos bajo condiciones controladas, pero recientemente y cada vez con mayor frecuencia se ha iniciado a utilizar cultivos en condiciones semicontroladas en invernaderos o solarios (Chen y Long, 1991; Nelson *et al.*, 1992) y hasta al exterior (Konkeo, 1991; Lim, 1991; Park, 1991), en donde por lo general no existe la posibilidad de controlar las distintas variables que influyen de forma directa o indirecta sobre los procesos fisiológicos de las microalgas (Richardson *et al.*, 1983).

Algunos países Asiáticos como China (Chen y Long, 1991), Japón (Okauchi, 1991), Tailandia (Konkeo, 1991), Corea (Park, 1991), Taiwan (Liao, 1991) han cultivado varias especies de microalgas al exterior bajo las condiciones medioambientales prevalecientes en tanques de concreto con capacidad de volumen que van desde 10 a 200 m<sup>3</sup>, en los cuales se obtienen densidades de cosecha de  $2 \times 10^6$  cél/ml en el caso de *N. oculata*. En México, específicamente en el estado de Sonora se han obtenido producciones de *Chaetoceros muelleri* cercanas a las  $5 \times 10^6$  cél/ml a las 48 hrs (Bórbon-Muñoz y Victoria-Gallardo, 1996; Tinoco-Villa, 1996; Torres-Rodríguez, 1997 y en el presente estudio) en la primavera, superiores a lo reportado por los países Asiáticos. Además el estado de Sonora es una región donde casi no se presentan lluvias durante el año, así mismo por su localización geográfica es una zona protegida a huracanes, lo que ayuda al buen éxito de cultivos al exterior, pero presenta el inconveniente de bajas temperaturas que pueden llegar a presentarse durante el invierno, por lo que la producción durante los meses más fríos puede ser limitada.



En las secciones anteriores se han realizado comparaciones y marcado diferencias en cuanto a la producción celular, a la biomasa en base a peso seco y a las tasas de crecimiento, así como los intervalos de temperatura e irradiancia dentro de los cuales se mantuvieron los cultivos de las microalgas, tanto al interior como al exterior para las tres situaciones estacionales, en los dos volúmenes de cultivo.

Probablemente el factor que hace más notables las diferencias entre las condiciones de cultivo, es la temperatura más que la irradiancia, ya que para las estaciones de verano y primavera se tuvieron lecturas elevadas y similares de irradiancia acumulada diaria y sólo en invierno éstas fueron inferiores, sin que esta diferencia pudiera explicar en su totalidad la menor producción al exterior, en un estudio realizado por Torres-Rodríguez (1997) observó un comportamiento similar. Para la temperatura en contraste se obtuvieron lecturas extremosas para el verano (altas) y el invierno (bajas), en cambio en la primavera se mostraron más estables.

En el verano y la primavera, la producción celular fue mayor en los dos volúmenes de cultivo (columna y tanque) llevados a cabo al exterior, lo cual puede ser atribuido a que las temperaturas fueron más favorables, lo cual ayuda a una mejor utilización de la energía lumínica capturada. La producción final en el verano fue ligeramente menor al de primavera; dado que la irradiancia acumulada no fue muy diferente en las dos situaciones climáticas, esta menor producción pudiera ser atribuida a una aceleración de los procesos metabólicos por el aumento de la temperatura durante ésta estación del año, causando un descenso en la eficiencia de utilización de la energía luminosa (Richardson *et al.*, 1983; Darley, 1987).

La temperatura es considerada como un factor de gran importancia para la actividad biológica de los organismos, por lo que puede ser un factor limitante en el crecimiento y producción de dichos organismos. Además tiene una importante interacción con la cantidad de irradiancia captada y con el fotoperíodo (Redaije y Laws, 1983; Mortain-Bertrand *et al.*, 1987).

En un estudio donde se compararon varios fotoperíodos contra iluminación continua para varias especies de microalgas, se encontró que para *Chaetoceros gracilis* o *C. muelleri* el fotoperíodo no tuvo un efecto muy marcado en cuanto a la producción de biomasa alcanzada (Viramontes-Robles, 1991). En base a estos resultados se puede asumir que en los centros de producción acuícola los cultivos masivos pueden ser cultivados con el fotoperíodo natural, con una producción de biomasa por lo menos similar, pero con una disminución de los costos de producción con respecto a los cultivos al interior.

En invierno, como se mencionó, se presenta una baja producción en cuanto a número de células por ml en los cultivos al exterior; considerando que existe poca diferencia en la duración de exposición a la luz y en la cantidad de energía radiante recibida en esta estación del año con respecto a las otras estaciones, la iluminación no puede ser un factor decisivo, por lo cual se puede considerar que el motivo más probable de esta baja productividad fue la baja temperatura ambiental y de los cultivos, que está relacionada a una baja eficiencia en la utilización de la energía luminosa (Darley, 1987), y que la cantidad de irradiancia acumulada tiene una importancia menor.

Los cultivos al interior presentaron en general una menor producción en cuanto a número de células probablemente no atribuible a la temperatura, sino a la baja intensidad

luminosa que se emplea en los laboratorios, por lo cual en los cultivos al interior se puede presentar en forma más marcada uno de los principales factores limitantes que es el autosombreado (Richmond, 1986), cuyo efecto se incrementa al mismo ritmo que la concentración celular, reflejándose en un rápido decremento de la tasa de crecimiento de las microalgas (Vonshak y Richmond, 1985).

Es muy probable que a esto se deba el hecho que las máximas tasas de crecimiento se alcanzaron a las 24 hrs de cultivo, similar a lo reportado para otros estudios con la misma especie de microalga (Borbón-Munoz y Victoria-Gallardo, 1996; Tinoco-Villa, 1996) y que éstas muestren un descenso conforme aumentan el tiempo y la concentración celular, en ambos sistemas y condiciones de cultivo para las tres situaciones climáticas.

Una de las respuestas al fotoperíodo o adaptación a la luz y sombra, en algunos grupos de microalgas, puede manifestarse como un cambio en el volumen celular (Falkowski y Owens, 1980), que en este caso se observa reflejado en los valores promedio de peso seco, el cual presenta el mismo comportamiento al de producción celular, además de ser otra forma de expresar la biomasa.

## V.2. Pigmentos.

### V.2.1. Comparación de Solventes.

Para la comparación de la eficiencia de extracción de los solventes acetona y dimetilsulfóxido (DMSO), se utilizaron muestras de cultivos a las 48 hrs a nivel carboy y tanques de *Chaetoceros muelleri*.

Los valores de clorofila “a” obtenidos con el DMSO resultaron significativamente mayores de los obtenidos con acetona tanto para el nivel carboy como para el de tanque (Tabla 17). En cuanto a los tiempos de extracción, también es muy marcada la diferencia, ya que la extracción con DMSO se realizó en 30 min., contra las 24 horas requeridas para el método con acetona.

Para corroborar los resultados se realizó la curva de barrido para ambos solventes, encontrándose que efectivamente los picos detectados corresponden a los de absorción de la clorofila “a” y que no existen diferencias entre las curvas (ver gráficas del Anexo II), por lo cual todos los análisis de las muestras obtenidas para el presente estudio se llevaron a cabo con el método de extracción con DMSO.

**Tabla 17.** Comparación en base a  $\text{mg/m}^3$  de clorofila “a”.

		ACETONA	DMSO
CARBOY	t=15.687 p<0.0001	45.263 <sup>a</sup> (6.387)	206.147 <sup>b</sup> (16.576)
TANQUE	t=14.006 p<0.0002	97.942 <sup>a</sup> (6.572)	431.029 <sup>b</sup> (40.664)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviación estándar.

## V.2.2. En Base a Peso Seco (%).

### V.2.2.1. Columnas.

#### V.2.2.1.1. Verano.

En base a porcentaje de peso seco la concentración de clorofila “a” de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* al interior aumentó durante las primeras 24 hrs y se mantuvo aproximadamente constante durante el segundo día con porcentajes de 0.166% y 0.129%, respectivamente. Durante el tercer día se notó un aumento rápido, hasta alcanzar valores de 0.275% (Fig. 14a). Al exterior, la concentración de clorofila “a” disminuyó durante las primeras 12 horas, para continuar con un ascenso más o menos rápido alcanzando a las 24 hrs un promedio de 0.102% y seguir aumentando en los dos días sucesivos, hasta valores de 0.147 y 0.323% a las 48 y 72 hrs, respectivamente (Fig. 14a); las horas de oscuridad aparentemente afectan la producción del pigmento, ya que se observan descensos durante estos períodos.

La clorofila “c” mostró, al igual que la clorofila “a”, una tendencia ascendente suave al interior durante los primeros dos días, con 0.047% y 0.067% a las 24 y 48 hrs, pero hacia las 72 hrs se presentó un aumento rápido, alcanzando un valor de 0.158% (Fig. 14b). Para los cultivos al exterior después de un descenso inicial se obtuvo un promedio de 0.046% a las 24 hrs y la concentración siguió aumentando hasta las 48 y 72 hrs, con 0.079 y 0.190%, respectivamente (Fig. 14b). Como en el caso de la clorofila “a”, también la producción de clorofila “c” al exterior se ve afectada por las horas de oscuridad.

Los carotenos producidos en columnas al interior alcanzan su valor máximo a las 24 hrs, con 0.00369%, para después descender hacia 0.00106% a las 48 hrs y tener un ligero aumento hacia las 72 hrs con 0.00209% (Fig. 14c). Las concentraciones fueron siempre menores en los cultivos al exterior, con 0.00235% para las 24 hrs; al igual que al interior, se presentó un ligero descenso a las 48 hrs con 0.00123% y un nuevo aumento el tercer día, alcanzando un valor de 0.00238%, (Fig. 14c).

#### **V.2.2.1.2. Invierno.**

Tanto en los cultivos al interior como al exterior la producción de clorofila “a” descendió después de la inoculación y se estabilizó hacia las primeras 6 horas de cultivo, con valores inferiores al exterior que al interior. Después de este descenso los valores de clorofila “a” se mantuvieron más o menos estables hasta el final del tercer día, en los cultivos al exterior, con valores de 0.057, 0.077 y 0.076% para las 24, 48 y 72 hrs, respectivamente y sin que se pueda apreciar un efecto de las horas de oscuridad. En el caso de los cultivos al

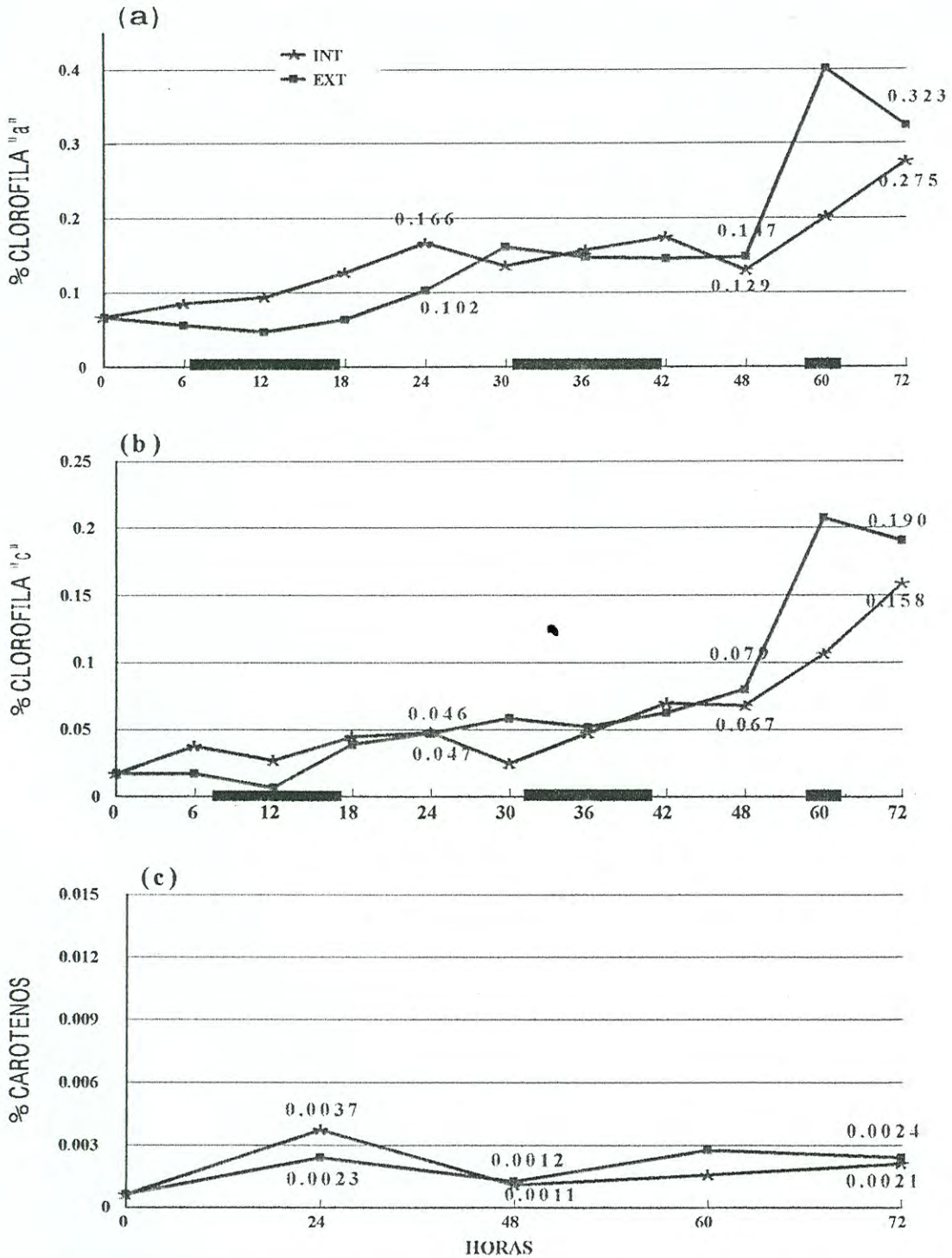


Figura 14. Promedio de pigmentos en cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas para la estación de verano, donde: (a) clorofila "a", (b) clorofila "c" y (c) carotenos. ■ Horas oscuridad.

interior, la clorofila "a" aumentó ligeramente entre las 24 y las 36 horas, desde 0.090% a cerca de 0.146%, para mantenerse estable hasta las 60 hrs y disminuir ligeramente, a 0.124%, en la parte final del experimento (Fig. 15a).

La clorofila "c" mostró el mismo comportamiento de producción que los observados para clorofila "a" tanto al interior como al exterior. Los cultivos al interior para el primer día tienen un valor promedio de 0.060%, alcanzando el valor máximo, de 0.093%, el segundo día para después disminuir hacia el tercer día con 0.072%. Los valores para los cultivos al exterior muestran un aumento ligero pero continuo durante los tres días de cultivo con 0.036, 0.043 y 0.048% para las 24, 48 y 72 hrs, respectivamente (Fig. 15b).

Las concentraciones de los carotenos de los cultivos al interior se mostraron superiores que al del exterior, al igual que los dos pigmentos anteriores. El máximo valor fue alcanzado el primer día de cultivo al interior con 0.00336%, descendiendo el segundo día (0.00203%) y con un ligero aumento hacia el tercer día, llegando a 0.00229% (Fig. 15c). Los cultivos al exterior mostraron una producción de carotenos en ascenso hasta las 24 hrs con 0.00307%, para después disminuir a 0.00169 y 0.00112% para las 48 y 72 hrs, respectivamente (Fig. 15c).



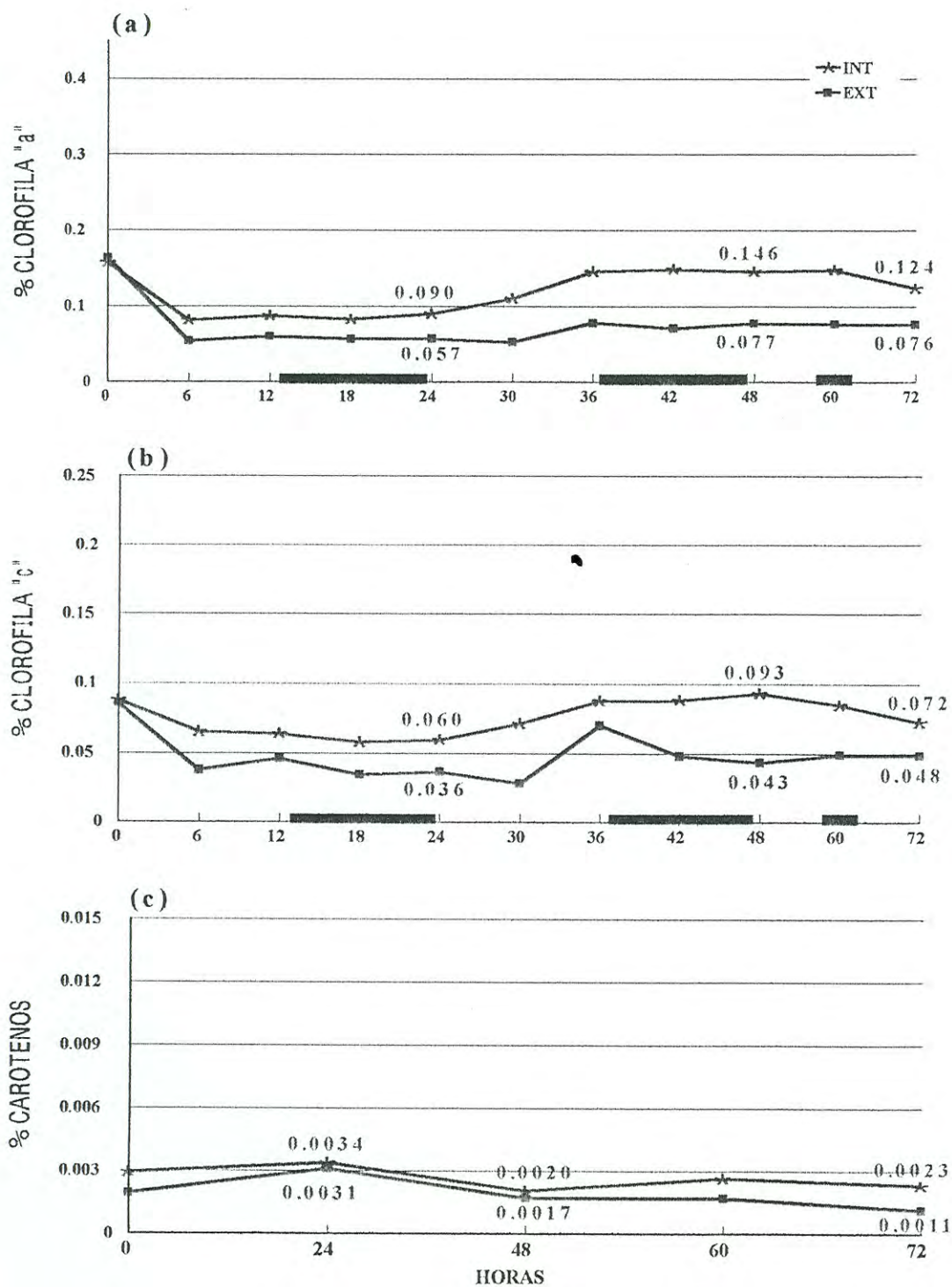


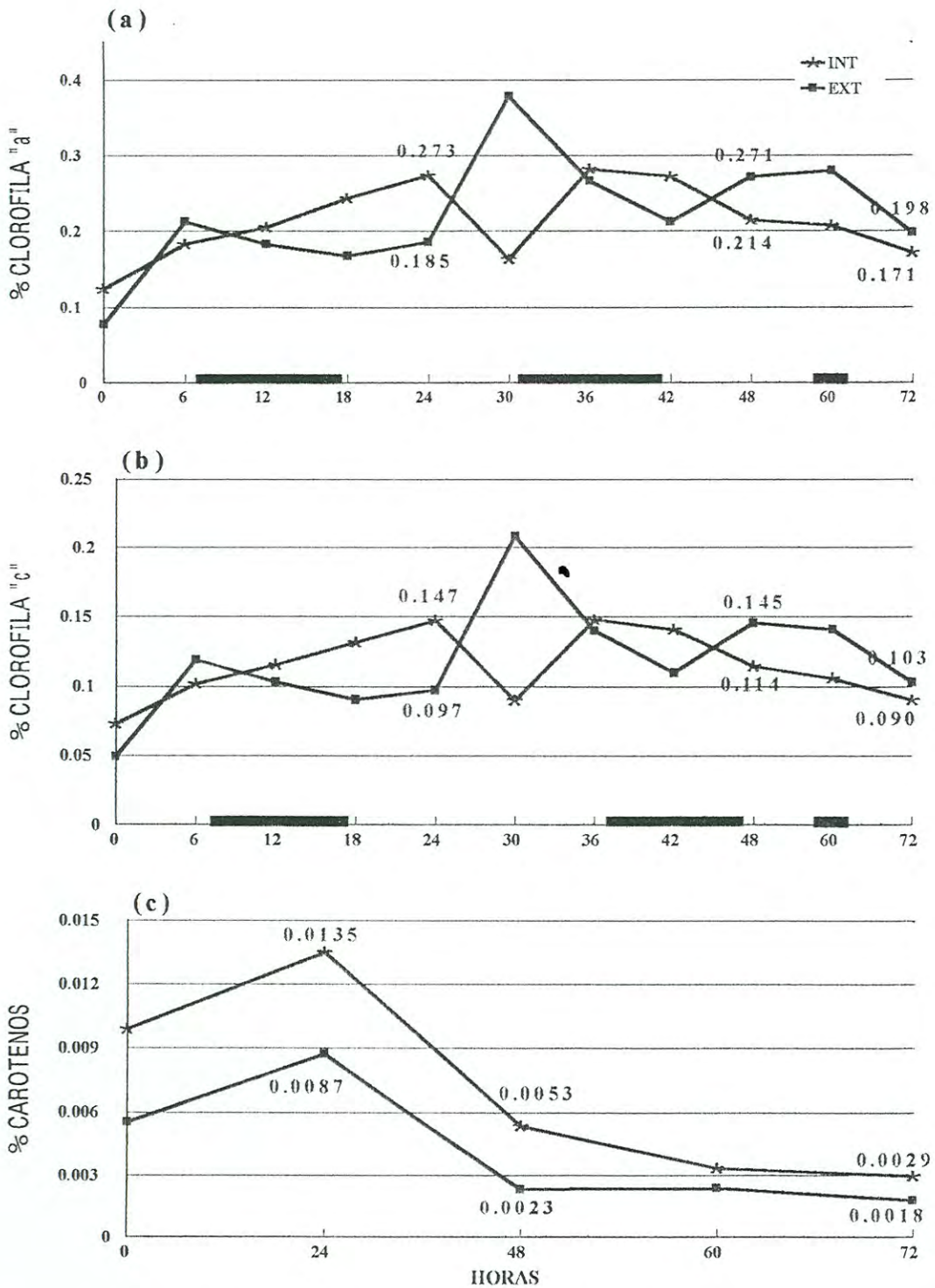
Figura 15. Promedio de pigmentos en cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas para la estación de invierno, donde: (a) clorofila "a", (b) clorofila "c" y (c) carotenos. ■ Horas oscuridad.

### V.2.2.1.3. Primavera.

La clorofila "a" en los cultivos al interior aumentó rápidamente hasta las 24 hrs con 0.273%, manteniéndose estable hasta las 36 hrs para después comenzar a descender hasta llegar a 0.214% a las 48 hrs y finalizando con 0.171% a las 72 hrs (Fig. 16a). En los cultivos al exterior las concentraciones de clorofila "a" oscilaron cíclicamente, disminuyendo en las horas de oscuridad, para aumentar durante las horas de luz solar y alcanzando un valor máximo poco antes del anochecer. Debido al comportamiento anterior se tienen valores de 0.185, 0.271 y 0.198% para las 24, 48 y 72 hrs, respectivamente, pero el valor máximo durante el período de cultivo es alcanzado a las 30 hrs, con 0.378% (Fig. 16a).

La clorofila "c" producida en los cultivos al interior y exterior muestra el mismo comportamiento que la clorofila "a", con valores para las 24, 48 y 72 hrs de 0.147, 0.114 y 0.090%, respectivamente (Fig. 16b). Para los cultivos al exterior los valores no fueron muy diferentes, siendo de 0.097, 0.145 y 0.103% para las 24, 48 y 72 hrs, respectivamente, el máximo valor fue a las 30 hrs, con 0.208% (Fig. 16b).

Los valores más altos de carotenos en primavera fueron en los cultivos al interior, en los cuales en el primer día se encontró el valor máximo de 0.01348%, que disminuyó durante el segundo día (0.00535%), para terminar el tercer día con 0.00295%. Los cultivos al exterior muestran un comportamiento muy similar a los del interior pero con valores menores: a las 24 hrs se alcanzó 0.00868% que descendió hacia las 48 hrs (0.00231%) y manteniéndose más o menos estable hasta las 72 hrs, con 0.00178% (Fig. 16c).



**Figura 16.** Promedio de pigmentos en cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas para la estación de primavera, donde: (a) clorofila "a", (b) clorofila "c" y (c) carotenos. Horas oscuridad.

#### V.2.2.1.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.

Al contrastar los porcentajes de clorofila “a” entre las distintas estaciones climáticas, se encontró que tanto para los cultivos en columnas al interior como al exterior los valores significativamente mayores fueron obtenidos en la primavera, por otro lado entre el verano y el invierno no hubo diferencia (Tabla 18).

En los cultivos en columnas al interior se encontraron los valores significativamente mayores de clorofila “c” en invierno y primavera, mientras que al exterior las diferencias fueron significativas solo en primavera (Tabla 18).

Tanto en los cultivos en columnas al interior como al exterior los valores en porcentaje de carotenos fueron significativamente mayores en la primavera, no presentándose diferencias entre verano e invierno (Tabla 18).

**Tabla 18.** Concentración promedio de clorofila “a”, “c” y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas a las 48 hrs con respecto a las estaciones climáticas.

		VERANO	INVIERNO	PRIMAVERA
% CLOROFILA “a”	INTERIOR Q=2.31 p<0.05	0.129 <sup>a</sup> (0.008)	0.142 <sup>a</sup> (0.020)	0.214 <sup>b</sup> (0.037)
	EXTERIOR Q=2.31 p<0.05	0.147 <sup>a</sup> (0.030)	0.077 <sup>a</sup> (0.046)	0.271 <sup>b</sup> (0.048)
% CLOROFILA “c”	INTERIOR Q= 2.31 p<0.05	0.067 <sup>a</sup> (0.013)	0.093 <sup>b</sup> (0.008)	0.114 <sup>b</sup> (0.019)
	EXTERIOR Q=2.31 p<0.05	0.079 <sup>a</sup> (0.028)	0.043 <sup>a</sup> (0.025)	0.145 <sup>b</sup> (0.023)
% CAROTENOS	INTERIOR Q=2.31 p<0.05	0.00106 <sup>a</sup> (0.00009)	0.00203 <sup>a</sup> (0.00100)	0.00535 <sup>b</sup> (0.00093)
	EXTERIOR Q=2.31 p<0.05	0.00123 <sup>a</sup> (0.00019)	0.00169 <sup>a</sup> (0.00087)	0.00231 <sup>b</sup> (0.00078)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

#### V.2.2.1.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.

Al comparar los valores de clorofila “a” en base al porcentaje de peso seco de los cultivo en columnas al exterior, estos fueron significativamente mayores para las estaciones de verano y de la primavera, mientras que en el invierno los mayores valores fueron dados en los cultivos al interior (Tabla 19).

En cuanto a clorofila “c”, no se obtuvieron diferencias significativas entre los cultivos al interior y exterior en verano y en primavera, mientras que los valores mayores se presentaron al interior (Tabla 19).

Los valores de carotenos en el verano fueron mayores significativamente para los cultivos en columnas al exterior, en forma contrastante en la primavera los valores más altos se presentaron al interior; por otro lado en el invierno no hubo diferencias entre ambas condiciones de cultivo (Tabla 19).

**Tabla 19.** Concentración promedio de clorofila “a”, “c” y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en columnas a las 48 hrs con respecto a las condiciones de cultivo.

		INTERIOR	EXTERIOR
% CLOROFILA “a”	VERANO t=2.3432 p<0.026	0.129 <sup>a</sup> (0.008)	0.147 <sup>b</sup> (0.030)
	INVIERNO Z=3.89 p<0.0001	0.142 <sup>b</sup> (0.020)	0.077 <sup>a</sup> (0.046)
	PRIMAVERA t=3.695 p<0.0009	0.214 <sup>a</sup> (0.037)	0.271 <sup>b</sup> (0.048)
% CLOROFILA “c”	VERANO t=1.56 p<0.13	0.067 <sup>a</sup> (0.013)	0.079 <sup>a</sup> (0.028)
	INVIERNO Z=4.583 p<0.0001	0.093 <sup>b</sup> (0.008)	0.043 <sup>a</sup> (0.025)
	PRIMAVERA t=4.09 p<0.0003	0.114 <sup>a</sup> (0.019)	0.145 <sup>a</sup> (0.023)
% CAROTENOS	VERANO t=3.07 p<0.0045	0.00106 <sup>a</sup> (0.00009)	0.00123 <sup>b</sup> (0.00019)
	INVIERNO Z=1.75 p<0.081	0.00203 <sup>a</sup> (0.00100)	0.00169 <sup>a</sup> (0.00087)
	PRIMAVERA t=10.08 p<0.0001	0.00535 <sup>b</sup> (0.00093)	0.00231 <sup>a</sup> (0.00078)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

### V.2.2.2. Tanques.

#### V.2.2.2.1. Verano.

En los cultivos en tanques al interior la clorofila “a” presentó un descenso en las primeras 6 horas y subió las seis siguientes, con una producción de 0.142% a las 12 horas; después de este período se notó un descenso ligero, dando valores de 0.141 y 0.148% para las 24 y 48 hrs, respectivamente (Fig. 17a). En los cultivos al exterior también se presenta un descenso durante las primeras 6 horas y la concentración se mantuvo sin cambios hasta las 18 horas del cultivo, que corresponde a la primera noche, para después tender a ascender llegando a alcanzar 0.133% a las 24 hrs y el valor máximo a las 48 hrs, con 0.170% (Fig. 17a).

Al interior, los cultivos también presentaron un ligero descenso de la clorofila “c” durante las primeras 6 horas de cultivo y, al igual que para la clorofila “a”, la máxima producción de este pigmento se registró a las 12 horas, con 0.092%, que inició a descender por lo que a las 24 hrs se tiene un valor de 0.068% y aumentar ligeramente el siguiente día, alcanzando un valor de 0.072% a las 48 hrs (Fig. 17b). Los cultivos al exterior presentan un comportamiento muy similar al registrado para la producción de clorofila “a”, dando valores promedios de 0.072 y 0.087% para las 24 y 48 hrs, respectivamente (Fig. 17b).

Los carotenos producidos tanto al interior como al exterior registraron un comportamiento muy similar el primer día con una tendencia al aumento, con valores de 0.0029% y 0.0025% para el interior y exterior, respectivamente. Posteriormente, al interior la



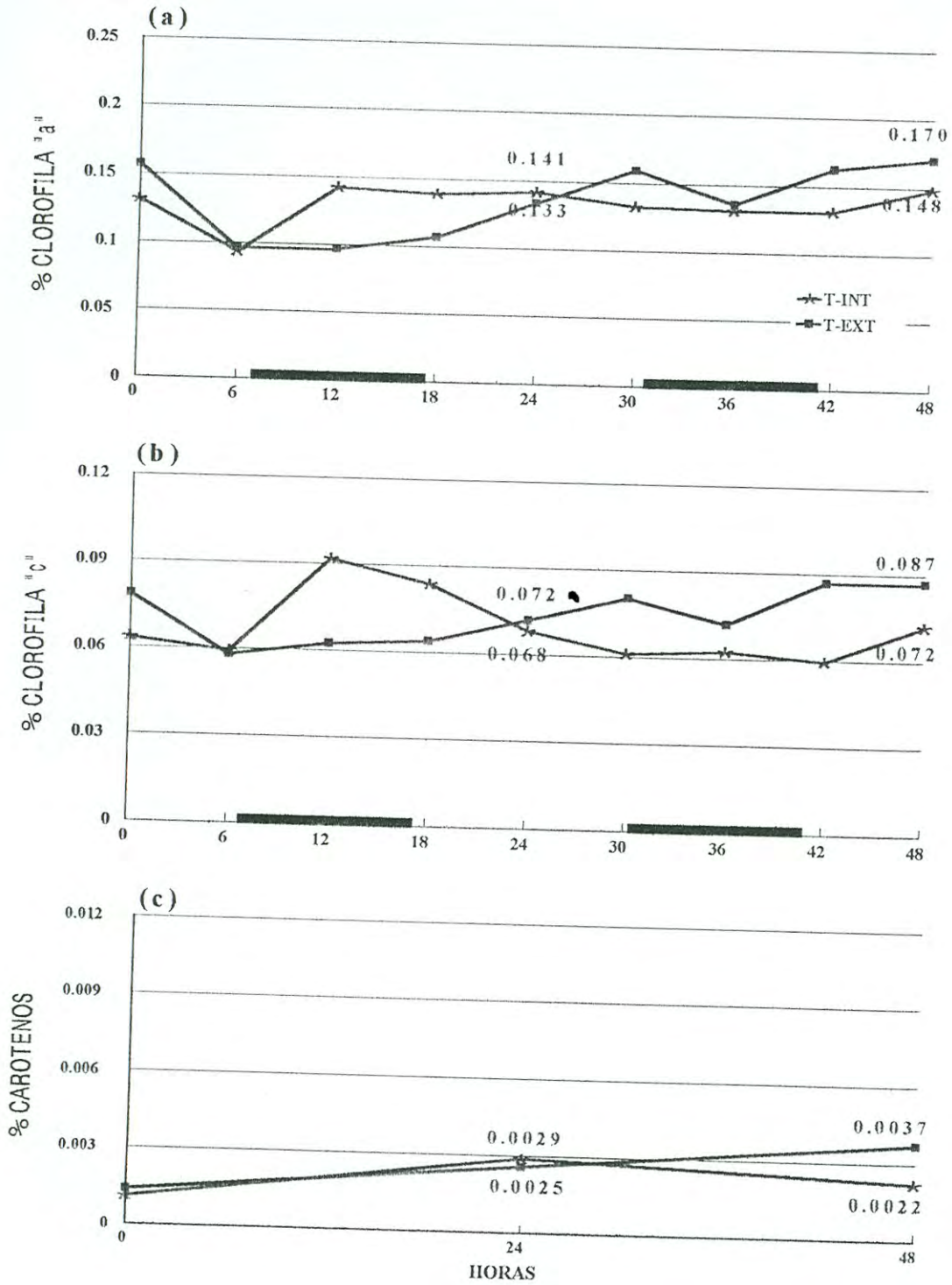


Figura 17. Promedio de pigmentos en cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques para la estación de verano, donde: (a) clorofila "a", (b) clorofila "c" y (c) carotenos. ■ Horas oscuridad.

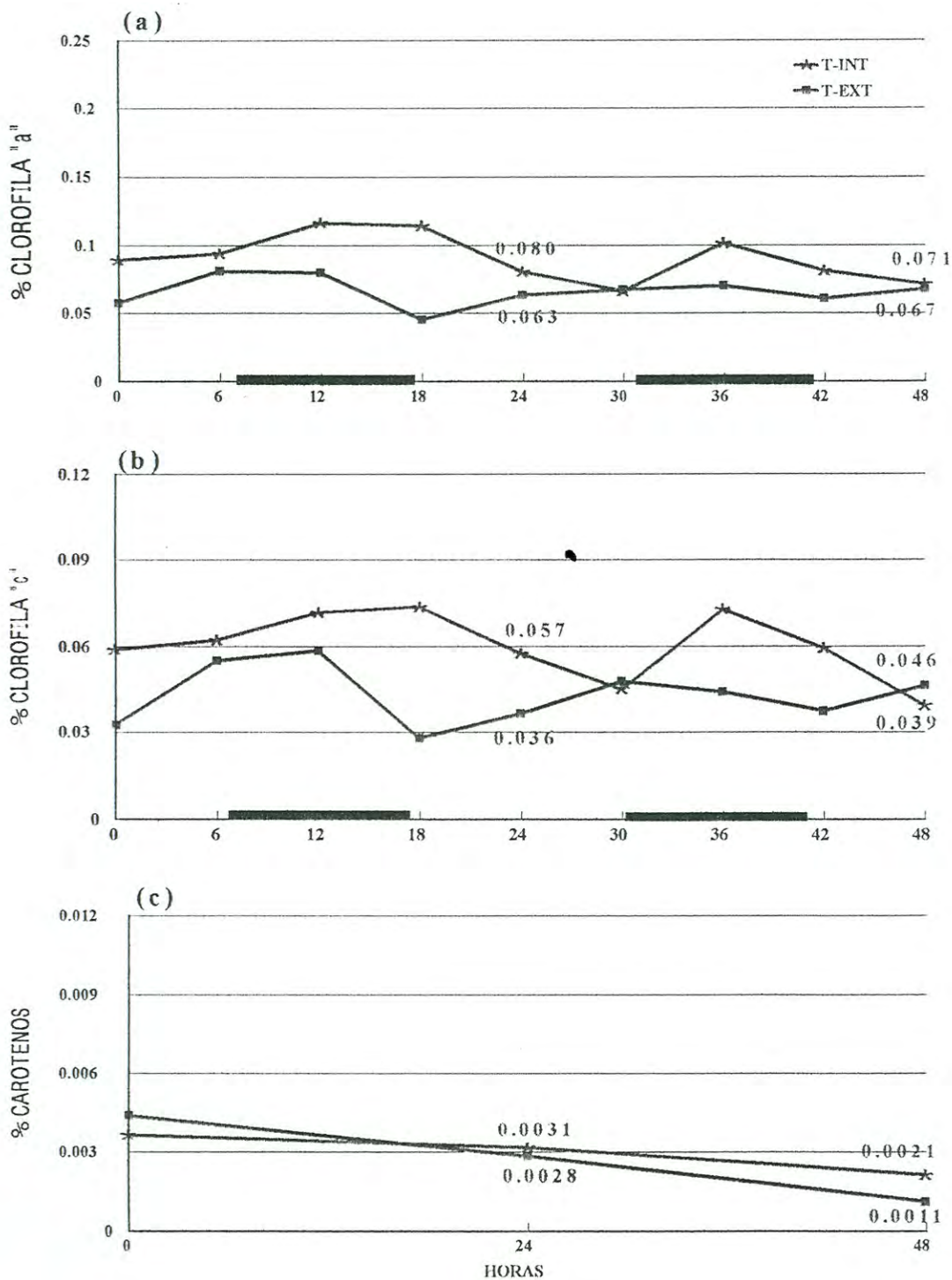
concentración tiende a descender hacia las 48 hrs con 0.0022%, mientras que al exterior siguió aumentando hasta un valor máximo de 0.0037% (Fig. 17c).

#### V.2.2.2.2. Invierno.

Los cultivos en tanques al interior registraron una producción oscilante de clorofila "a", donde los valores de las 24 y 48 hrs tendieron a ser los más bajos con 0.080 y 0.071% respectivamente, a pesar de que dichos cultivos se mantuvieron en condiciones de laboratorio (Fig. 18a). La clorofila "a" producida al exterior fue menor que la de los cultivos al interior, registrando tan sólo 0.063 y 0.067% para la 24 y 48 hrs respectivamente (Fig. 18a). Por lo que respecta a las horas de la noche, la concentración tiende a mantenerse estable durante las primeras 6 horas de oscuridad y disminuye hacia las horas del amanecer, recuperándose durante las horas de luz solar.

Los cultivos en tanques tanto al interior como al exterior registraron valores de clorofila "c" muy similar con respecto al comportamiento observado en clorofila "a": al interior se obtuvieron valores de 0.057 y 0.039% para las 24 y 48 hrs, respectivamente, mientras que al exterior se obtuvieron valores menores, de 0.036 y 0.046% para el primer y el segundo día, respectivamente (Fig. 18b).

La concentración de carotenos en los cultivos del interior y del exterior presentó una tendencia a la disminución; los valores obtenidos al interior fueron mayores, tanto a las 24 hrs como a las 48 hrs (0.0031 y 0.0021% respectivamente), que los registrados al exterior en



**Figura 18.** Promedio de pigmentos en cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques para la estación de invierno, donde: (a) clorofila "a", (b) clorofila "c" y (c) carotenos  Horas oscuridad.

los cuales se obtuvieron 0.0028 y 0.0011% al final del primero y del segundo día de cultivo (Fig. 18c).

#### V.2.2.2.3. Primavera.

Al interior la producción de clorofila "a" fue de tal forma que las máximas producciones se registraban a la media noche, con valores de 0.180 y 0.217% para la primera y segunda noche respectivamente, aunque los valores promedios del pigmento para las 24 y 48 hrs fueron de 0.149 y 0.200% respectivamente (Fig. 19a). Al exterior la tendencia fue similar, pero el descenso nocturno fue más inmediato. Los datos de las 24 y 48 hrs fueron de 0.102 y de 0.127% (Fig. 19a), aunque estos no fueron los máximos valores que se registraron, los cuales fueron observados durante la primera noche (12:00 pm) con 0.146% y el segundo valor más alto es obtenido poco antes de las primeras horas de oscuridad (6:00 p.m.) con 0.160%.

La clorofila "c" en los tanques al interior tuvo el mismo comportamiento que el de la clorofila "a", con valores de 0.079 y 0.105% para las 24 y 48 hrs respectivamente y los valores máximos se encontraron durante la primera noche con 0.109% y en la segunda noche con 0.116% (Fig. 19b). Los cultivos al exterior muestran el mismo comportamiento, dando valores promedios de 0.054% a las 24 hrs y 0.065% a las 48 hrs (Fig. 19b).

Los carotenos al interior muestran una tendencia ascendente durante el primer día, alcanzando un valor de 0.0117%, que disminuyó durante el segundo día hasta 0.0087% (Fig. 19c) Al exterior los carotenos tuvieron una tendencia descendente, dando valores de 0.0086 y 0.0056 para las 24 y 48 hrs de cultivo (Fig. 19c).

#### V.2.2.2.4. Comparación Estadística Entre Estaciones.

Al interior, los valores de clorofila “a” resultaron diferentes en todas las estaciones: en primavera se registraron los valores más altos y los más bajos fueron los de invierno. Al exterior también se encontraron diferencias significativas, pero los valores mayores fueron en verano y, como al interior, los menores fueron los de los cultivos de invierno (Tabla 20).

Resultados similares se encontraron para los valores de clorofila “c”, tanto al interior como al exterior (Tabla 20).

Para carotenos los valores registrados al interior en primavera fueron mayores de los de verano e invierno, los cuales no presentan diferencias entre sí. En los cultivos al exterior los valores más altos fueron para la estación de primavera y los menores son los de invierno (Tabla 20).

**Tabla 20.** Concentración promedio de clorofila “a”, “c” y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques a las 48 hrs con respecto a las estaciones climáticas.

		VERANO	INVIERNO	PRIMAVERA
% CLOROFILA “a”	INTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.148 <sup>ab</sup> (0.021)	0.071 <sup>a</sup> (0.008)	0.200 <sup>b</sup> (0.009)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.170 <sup>b</sup> (0.012)	0.067 <sup>a</sup> (0.002)	0.127 <sup>ab</sup> (0.004)
% CLOROFILA “c”	INTERIOR Q= 2.39 p<0.05	0.072 <sup>ab</sup> (0.029)	0.039 <sup>a</sup> (0.005)	0.105 <sup>b</sup> (0.002)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.087 <sup>b</sup> (0.008)	0.046 <sup>a</sup> (0.010)	0.065 <sup>ab</sup> (0.003)
% CAROTENOS	INTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.0022 <sup>a</sup> (0.0005)	0.0021 <sup>a</sup> (0.0004)	0.0087 <sup>b</sup> (0.0007)
	EXTERIOR Q=2.39 p<0.05	0.0037 <sup>ab</sup> (0.0013)	0.0011 <sup>a</sup> (0.0004)	0.0056 <sup>b</sup> (0.0006)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.

#### **V.2.2.2.5. Comparación Estadística Entre Condiciones de Cultivo.**

Al llevar a cabo una comparación entre las condiciones de cultivo para la producción de clorofila “a” y “c”, se encontró que en verano e invierno no se presentaron diferencias significativas entre el interior y exterior y sólo en primavera los valores fueron mayores al interior (Tabla 21).

En cambio los valores de carotenos fueron significativamente mayores en verano al exterior, mientras que al interior fueron mayores en invierno y en primavera (Tabla 21).

**Tabla 21.** Concentración promedio de clorofila “a”, “c” y carotenos en base a peso seco (%) para cultivos de *Chaetoceros muelleri* en tanques a las 48 hrs con respecto a las condiciones de cultivo.

		INTERIOR	EXTERIOR
% CLOROFILA “a”	VERANO Z=1.78 p<0.076	0.148 <sup>a</sup> (0.021)	0.170 <sup>a</sup> (0.012)
	INVIERNO Z=1.60 p<0.117	0.071 <sup>a</sup> (0.008)	0.067 <sup>a</sup> (0.002)
	PRIMAVERA t=16.14 p<0.0001	0.200 <sup>b</sup> (0.009)	0.127 <sup>a</sup> (0.004)
% CLOROFILA “c”	VERANO t=1.14 p<0.29	0.072 <sup>a</sup> (0.029)	0.087 <sup>a</sup> (0.008)
	INVIERNO t=1.30 p<0.23	0.039 <sup>a</sup> (0.005)	0.046 <sup>a</sup> (0.010)
	PRIMAVERA t=20.48 p<0.0001	0.105 <sup>b</sup> (0.002)	0.065 <sup>a</sup> (0.003)
% CAROTENOS	VERANO Z=1.99 p<0.05	0.0022 <sup>a</sup> (0.0005)	0.0037 <sup>b</sup> (0.0013)
	INVIERNO t=4.28 p<0.003	0.0021 <sup>b</sup> (0.0004)	0.0011 <sup>a</sup> (0.0004)
	PRIMAVERA t=7.53 p<0.0002	0.0087 <sup>b</sup> (0.0007)	0.0056 <sup>a</sup> (0.0006)

NOTA: Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar.



### V.2.3. Comparaciones Generales de Pigmentos en Columnas y Tanques.

Tanto las variaciones de luz como de temperatura afectan al crecimiento de las microalgas marinas y a su composición en pigmentos fotosintéticos. Esta respuesta a los factores ambientales depende no sólo de la magnitud de la modificación sino que existen respuestas específicas en función de la especie microalgal que sea sometida a dichas variaciones (Redaije y Laws, 1983; Cabrera y Montecino, 1987; Mortain-Bertrand *et al.*, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992).

El aumento en la cantidad de clorofila al disminuir la intensidad de la luz es una respuesta general de las microalgas ante condiciones de baja iluminación. Este es un mecanismo fotoadaptativo que ha sido observado en varias especies de microalgas como *P. triornutum*, *S. costatum*, *D. tertiolecta*, *I. galbana*, *T. suecica*, etc. (Falkowski y Owens, 1980; López-Muñoz *et al.*, 1992).

En la primavera y el verano en los cultivos en columnas al exterior se obtuvieron los valores más altos en porcentaje de clorofila "a" en base a peso seco, lo cual no era de esperarse debido a las altas irradiancias registradas para ambas estaciones del año y es muy probable una respuesta al mayor efecto de autosombreado debido a las altas concentraciones celulares registradas al exterior.

En el invierno se tuvieron bajas temperaturas e irradiancias (con respecto a las otras estaciones del año) en los cultivos en columnas al exterior, en los cuales se obtuvieron los menores porcentajes de clorofila "a" con respecto a lo registrado en los cultivos al interior, nuevamente como la respuesta más probable al menor efecto de autosombreado resultante de las bajas densidades celulares registradas al exterior en este período del año. Además se

encontró que la cantidad de clorofila “a” fue mayor en aquellos cultivos que recibieron menor irradiancia, similar a lo reportado por Rivkin (1989) el cual, trabajando con *D. tertiolecta* y *T. rotula* encontró la misma respuesta de este experimento. Así mismo Falkowski y Owens (1980) encuentran un aumento en la clorofila cuando las microalgas son cultivadas a bajos niveles de energía radiante.

En cuanto a los porcentajes de clorofila “c” en los cultivos realizados en columnas, estos fueron menores a los registrados por clorofila “a”, presentando sus máximos valores en la primavera, aunque sólo en invierno, los cultivos al interior dieron resultados estadísticamente similar a primavera. En los cultivos en tanque, los mayores valores de clorofila “c” se obtuvieron en la primavera al interior.

En la primavera y en el verano las clorofilas “a” y “c” muestran un incremento continuo durante todo el período de cultivo, además de un comportamiento muy similar entre ellas, sólo que los porcentajes de clorofila “c” son en menores proporciones, Humphrey (1979) reporta un comportamiento similar al trabajar con varias especies de microalgas.

Varios autores (Thompson *et al.*, 1990; López-Muñoz *et al.*, 1992) han mencionado que a medida de que la irradiancia decrece, la producción de clorofila (a y b ó c) por unidad de volumen de cultivo pueden depender tanto del contenido celular en pigmentos como de la densidad celular final obtenida en cada cultivo, aunque puede variar dependiendo de la especie en cuestión. Por lo que se puede decir que para los cultivos al exterior en el verano y la primavera, la alta densidad celular y tasa de crecimiento, afectados por las temperaturas hace que los valores de clorofila sean mayores aun cuando se hayan presentado altas intensidades de luz.

Pero también puede ser atribuido el alto contenido de clorofila "a" en ambas estaciones climáticas debido a una inhibición fotosintética causada a la fotooxidación de las reacciones tanto fotoquímicas como enzimáticas, las cuales aumentan más con las exposiciones prolongadas a altas intensidades y a altas temperaturas (Darley, 1987).

Los carotenoides de las plantas marinas, aparte de ampliar el espectro de absorción de la irradiancia, también posean una función secundaria y sirven como protectores del aparato fotosintético contra la fotooxidación a altas intensidades de luz (Darley, 1987; Cabrera y Montecino, 1987).

Los valores más altos de los porcentajes de carotenos obtenidos fueron en la primavera en ambos sistemas y condiciones de cultivo. Aunque en el verano los valores fueron menores a los de primavera, los cultivos al exterior se presentaron mayores a los del interior, basado en los conceptos anteriores los carotenos en esta estación pueden estar funcionando como protectores de la clorofila contra las altas incidencias luminosas.

## VI. CONCLUSIONES.

La producción en cuanto a número de células por ml mostrado por *Chaetoceros muelleri* fue mayor en los cultivos al exterior que al interior en ambos sistemas de cultivo (columnas y tanques respectivamente), para las estaciones de verano (30% y 100.53%) y la primavera (125.42% y 38.17%), aunque cabe mencionar que en las columnas al exterior se alcanzan producciones más altas que en los tanques. En el invierno para los cultivos en columnas en promedio no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de cultivo. En cambio, en tanques el crecimiento fue mayor al exterior (87.12%).

El mayor número de células por ml registrado a las 48 hrs fue en la primavera en ambos sistemas de cultivo (125.42% en columnas y 38.17% en tanques, con respecto a los del interior), presumiblemente porque las temperaturas ambientales prevalecientes durante esta época del año no fueron extremosas, y favorecieron el crecimiento celular.

Las máximas tasas de crecimiento se obtuvieron a las 24 hrs en las tres estaciones del año, para ambos sistemas de cultivo. A las 48 hrs en las estaciones de verano y primavera las tasas de duplicación fueron mayores en los cultivos al exterior para columnas y tanques. Las altas densidades celulares que se alcanzan durante las primeras 24 hrs hacen que después de

este tiempo la tasa de duplicación vaya disminuyendo a causa del autosombreado y posiblemente debido a la menor disponibilidad de nutrientes.

La producción en cuanto a biomasa en base a peso seco fue mayor en los cultivos al exterior que al interior en ambos sistemas de cultivo (columnas y tanques respectivamente), para las estaciones de verano (23.11% y 30.71%) y la primavera (35.47% y 17.86%). En invierno, los cultivos en columnas al interior produjeron la mayor (42.07% y 19.51% con respecto al primer y segundo experimento al exterior, respectivamente) cantidad de biomasa seca y en los tanques no se presentaron diferencias significativas.

La especie *Chaetoceros muelleri* mostró crecer favorablemente en un intervalo de temperatura desde 12.2° a 39°C y con incidencias luminosas de 3859 a 8276 Wm<sup>2</sup>, por lo que puede considerarse que esta microalga posee una buena adaptación a las condiciones medioambientales prevalecientes para esta región del estado de Sonora.

A nivel columna los mayores porcentajes de clorofila “a”, “c” y carotenos se presentaron en primavera, debido a que en esta estación se obtuvieron las mayores densidades celulares y el alga presumiblemente se encontraba en condiciones de autosombreado. Los cultivos al exterior registraron los mayores porcentajes para clorofila “a” en el verano y la primavera; los carotenos únicamente en el verano, lo cual puede ser atribuido a las altas incidencias lumínicas y a la función protectora del aparato fotosintético que pueden tener estos

pigmentos. Al interior, la proporción de clorofila “a” y “c” fue mayor en invierno, mientras que para carotenos fue en primavera.

En el sistemas de tanques, los cultivos al interior fueron mayores para las proporciones de clorofila “a” y “c” en primavera, debido a la limitación de luz; mientras que para los carotenos lo fue en invierno y primavera. Al exterior únicamente los carotenos fueron mayores significativamente en verano.

La extracción de pigmentos resultó más eficiente con el solvente DMSO y además el tiempo fue mucho menor comparado con el método tradicional de acetona, lo cual aconseja la extracción con este solvente, que permite obtener mejores resultados en un tiempo menor.

## VII. RECOMENDACIONES.

En base a los resultados obtenidos se encontró que es preferible utilizar los cultivos al exterior, debido a que se obtienen producciones celulares mayores durante las tres estaciones del año, lo cual tiene una implicación económica muy importante en los Centros de Producción en Acuicultura, en virtud de que se eliminan los gastos excesivos en energía para acondicionamiento del ambiente en los laboratorios al interior.

Los cultivos al exterior a las 48 hr y 72 hr son una alternativa a los cultivos al interior, donde para el caso de las 72 hr, es justificable si se requieren de grandes cantidades de microalgas, además de que el Centro que las produzca tenga ciertas condiciones específicas en su cultivo, tanto biológicas como técnicas.

El suministro de alimento de microalgas debe ser cuantificado en base al número de células, en conjunto con la información de la biomasa en base a peso seco, con el fin de estimar correctamente la cantidad de alimento proporcionado.

Realizar un estudio y diseño mediante el cual se logre mantener un control del pH en los cultivos en tanques, para así tener posibilidades de aumentar su nivel de producción en cuanto a número de células y biomasa en los cultivos de microalgas.

Es muy importante llevar a cabo análisis de la composición bioquímica de la microalga cultivada al exterior, ya que con dicha información se tendría conocimiento de su calidad nutricia dado que el alga servirá como alimento para larvas de moluscos y crustáceos.

Realizar bioensayos con larvas de moluscos y/o crustáceos con el alga cultivada al exterior, para determinar su consumo, asimilación ó grado de conversión alimenticia y además la tasa de sobrevivencia de dichas larvas.

Estimar el efecto de la temperatura sobre la composición pigmentaria y bioquímica de la microalga, tomando en cuenta los valores de temperaturas que prevalecen en las distintas estaciones del año.

Bajo condiciones controladas dentro de una cámara climática realizar ensayos para determinar el efecto de la intensidad luminosa y del fotoperíodo en la producción de biomasa y cambios en los pigmentos de *Chaetoceros muelleri*.



Llevar a cabo experimentos donde se detecte de que forma pueden afectar los cambios en la composición pigmentaria hacia la composición química de la microalga en los cultivos al exterior en las distintas estaciones del año.

Estudiar con otras especies de microalgas su factibilidad de ser cultivadas en forma masiva al exterior, además de determinar en que estaciones del año alcanzan sus máximas producciones de biomasa y a la vez se obtenga buena calidad nutricional.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Aquacop. 1983. Algal Food Cultures at the Centre Océanologique du Pacifique. In: J.P.McVey (Ed.). CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton.
- Benemann, J.R. 1992. Microalgae Aquaculture Feeds. Journal of Applied Phycology 4:233-245.
- Bold, H.C. Y M.J. Wynne. 1978. Introduction to the Algae, Structure and Reproduction. Prentice-Hall, Inc. 699 pp.
- Borbón-Muñoz, R.E. y A. Victoria-Gallardo. 1996. Producción Masiva de Microalgas Marinas (*Chaetoceros muelleri*) en Condiciones Controladas y a la Interperie, Durante Otoño de 1994 y Verano de 1995 en Bahía Kino, Sonora. Tesis de Químico Biólogo Esp. Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora. Méx. 101 pp.
- Brand, I.E. y R.R.L. Guillard. 1981. The Effects of Continuos Light and Light Intensity on the Reproduction Rates of Twenty-two Species of Marine Phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 50, pp. 119-132.
- Brown , M.R.; S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional Aspects of Microalgae Used in Mariculture: A Literature Review. CSIRO Mar. Lab. Rep., No. 205, 44pp.
- Brown, M.R.; G.A. Dunstan; S.W. Jeffrey; J.K. Volkman; S.M. Barret y J.M. LeRoi. 1993. The Influence of Irradiance on the Biochemical Composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (Clone T-Iso). J. Phycol. 29:601-612.
- Cabrera S., S. y V. Montecino B. 1987. Photosynthesis and Mass Cultivation of Microalgae. Investigacion Pesquera (Chile). 34:155-163.
- Campbell, N.A. 1993. Biology. 3ra De. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 1188 pp.
- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of Algal Biomass Production: a Review of Systems for Outdoor Mass Culture. J. Appl. Phycol. 5:393-604.

- Chen, C.Y. y E.G. Durbin. 1994. Effects of pH on the Growth and Carbon Uptake of Marine Phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 109:83-94.
- Chen, X.Q. y L.J. Long. 1991. Research and Production of Live Feeds in China. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 187-202.
- Claus, C., 1981. Trends in Nursery Rearing of Bivalve Molluscs. European Mariculture Society. Special Publication No. 7, 31 pp.
- Cosper, E. 1982. Effects of Diurnal Fluctuations in Light Intensity on the Efficiency of Growth of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve (Bacillariophyceae) in a Cyclostat. J. Exp. Marine Biology Ecol. Vol. 65 pp. 229-239. Elsevier Bromedical Press.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of Algal Substitute and the Requirement for Live Algae in the Hatchery and Nursery Rearing of Bivalve Molluscs: An International Survey. Journal of Shellfish. Vol. 11, No. 2, 467-476.
- Cullen, J.J. y M.P. Lesser. 1991. Inhibition of Photosynthesis by Ultraviolet Radiation as a Function of Dose and Dosage Rate: Results for a Marine Diatom. Marine Biology 111: 183-190.
- Darley, W.M. 1987. Biología de las Algas, Enfoque Fisiológico. Edit. Limusa. 231pp.
- De la Peña, M.R.; C.C. Espigadera y A.D. Tillo. 1989. In: Samonte, G.P.B.; C.C. Espigadera y R.D. Caturao. 1993. Economics of Microalgae (*Chaetoceros calcitrans*) Production Using the Multi-step Method in the Philippines. Aquaculture. 112:39-45.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Micro-Algae for Aquaculture. In: Micro-Algal Biotechnology. Edited by M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka. Cambridge University Press. pp 197-221.
- Dubinsky, Z. 1986. Productivity of Algae Under Natural Conditions. In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. Editor A. Richmond. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 101-115.
- Donaldson, J., 1991. Commercial Production of Microalgae at Coast Oyster Company. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop, Honolulu, HI. 229-236.
- Duke, C.S.; B.E. Lapointe y J. Ramus. 1986. Effects of Light on Growth, RuBPCase Activity and Chemical Composition of Ulva Species (Chlorophyta). J. Phycol. 22, 362-370.

- Falkowski, P.G. y T.G. Owens. 1980. Light-shade Adaptation. Two Strategies in Marine Phytoplankton. Plant. Physiol. 66:592-595.
- Falkowski, P.G. y J. LaRoche. 1991. Acclimatation to Spectral Irradiance in Algae. J. Phycol. 27:8-14.
- Fulks, W. y K.L. Main. 1991. The Desing and Operation of Comercial Scales Live Feed Production System. In: "Rotifer and Microalgae Culture Systems Proceedings of U.S.A". Honolulu, Hawaii., 364 pp.
- Goldman, J.C. 1977. Temperature Effects on Phytoplankton Growth in Continuous Culture. Limnol. Oceanogr. Vol. 22, pp. 932-936.
- Goldman, J.C. 1979. Temperature Effects on Steady-State Growth, Phosphorus Uptake, and the Chemical Composition of a marine Phytoplankter. Microbial Ecology. 5: 153-166pp.
- Goldman, J.C. y R. Mann. 1980. Temperature-Influenced Varations in Speciation and Chemical Composition of Marine Phytoplankton in Outdoor Mass Cultures. J. Exp. Mar. Biol. Vol. 46, pp. 29-39.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on Marine Planktonic Diatoms Y. Cyclotella nana and Detonula confervacea (Cleve). Gran. can. J. Microbiol., 8: 229-239.
- Harrison, W.G. y T. Platt, 1986. Photosynthesis-Irradiance Relationships in Polar and Temperate Phytoplankton Populations. Polar Biol. 5:153-164.
- Hervé-Claustre., J.G. 1987. Adaptation of Biochemical Composition and Cell Size to Irradiance in Two Microalgae: Possible Ecological Implications. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 40:167-174.
- Humphrey, G.F. 1979. Photosynthetic Characteristics of Algae Grown Under Constant Illumination and Light-Dark Regimes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol.40:63-70 pp.
- Jorgensen, E.G. 1968. The Adaptation of Plankton Algae. II. Aspects of the Temperature Adaptation of Skeletonema costatum. Physiologia Plantarum. Vol. 21, 423-427.
- Kongkeo, H. 1991. An Overview Of Live Feeds Production System Design in Thailand. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 187-202.
- Lee, R.E. 1980. Phycology. Cambridge University Press. 467 pp.

- Liao, I-Chiu. 1991. An Overview of Live Feeds Production System Design in Taiwan. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 187-202.
- Lim, Lian Chuan. 1991. An Overview of Live Feeds Production Systems in Singapore. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 203-220.
- Lobban, C.S.; P.J. Harrison y M.C. Duncan. 1985. The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge. University Pres.
- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos Semicontinuos de Cuatro Especies de Microalgas con un Medio no Convencional. Ciencias Marinas 19(2): 169-180.
- López-Elías, J.A.; M. del C. Báez Dueñas y N. Huerta Aldaz. 1995. Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas. Publicaciones Académicas CICTUS. Publicación No. 5. 47pp.
- López-Muñoz, Y.; J. Abalde y C. Herrero. 1992. Crecimiento y Contenido de Pigmentos de Cuatro Especies de Microalgas Marinas Cultivadas con Diferentes Temperaturas e Intensidades de Luz. Nova Acta Científica Compostelana (Biología). 3:59-65.
- Lüning, K. 1981. Light. In: The Biology of Seaweeds. Ch.S. Lobban y M.J. Wynne De. University of California Press. 786 pp.
- Margalef, R. 1972. Las Algas Inferiores. En: Ecología Marina. 14, Fund. La Salle. 230-272pp.
- McVey, J.P. 1983. CRC Handbook of Mariculture. Volume I. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp 15-60.
- Mortain-Bertrand., A.; C. Descolas-Gros. y H. Jupin. 1987. Stimulating Effect of Light-to-Dark Transition on Carbon Assimilation by a Marine Diatom. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 112, pp 11-26.
- Mortain-Bertrand., A.; C. Descolas-Gros. y H. Jupin. 1988. Growth Photosynthesis and Carbon Metabolism in the Temperate Marine Diatom *Skeletonema costatum* Adapted to Two Temperature and Low Photon-Flux Density. Marine Biology 100:135-145.
- Nalewajko, C. 1966. Photosynthesis and Excretion in Various Planktonic Algae. Limnology and Oceanography, Vol. XI. No. 1. 10 pp.

- Nelson, J. R.; S. Guarda; L.E. Cowell y P.B. Heffernan. 1992. Evaluation of Microalgal Clones for Mass Culture in a Subtropical Greenhouse Bivalve Hatchery: Growth Rates and Biochemical Composition at 30°C. *Aquaculture*, 106:357-377.
- Newell, G.E. y R.C. Newell. 1977. Phytoplankton. In: Marine Plankton a Practical Guide. Hutchison of London. 39-97 pp.
- Okauchi, M. 1991. The Status of Phytoplankton Production in Japan. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 187-202.
- Park, Mi-Seon. 1991. The Status of Mass Production of Live in Korean Hatcheries. In: Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 187-202.
- Parsons, T.R.; y. Maita y C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 173pp.
- Radmer, R.J. y B.C. Parker. 1994. Commercial Applications of Algae: Opportunities and Constraints. *Journal of Applied Phycology* 6:93-98.
- Raymont, J.E.G. 1980. Plankton y Productivity in the Oceans. Vol. 1-Phytoplankton. Second Edition. Pergamon Press. pp 133-203.
- Redaije, D.G. y E.A. Laws. 1983. The Effects of Environmental Factors on Growth and the Chemical and Biochemical Composition of Marine Diatoms. I: Light and Temperature Effects. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 68, pp 59-79. Elsevier Biomedical Press.
- Renaud, S.M.; D.L. Parry; T. Luong-Van; C. Kuo; A. Padovan y N. Sammy. 1991. Effect of light Intensity on the Proximate Biochemical and Fatty Acid Composition of Isochrysis sp. and Nannochloropsis oculata for Use in Tropical Aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3: 43-53.
- Richardson, K.; J. Beardall y J.A. Raven. 1983. Adaptation of Unicellular Algae to Irradiance: An Analysis of Strategies. *New Phytol.* 93, 157-191.
- Richmond, A. 1986. Cell Response to Environmental Factors. In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 69-99.
- Riley, J.P. y R. Chester. 1989. Introducción a la Química Marina. AGT Editor, S.A. 459pp.

- Rivkin, R.B. 1989. Influence of Irradiance and Spectral Quality on the Carbon Metabolism of Phytoplankton. I. Photosynthesis, Chemical Composition and Growth. Marine Ecology Progress Series. Vol.55: 291-304.
- Ryther, J.H. 1956b. The Measurement of Primary Production. Limnol. & Oceanogr. 1:72-84.
- Samonte, G.P.B.; C.C. Espigadera y R.D. Caturao. 1993. Economics of Microalgae (*Chaetoceros calcitran*) Production Using the Multi-step Method in the Philippines. Aquaculture. 112:39-45.
- Sánchez-Saavedra, M. del P. y D. Voltolina. 1996. Effect of Blue-Green Light on Growth Rate and Chemical Composition of Three Diatoms. Journal of Applied Phycology 8: 131-137.
- Sato, V. 1991. The Development of a Phytoplankton Production System as a Support Base for Finfish Larval Rearing Research. In: Rotifer and microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, HI. 257-274.
- SEAFDEC, AQD Annual Report. 1980. In: Samonte, G.P.B.; C.C. Espigadera y R.D. Caturao. 1993. Economics of Microalgae (*Chaetoceros calcitran*) Production Using the Multi-step Method in the Philippines. Aquaculture. 112:39-45
- Strickland, J.D.H.y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board Can. Bull. 185-199pp.
- Shoaf, W.T y B.W. Lium. 1976. Improved Extraction of Chlorophyll "a" and "b" from Algae Using Dimethylsulfoxide. Limnol. Oceanogr. 21:926-928.
- Tinoco-Villa, O.D. 1996. Evaluación Cualitativa y Cuantitativa de la Producción de Cultivos Masivos al Exterior de la Microalga Marina *Chaetoceros muelleri* en Invierno y Primavera. Tesis Profesional. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Hermosillo, Sonora, México. 86 pp.
- Thomson, P.A.; P.J. Harrison y J.N. Whyte. 1990. Influence of Irradiance on the Fatty Acid Composition of Phytoplankton. J. Phycol. 26:278-288.
- Torres-Rodríguez, L.M. 1997. Uso de un Fotobiorreactor para la Producción Masiva de Microalgas para la Acuicultura. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología. Departamento de Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. 66 pp.
- Trujillo-Valle, M.L. 1993. La Colección de Microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura. CICESE Ensenada, B.C., Méx. 103 pp.

- Trujillo-Valle, M.L. y D. Voltolina. 1994. Cultivos de Microalgas para la Acuicultura. Serie Científica. Área de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México. 2(1): 73-85.
- Viramontes-Robles, F. 1991. Estudio del Efecto de Diferentes Ciclos Luz-Oscuridad Sobre el Crecimiento y Contenido de Lípidos en Tres Especies de Microalgas Marinas. Tesis profesional. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Vonskak, A. y A. Richmond. 1985. Problems in Developing the Biotechnology of Algal Mass Production. 129-135. In: Chrismandha, T. y M.A. Borowitzka. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* growth in a tubular photobioreactor. J. Appl. Phycol. 6:67-74.
- Walsh, D.T.; C.A. Withstandley; R.A. Kraus y E.J. Petrovits. 1987. Mass Culture of Selected Marine Microalgae for the Nursery Production of Bivalve Seed. Journal of Shellfish Research, Vol. 6, No. 2, 71-77.
- Witt, U.; P.H. Koske; D. Kuhlmann; J. Lenz y W. Nellen. 1981. Production of Nanochloris spec. (Chlorophyceae) in Large-Scale Outdoor Tanks and its Use as a Food Organism in Marine Aquaculture. Aquaculture. 23:171-181.
- Zar, J.H. 1984. Biostatistical Analysis. Ed. Prentice-Hall. Second Edition. New Jersey, USA.



# ANEXÒ I.

Tabla .- Análisis de pendientes de las columnas interiores de verano de 1995.

Col. Int. Ira. corrida verano						
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	136600	5.135	0.000	0	26.373
2	6	155833	5.193	31.156	36	26.964
3	12	280000	5.447	65.366	144	29.672
4	18	482333	5.683	102.300	324	32.300
5	24	544333	5.736	137.661	576	32.900
6	30	698333	5.844	175.322	900	34.153
7	36	966667	5.985	215.470	1296	35.824
8	42	1420667	6.152	258.405	1764	37.853
9	48	1326667	6.123	293.893	2304	37.488

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216
$\sum \text{LogY}$	51.30
$\sum (\text{XLogY})$	1279.57
$\sum X^2$	7344
$\sum (\text{LogY})^2$	293.53

$\sum \text{xLogy}$	48.39
$\sum x^2$	2160
$\sum (\text{Logy})^2$	1.13

$\beta$	0.0224
---------	--------

Res. SS	0.0430
Res DF	7

p	0.0066
S	0.0025

Col. Int. 2da. corrida verano						
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	132000	5.1206	0.000	0	26.220
2	6	230000	5.3617	32.170	36	28.748
3	12	309667	5.4909	65.891	144	30.150
4	18	458333	5.6612	101.901	324	32.049
5	24	740000	5.8692	140.862	576	34.448
6	30	810000	5.9085	177.255	900	34.910
7	36	813333	5.9103	212.770	1296	34.931
8	42	1096667	6.0401	253.683	1764	36.483
9	48	1476333	6.1692	296.121	2304	38.059

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

$\sum (\text{LogY})^2$	296.00
$\sum X^2$	7344
$\sum (\text{XLogY})$	1280.65
$\sum \text{LogY}$	51.53
$\sum X$	216

$\sum (\text{Logy})^2$	0.94
$\sum x^2$	2160
$\sum \text{xLogy}$	43.89

$\beta$	0.0203
---------	--------

Res DF	7
Res. SS	0.0496

t	0.8423
v	14

Tabla .- Análisis de pendientes de las columnas exteriores de verano de 1995.

Col. Ext. Ira. corrida verano					
N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	136600	5.135	0.000	26.373
2	6	154833	5.190	31.139	26.935
3	12	262333	5.419	65.026	29.364
4	18	292000	5.465	98.377	29.870
5	24	405667	5.608	134.596	31.452
6	30	757000	5.879	176.373	34.564
7	36	1206667	6.082	218.937	36.986
8	42	1893333	6.277	263.644	39.404
9	48	1606667	6.206	297.884	38.514

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216
$\sum \text{LogY}$	51.26
$\sum (\text{XLogY})$	1285.98
$\sum X^2$	7344
$\sum (\text{LogY})^2$	293.46

$\sum \text{xLogy}$	55.70
$\sum x^2$	2160
$\beta$	0.0258

Res. SS	0.0519
Res DF	7

p	0.0062
S	0.0024

Col. Ext. 2da. corrida verano					
N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	132000	5.1206	0.000	26.220
2	6	257333	5.4105	32.463	29.273
3	12	407000	5.6096	67.315	31.468
4	18	455333	5.6583	101.850	32.017
5	24	726000	5.8609	140.662	34.351
6	30	1012000	6.0052	180.155	36.062
7	36	1153333	6.0620	218.230	36.747
8	42	1591667	6.2019	260.478	38.463
9	48	2035000	6.3086	302.811	39.798

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

$\sum (\text{LogY})^2$	304.40
$\sum X^2$	7344
$\sum (\text{XLogY})$	1303.97
$\sum \text{LogY}$	52.24
$\sum X$	216

$\sum (\text{Logy})^2$	1.20
$\sum x^2$	2160
$\sum \text{xLogy}$	50.27

$\beta$	0.0233
---------	--------

Res DF	7
Res. SS	0.0343

t	1.0536
v	14

Tabla .- Análisis de pendientes de las columnas interiores de invierno de 1995.

Col. Int. Ira. corrida invierno						Col. Int. 2da. corrida invierno							
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	171000	5.233	0.000	0	27.384	1	0	167267	5.2234	0.000	0	27.284
2	6	231333	5.364	32.185	36	28.775	2	6	178333	5.2512	31.507	36	27.575
3	12	375000	5.574	66.888	144	31.070	3	12	216933	5.3363	64.036	144	28.476
4	18	553000	5.743	103.369	324	32.979	4	18	342333	5.5344	99.620	324	30.630
5	24	662000	5.821	139.701	576	33.882	5	24	432667	5.6362	135.268	576	31.766
6	30	1160000	6.064	181.934	900	36.778	6	30	554667	5.7440	172.321	900	32.994
7	36	930667	5.969	214.877	1296	35.627	7	36	660000	5.8195	209.504	1296	33.867
8	42	1051667	6.022	252.919	1764	36.263	8	42	940667	5.9734	250.884	1764	35.682
9	48	1155000	6.063	291.004	2304	36.755	9	48	1008667	6.0037	288.180	2304	36.045

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

ΣX	216	Σ(XLogY)	1282.88	ΣX <sup>2</sup>	7344	Σ(LogY) <sup>2</sup>	299.51
----	-----	----------	---------	-----------------	------	----------------------	--------

ΣxLogy	38.42	Σx <sup>2</sup>	2160	Σ(Logy) <sup>2</sup>	0.77
--------	-------	-----------------	------	----------------------	------

β	0.0178
---	--------

Res. SS	0.0862	Res DF	7
---------	--------	--------	---

MEDIA X	24
---------	----

Σ(LogY) <sup>2</sup>	284.32	ΣX <sup>2</sup>	7344	Σ(XLogY)	1251.32	ΣLogY	50.52	ΣX	216
----------------------	--------	-----------------	------	----------	---------	-------	-------	----	-----

Σ(Logy) <sup>2</sup>	0.71	Σx <sup>2</sup>	2160	ΣxLogy	38.78
----------------------	------	-----------------	------	--------	-------

β	0.0180
---	--------

Res DF	7	Res. SS	0.0120
--------	---	---------	--------

n	9
---	---

p	0.0070	S	0.0025	t	-0.0670	v	14
---	--------	---	--------	---	---------	---	----

Tabla .- Análisis de pendientes de las columnas exteriores de invierno de 1995.

Col. Ext. 1ra. corrida invierno						Col. Ext. 2da. corrida invierno					
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>
1	0	223333	5.349	0.000	0	1	0	350000	5.5441	0.000	0
2	6	195667	5.292	31.749	36	2	6	381333	5.5813	33.488	36
3	12	292667	5.466	65.596	144	3	12	578000	5.7619	69.143	144
4	18	277667	5.444	97.983	324	4	18	944667	5.9753	107.555	324
5	24	278667	5.445	130.682	576	5	24	968333	5.9860	143.665	576
6	30	300333	5.478	164.328	900	6	30	905000	5.9566	178.699	900
7	36	377000	5.576	200.748	1296	7	36	1384000	6.1411	221.081	1296
8	42	526667	5.722	240.305	1764	8	42	1615333	6.2083	260.747	1764
9	48	500333	5.699	273.564	2304	9	48	1797333	6.2546	300.222	2304

MEDIA X	24
---------	----

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	49.47	$\sum (\text{XLogY})$	1204.96	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	272.09
----------	-----	--------------------	-------	-----------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	53.41	$\sum (\text{XLogY})$	1314.60	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	317.48
----------	-----	--------------------	-------	-----------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum x \text{Logy}$	17.67	$\sum x^2$	2160
----------------------	-------	------------	------

$\sum x \text{Logy}$	32.78	$\sum x^2$	2160
----------------------	-------	------------	------

$\beta$	0.0082
---------	--------

$\beta$	0.0152
---------	--------

Res. SS	0.0241	Res. SS	0.0345
---------	--------	---------	--------

Res. SS	0.0241	Res. SS	0.0345
---------	--------	---------	--------

p	0.0042	s	0.0020
---	--------	---	--------

t	-3.5535	v	14
---	---------	---	----

Tabla .- Análisis de pendientes de las columnas interiores de primavera de 1996.

Col. Int. 1ra. corrida primavera						Col. Int. 2da. corrida primavera							
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	347667	5.541	0.000	0	30.704	1	0	247000	5.3927	0.000	0	29.081
2	6	528667	5.723	34.339	36	32.755	2	6	410167	5.6130	33.678	36	31.505
3	12	771667	5.887	70.649	144	34.662	3	12	677000	5.8306	69.967	144	33.996
4	18	860000	5.934	106.821	324	35.218	4	18	920000	5.9638	107.348	324	35.567
5	24	1245000	6.095	146.284	576	37.151	5	24	1127333	6.0521	145.249	576	36.627
6	30	1522000	6.182	185.472	900	38.222	6	30	1565000	6.1945	185.835	900	38.372
7	36	1731667	6.238	224.585	1296	38.918	7	36	1684000	6.2263	224.148	1296	38.767
8	42	1994667	6.300	264.595	1764	39.688	8	42	1847667	6.2666	263.198	1764	39.271
9	48	2142667	6.331	303.886	2304	40.081	9	48	2240000	6.3502	304.812	2304	40.326

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	54.23	$\sum \text{XLogY}$	1336.63	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	327.40
----------	-----	--------------------	-------	---------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum x \text{Logy}$	35.04	$\sum x^2$	2160	$\sum (\text{Logy})^2$	0.60
----------------------	-------	------------	------	------------------------	------

$\beta$	0.0162
---------	--------

Res. SS	0.0285	Res DF	7
---------	--------	--------	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum (\text{LogY})^2$	323.51	$\sum X^2$	7344	$\sum \text{XLogY}$	1334.24	$\sum \text{LogY}$	53.89	$\sum X$	216
------------------------	--------	------------	------	---------------------	---------	--------------------	-------	----------	-----

$\sum (\text{Logy})^2$	0.83	$\sum x^2$	2160	$\sum x \text{Logy}$	40.88
------------------------	------	------------	------	----------------------	-------

$\beta$	0.0189
---------	--------

Res DF	7	Res. SS	0.0591
--------	---	---------	--------

n	9
---	---

p	0.0063	S	0.0024	t	-1.1245	v	14
---	--------	---	--------	---	---------	---	----

Tabla.- Análisis de pendientes de las columnas exteriores de primavera de 1996.

Col. Ext. Ira. corrida primavera						Col. Ext. 2da. corrida primavera							
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	258000	5.412	0.000	0	29.286	1	0	197333	5.2952	0.000	0	28.039
2	6	563667	5.751	34.506	36	33.074	2	6	526333	5.7213	34.328	36	32.733
3	12	1097000	6.040	72.482	144	36.484	3	12	1080500	6.0336	72.403	144	36.405
4	18	1007000	6.003	108.055	324	36.036	4	18	1148000	6.0599	109.079	324	36.723
5	24	1420000	6.152	147.655	576	37.851	5	24	1552000	6.1909	148.581	576	38.327
6	30	2133333	6.329	189.872	900	40.057	6	30	3543000	6.5494	196.481	900	42.894
7	36	3196000	6.505	234.166	1296	42.310	7	36	3988667	6.6008	237.630	1296	43.571
8	42	3354333	6.526	274.075	1764	42.584	8	42	3953333	6.5970	277.072	1764	43.520
9	48	3406000	6.532	313.548	2304	42.670	9	48	4822667	6.6833	320.798	2304	44.666

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

ΣX	216	ΣLogY	55.25	Σ(XLogY)	1374.36	ΣX <sup>2</sup>	7344	Σ(LogY) <sup>2</sup>	340.35
----	-----	-------	-------	----------	---------	-----------------	------	----------------------	--------

Σ(LogY) <sup>2</sup>	346.88	ΣX <sup>2</sup>	7344	Σ(XLogY)	1396.37	ΣLogY	55.73	ΣX	216
----------------------	--------	-----------------	------	----------	---------	-------	-------	----	-----

ΣxLogy	48.37	Σx <sup>2</sup>	2160	Σ(Logy) <sup>2</sup>	1.18
--------	-------	-----------------	------	----------------------	------

Σ(Logy) <sup>2</sup>	1.77	Σx <sup>2</sup>	2160	ΣxLogy	58.82
----------------------	------	-----------------	------	--------	-------

β	0.0224
---	--------

β	0.0272
---	--------

Res. SS	0.0989	Res DF	7
---------	--------	--------	---

Res. SS	0.1668	Res DF	7
---------	--------	--------	---

p	0.0190	S	0.0042	t	-1.1543	v	14
---	--------	---	--------	---	---------	---	----

Tabla .- Análisis de pendientes de tanques interiores de verano de 1995.

T- Int. Ira. corrida verano						T- Int. 2da. corrida verano					
N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	118300	5.073	0.000	25.735	1	0	130300	5.1149	0.000	26.163
2	6	212000	5.326	31.958	28.370	2	6	220000	5.3424	32.055	28.541
3	12	313000	5.496	65.947	30.201	3	12	290000	5.4624	65.549	29.838
4	18	431000	5.634	101.421	31.747	4	18	400000	5.6021	100.837	31.383
5	24	510000	5.708	136.982	32.576	5	24	324000	5.5105	132.253	30.366
6	30	578000	5.762	172.858	33.200	6	30	576000	5.7604	172.813	33.182
7	36	742000	5.870	211.335	34.462	7	36	555000	5.7443	206.795	32.997
8	42	802000	5.904	247.975	34.859	8	42	702000	5.8463	245.546	34.180
9	48	756000	5.879	282.169	34.557	9	48	729000	5.8627	281.411	34.372

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	50.65	$\sum (\text{XLogY})$	1250.64	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	285.71
----------	-----	--------------------	-------	-----------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum x \text{Logy}$	35.00	$\sum x^2$	2160	$\sum (\text{Logy})^2$	0.64
----------------------	-------	------------	------	------------------------	------

$\beta$	0.0162
---------	--------

Res. SS	0.0717	Res DF	7
---------	--------	--------	---

$\sum (\text{LogY})^2$	281.02	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{XLogY})$	1237.26	$\sum \text{LogY}$	50.25	$\sum X$	216
------------------------	--------	------------	------	-----------------------	---------	--------------------	-------	----------	-----

$\sum (\text{Logy})^2$	0.50	$\sum x^2$	2160	$\sum x \text{Logy}$	31.35
------------------------	------	------------	------	----------------------	-------

$\beta$	0.0145
---------	--------

Res DF	7	Res. SS	0.0472
--------	---	---------	--------

p	0.0085	S	0.0028	t	0.6022	v	14
---	--------	---	--------	---	--------	---	----



Tabla .- Análisis de pendientes de tanques exteriores de verano de 1995.

T - Ext. 1ra. corrida verano					
N	X	Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	140000	0.000	0	26.483
2	6	424600	33.768	36	31.674
3	12	535000	5.728	144	32.814
4	18	635000	5.803	324	33.672
5	24	720000	5.857	576	34.308
6	30	958000	5.981	900	35.777
7	36	1278000	6.107	1296	37.290
8	42	1468000	6.167	1764	38.029
9	48	1770600	6.248	2304	39.039

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216
$\sum \text{LogY}$	52.67
$\sum (\text{XLogY})$	1305.72
$\sum X^2$	7344
$\sum (\text{LogY})^2$	309.09

$\sum x \text{Logy}$	41.75
$\sum x^2$	2160
$\sum (\text{Logy})^2$	0.90

$\beta$	0.0193
---------	--------

Res. SS	0.0965
Res DF	7

p	0.0135
S	0.0035

T - Ext. 2da. corrida verano						
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	130600	5.1159	0.000	0	26.173
2	6	281000	5.4487	32.692	36	29.688
3	12	424000	5.6274	67.528	144	31.667
4	18	400000	5.6021	100.837	324	31.383
5	24	460000	5.6628	135.906	576	32.067
6	30	909000	5.9586	178.757	900	35.504
7	36	1260000	6.1004	219.613	1296	37.215
8	42	1130000	6.0531	254.229	1764	36.640
9	48	1210000	6.0828	291.974	2304	37.000

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum (\text{LogY})^2$	297.34
$\sum (\text{XLogY})$	1281.54
$\sum \text{LogY}$	51.65
$\sum X$	216

$\sum (\text{Logy})^2$	0.91
$\sum x^2$	2160
$\sum x \text{Logy}$	41.90

$\beta$	0.0194
---------	--------

Res DF	7
Res. SS	0.0924

t	-0.0187
v	14

Tabla .- Análisis de pendientes de tanques interiores de invierno de 1995.

T- Int. 1ra. corrida invierno							T- Int. 2da. corrida invierno						
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	145000	5.161	0.000	0	26.640	1	0	186000	5.2695	0.000	0	27.768
2	6	219000	5.340	32.043	36	28.520	2	6	241000	5.3820	32.292	36	28.966
3	12	286000	5.456	65.476	144	29.772	3	12	297000	5.4728	65.673	144	29.951
4	18	665000	5.823	104.811	324	33.905	4	18	410000	5.6128	101.030	324	31.503
5	24	548000	5.739	137.731	576	32.934	5	24	372000	5.5705	133.693	576	31.031
6	30	456000	5.659	169.769	900	32.024	6	30	390000	5.5911	167.732	900	31.260
7	36	619000	5.792	208.501	1296	33.544	7	36	634000	5.8021	208.875	1296	33.664
8	42	409000	5.612	235.692	1764	31.491	8	42	692000	5.8401	245.284	1764	34.107
9	48	507000	5.705	273.840	2304	32.547	9	48	688000	5.8376	280.204	2304	34.077

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

§X	216	§LogY	50.29	§(XLogY)	1227.86	§X <sup>2</sup>	7344	§(LogY) <sup>2</sup>	281.38
----	-----	-------	-------	----------	---------	-----------------	------	----------------------	--------

§(LogY) <sup>2</sup>	282.33	§X <sup>2</sup>	7344	§(XLogY)	1234.78	§LogY	50.38	§X	216
----------------------	--------	-----------------	------	----------	---------	-------	-------	----	-----

§xLogy	20.97	§x <sup>2</sup>	2160	§(Logy) <sup>2</sup>	0.40
--------	-------	-----------------	------	----------------------	------

§(Logy) <sup>2</sup>	0.33	§x <sup>2</sup>	2160	§xLogy	25.70
----------------------	------	-----------------	------	--------	-------

β	0.0097
---	--------

β	0.0119
---	--------

n	9
---	---

Res. SS	0.1957	Res DF	7
---------	--------	--------	---

Res. SS	0.0231	Res. DF	7
---------	--------	---------	---

p	0.0156	S	0.0038
---	--------	---	--------

t	-0.5757	v	14
---	---------	---	----

Tabla .- Análisis de pendientes de tanques exteriores de invierno de 1995.

T - Ext. 1ra. corrida invierno						T - Ext. 2da. corrida invierno					
N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	386000	5.587	0.000	31.210	1	0	280000	5.4472	0.000	29.672
2	6	565000	5.752	34.512	33.086	2	6	506000	5.7042	34.225	32.537
3	12	745000	5.872	70.466	34.482	3	12	646000	5.8102	69.723	33.759
4	18	781000	5.893	106.068	34.723	4	18	644000	5.8089	104.560	33.743
5	24	842000	5.925	142.207	35.109	5	24	600000	5.7782	138.676	33.387
6	30	1083000	6.035	181.039	36.417	6	30	732000	5.8645	175.935	34.392
7	36	1065000	6.027	216.985	36.329	7	36	804000	5.9053	212.589	34.872
8	42	1115000	6.047	253.986	36.570	8	42	942000	5.9741	250.910	35.689
9	48	1230000	6.090	292.315	37.087	9	48	1008000	6.0035	288.166	36.042

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

$\sum X$	216	$\sum \text{Log Y}$	53.23	$\sum (\text{XLog Y})$	1297.58	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{Log Y})^2$	315.01
----------	-----	---------------------	-------	------------------------	---------	------------	------	-------------------------	--------

$\sum x \text{Log Y}$	20.11	$\sum x^2$	2160	$\sum (\text{Log Y})^2$	0.21
-----------------------	-------	------------	------	-------------------------	------

$\beta$	0.0093
---------	--------

Res. SS	0.0247	Res DF	7
---------	--------	--------	---

p	0.0047	S	0.0021
t	0.0944	v	14

MEDIA X	24
---------	----

$\sum (\text{Log Y})^2$	304.09	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{XLog Y})$	1274.78	$\sum \text{Log Y}$	52.30	$\sum X$	216
-------------------------	--------	------------	------	------------------------	---------	---------------------	-------	----------	-----

$\sum (\text{Log Y})^2$	0.22	$\sum x^2$	2160	$\sum x \text{Log Y}$	19.68
-------------------------	------	------------	------	-----------------------	-------

$\beta$	0.0091
---------	--------

Res DF	7	Res. SS	0.0409
--------	---	---------	--------

n	9
---	---

Tabla .- Análisis de pendientes de tanques interiores de primavera de 1996.

T- Int. 1ra. corrida primavera						T- Int. 2da. corrida primavera					
N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	200000	5.301	0.000	28.101	1	0	363000	5.5599	0.000	30.913
2	6	389000	5.590	33.540	31.248	2	6	234000	5.3692	32.215	28.828
3	12	281000	5.449	65.384	29.688	3	12	339000	5.5302	66.362	30.583
4	18	466000	5.668	102.031	32.131	4	18	471000	5.6730	102.114	32.183
5	24	666000	5.823	139.763	33.913	5	24	628000	5.7980	139.151	33.616
6	30	774000	5.889	176.662	34.677	6	30	732000	5.8645	175.935	34.392
7	36	852000	5.930	213.496	35.170	7	36	830000	5.9191	213.087	35.035
8	42	876000	5.943	249.585	35.313	8	42	895000	5.9518	249.977	35.424
9	48	1075000	6.031	289.508	36.378	9	48	852000	5.9304	284.661	35.170

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	51.62	$\sum (\text{XLogY})$	1269.97	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	296.62
----------	-----	--------------------	-------	-----------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum (\text{LogY})^2$	296.15	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{XLogY})$	1263.50	$\sum \text{LogY}$	51.60	$\sum X$	216
------------------------	--------	------------	------	-----------------------	---------	--------------------	-------	----------	-----

$\sum \text{XLogY}$	30.98	$\sum x^2$	2160	$\sum (\text{LogY})^2$	0.50
---------------------	-------	------------	------	------------------------	------

$\sum (\text{LogY})^2$	0.35	$\sum x^2$	2160	$\sum \text{XLogY}$	25.20
------------------------	------	------------	------	---------------------	-------

$\beta$	0.0143
---------	--------

$\beta$	0.0117
---------	--------

Res. SS	0.0521	Res. DF	7
---------	--------	---------	---

Res. SS	0.0561	Res. DF	7
---------	--------	---------	---

p	0.0077	S	0.0027
---	--------	---	--------

t	1.0008	v	14
---	--------	---	----

Tabla .- Análisis de pendientes de tanques exteriores de primavera de 1996.

T - Ext. 1ra. corrida primavera						T - Ext. 2da. corrida primavera							
N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>	N	X	Y	Log Y	XLogY	X <sup>2</sup>	(LogY) <sup>2</sup>
1	0	260000	5.415	0.000	0	29.322	1	0	177000	5.2480	0.000	0	27.541
2	6	440000	5.643	33.861	36	31.849	2	6	369000	5.5670	33.402	36	30.992
3	12	346000	5.539	66.469	144	30.681	3	12	463000	5.6656	67.987	144	32.099
4	18	480000	5.681	102.262	324	32.277	4	18	597000	5.7760	103.968	324	33.362
5	24	510000	5.708	136.982	576	32.576	5	24	632000	5.8007	139.217	576	33.648
6	30	876000	5.943	178.275	900	35.313	6	30	984000	5.9930	179.790	900	35.916
7	36	1428000	6.155	221.570	1296	37.881	7	36	1400000	6.1461	221.261	1296	37.775
8	42	1316000	6.119	257.009	1764	37.445	8	42	1205000	6.0810	255.401	1764	36.978
9	48	1340000	6.127	294.101	2304	37.541	9	48	1323000	6.1216	293.835	2304	37.473

n	9
---	---

MEDIA X	24
---------	----

MEDIA X	24
---------	----

n	9
---	---

$\sum X$	216	$\sum \text{LogY}$	52.33	$\sum (\text{XLogY})$	1290.53	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{LogY})^2$	304.89
----------	-----	--------------------	-------	-----------------------	---------	------------	------	------------------------	--------

$\sum x \text{LogY}$	34.61	$\sum x^2$	2160	$\sum (\text{LogY})^2$	0.62
----------------------	-------	------------	------	------------------------	------

$\beta$	0.0160
---------	--------

Res. SS	0.0621	Res DF	7
---------	--------	--------	---

$\sum (\text{LogY})^2$	305.78	$\sum X^2$	7344	$\sum (\text{XLogY})$	1294.86	$\sum \text{LogY}$	52.40	$\sum X$	216
------------------------	--------	------------	------	-----------------------	---------	--------------------	-------	----------	-----

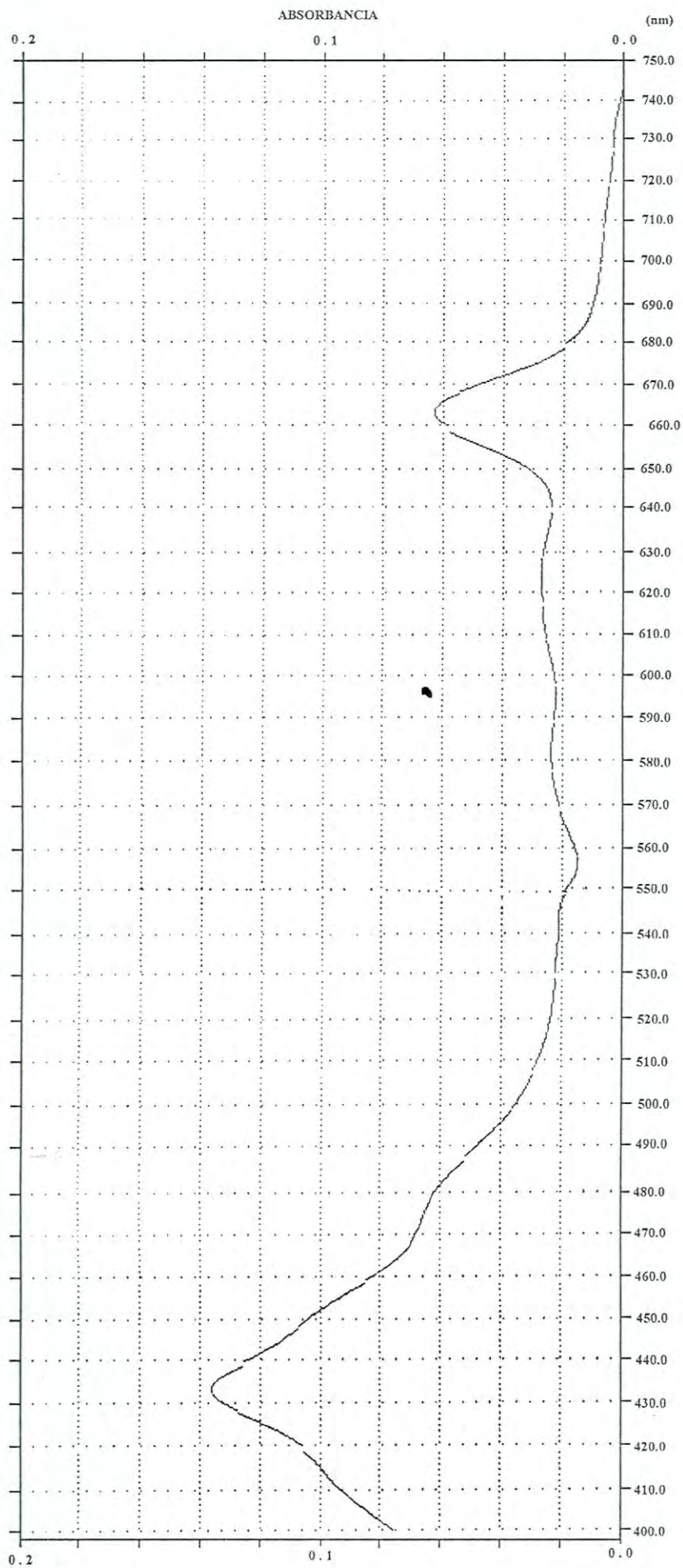
$\sum (\text{LogY})^2$	0.71	$\sum x^2$	2160	$\sum x \text{LogY}$	37.29
------------------------	------	------------	------	----------------------	-------

$\beta$	0.0173
---------	--------

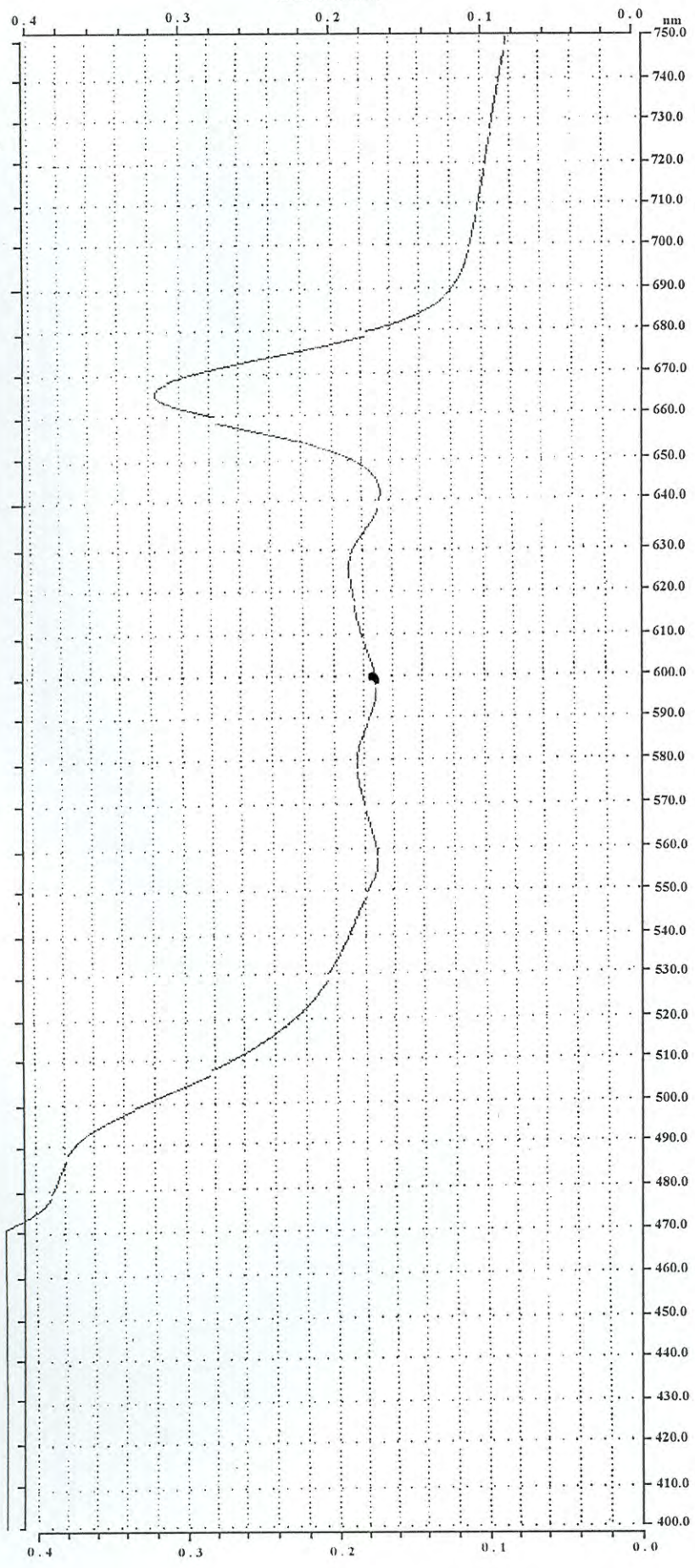
Res DF	7	Res. SS	0.0690
--------	---	---------	--------

p	0.0094	S	0.0029	t	-0.4206	v	14
---	--------	---	--------	---	---------	---	----

ANEXO II.



Barrido de pigmentos extraídos con acetona en una muestra de carboy al interior



Barrido de pigmentos extraídos con DMSO en una muestra de carboy al interior