

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**EFECTO DE DISTINTAS VARIABLES AMBIENTALES EN LA
FISIOLOGÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Navicula incerta***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CATALINA IVONE CHÁVEZ MEDRANO

Ensenada, Baja California, México, Septiembre de 2008

TESIS DEFENDIDA POR
Catalina Ivone Chávez Medrano
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Director del Comité

Dra. Silvia Emilia Ibarra Obando

Miembro del Comité

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez

Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

*Coordinador del Programa de
Posgrado en Ciencias con
Orientación en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

Septiembre de 2008

RESUMEN de la tesis que presenta **Catalina Ivone Chávez Medrano**, como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS** con orientación en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 2008.

EFECTO DE DISTINTAS VARIABLES AMBIENTALES EN LA FISIOLÓGÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Navicula incerta*

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director de Tesis

La irradiancia, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes son tres de los factores más importantes que pueden influir en el crecimiento y en la composición bioquímica de cultivos microalgales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes en la tasa de crecimiento, la composición bioquímica y la utilización de nutrientes con la diatomea bentónica *Navicula incerta*. Se mantuvieron cultivos no axénicos y mono-específicos de *N. incerta* por 7 días en sistemas estáticos bajo distintas condiciones experimentales con dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo “F” descrito por Guillard y Ryther (1962), y “2F”. La tasa de crecimiento de *N. incerta*, no se modificó por efecto de la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes. Sin embargo, la fotosíntesis máxima ($P_{\text{máx}}$) y el punto de saturación lumínica (I_k) fue mayor cuando *N. incerta* se mantuvo en 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C y medio “2F”. El contenido de clorofila *a* fue modificado por efecto de la irradiancia, la temperatura y el día de cultivo. La irradiancia, la temperatura y los nutrientes en el medio de cultivo no causaron diferencias significativas en el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y en el perfil de ácidos grasos de *N. incerta*. Al final del cultivo, la disponibilidad de nitratos disminuyó cerca del 50% y los ortofosfatos fueron totalmente usados al día 7. La diatomea *N. incerta* puede tolerar variaciones de temperatura (20 a 25 °C), de irradiancia (100 a 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y nutrientes (medio “F” y “2F”) sin tener importantes cambios en su composición bioquímica y fotosíntesis.

Palabras clave: *Navicula incerta*, crecimiento, irradiancia, temperatura, nutrientes, composición bioquímica.

ABSTRACT of the thesis presented by **Catalina Ivone Chávez Medrano** as a partial requirement to obtain the **MASTER IN SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. September 2008.

**THE EFFECT OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL VARIABLES ON
PHYSIOLOGY AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *Navicula incerta***

Irradiance, temperature, and the availability of nutrients are three of the most important environmental factors that can influence the growth and the biochemical composition in microalgal cultures. The aim of this work was to evaluate the effect of irradiance, temperature, and the concentration of nutrients on the growth rate, biochemical composition, and the use of nutrients on the benthic diatom *Navicula incerta*. We maintained non-axenic and monospecies cultures of *N. incerta* for 7 days in batch systems under different experimental conditions at two irradiancies (100 and 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), two temperatures (20 and 25 °C), and two nutrient concentrations in the culture media "f", as described by Guillard and Ryther (1962), and "2f". The growth rate of *N. incerta* was unaffected by irradiance, temperature, and nutrients. However, the maximum photosynthesis (Pmax) and the highest saturation point of photosynthesis (Ik) were greater when *N. incerta* was maintained at 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C, and in the "2f" medium. The Pmax and Ik values decrease significantly at higher irradiancies. The chlorophyll *a* content was modified by effect of irradiance, temperature, and culture day. The irradiance, temperature, and nutrients in the culture media caused no significant differences to be obtained for proteins, carbohydrates, lipid percentages, and the fatty acid profiles of *N. incerta*. At the end of the culture, the availability of nitrates decreased nearly 50% and orthophosphates were totally used up at day 7. The diatom *N. incerta* can tolerate variations of temperature (20 to 25 °C), irradiance (100 to 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and nutrients (medium "f" and "2f") without important modifications in their biochemical composition and photosynthesis.

Keywords: *Navicula incerta*, growth, irradiance, temperature, nutrients, biochemical composition.

A el amor de mi vida

AGRADECIMIENTOS

A Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones.

A mis padres Juan Antonio y María Teresa de todo corazón por su amor, cariño, apoyo y comprensión, en todo momento los llevo conmigo.

A el amor de mi vida Adolfo Alcalá, por hacerme la mujer mas feliz del mundo y compartir el mundo entero.

A mis hermanos Antonio y Mayra por su alegría y cariño de toda la vida.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, mi más profundo agradecimiento por la oportunidad de trabajar a su lado y por dirigir este proyecto, por el apoyo y la paciencia brindada a lo largo de este año.

A la Dra. Silvia Emilia Ibarra Obando y al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por el tiempo y sugerencias hechas para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para el financiamiento de mis estudios de Maestría. A los proyectos SAGARPA-CONACyT (clave 239) y UC-MEXUS-CONACYT (clave CN-04-127) por el apoyo económico para la adquisición de materiales y reactivos.

A mis profesores por su disposición y conocimientos brindados.

A mis amigos: Familia Talamantes, Marisol Díaz, Fernando García, Socorro Jiménez, Getsemany Juárez, Ana María Bastos y Bily Aguilar.

Al Biol. Norberto Flores por su apoyo técnico.

Al personal administrativo por su disposición y sus sonrisas en especial Cecilia Loera, Bibiana Medina, Ivonne Best, Citlali Romero, Dolores Sarracino y Norma Fuentes.

A mi país porque espera lo mejor de mi.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
Capítulo I. Introducción	1
Capítulo II. Hipótesis	6
Capítulo III. Objetivos	7
III.1. Objetivo general	7
III.2. Objetivo particulares	7
Capítulo IV. Materiales y métodos	8
IV.1. Cultivo de <i>Navicula incerta</i>	8
IV.2. Disgregación de la biomasa de diatomeas	9
IV.3. Evaluación de la cantidad de biomasa producida	9
IV.3.1. Conteos de la biomasa celular	9
IV.3.2. Peso seco y contenido de cenizas	10
IV.4. Curvas fotosíntesis- Irradiancia (P-I)	10
IV.5. Análisis bioquímicos	11
IV.5.1. Proteínas	11
IV.5.2. Carbohidratos	11
IV.5.3. Lípidos	11
IV.5.4. Ácidos grasos	12
IV.5.5. Clorofila <i>a</i>	12
IV.6. Nutrientes	12
IV.7. Análisis estadístico de los datos	13

CONTENIDO (continuación)	
Capítulo V. Resultados	14
V.1. Evaluación de la cantidad de biomasa producida	14
V.1.1. Peso seco y contenido de cenizas	22
V.2. Curvas fotosíntesis- Irradiancia (P-I)	24
V.3. Análisis bioquímicos	27
V.3.1. Proteínas	27
V.3.2. Carbohidratos	27
V.3.3. Lípidos	27
V.3.4. Cenizas	28
V.3.5. Ácidos grasos	30
V.3.6. Clorofila <i>a</i>	37
V.4. Nutrientes	39
V.4.1. Nitratos	39
V.4.2. Ortofosfatos	39
V.4.3. Nitritos	40
Capítulo VI. Discusión	46
VI.1. Evaluación de la cantidad de biomasa producida	46
VI.1.1. Conteos de la biomasa celular	47
VI.1.2. Peso seco y contenido de cenizas	48
VI.2. Curvas fotosíntesis- Irradiancia (P-I)	48
VI.3. Análisis bioquímicos	49
VI.3.1. Proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas	49
VI.3.2. Ácidos grasos	51
VI.3.3. Clorofila <i>a</i>	54
VI.4. Nutrientes	56
Capítulo VII. Conclusiones	58
Capítulo VIII. Recomendaciones	60
Capítulo IX. Literatura citada	61
Capítulo X. Anexos	77

Lista de Figuras

Figura		Página
Figura 1.	Valores promedio del número de células de cultivos de <i>N. incerta</i> mantenidos en dos irradiancias (A:100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y B:300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes ("f" y "2f"). Donde:  "f" 20 °C,  "f" 25 °C,  "2f" 20 °C y  "2f" 25 °C. Las barras indican ± 1 desviación estándar.	15

Lista de Tablas

Tabla		Página
Tabla I.	Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de <i>N. incerta</i> mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias, dos temperaturas y dos concentraciones de nutrientes (con base a lo descrito por Guillard y Ryther, 1962).	9
Tabla II.	Valores promedio de la densidad celular inicial (DI) y final (DF) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) en 8 días de cultivo de <i>N. incerta</i> en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	17
Tabla III.	Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) de <i>N. incerta</i> cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos tipos de medio de cultivo (“F” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	18
Tabla IV.	Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^4$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) de <i>N. incerta</i> cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos tipos de medio de cultivo (“F” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	19
Tabla V.	Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) de <i>N. incerta</i> cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos tipos de medio de cultivo (“F” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	20
Tabla VI.	Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) de <i>N. incerta</i> cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos tipos de medio de cultivo (“F” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	21
Tabla VII	Valores promedio del peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de <i>N. incerta</i> mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	23

Lista de Tablas (continuación)

Tabla VIII	Valores promedio de la fotosíntesis máxima por clorofila <i>a</i> ($P_{\text{máx}}$), eficiencia fotosintética (α), índice de saturación lumínica (I_k) y coeficiente de correlación (r^2) de las curvas P-I para cultivos de <i>N. incerta</i> mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	26
Tabla IX	Valores promedio de la composición bioquímica en el peso seco orgánico de los cultivos de <i>N. incerta</i> mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	29
Tabla X	Valores promedio de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en μg de ácidos grasos por mg de peso seco orgánico. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	34
Tabla XI	Valores promedio de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en porcentaje del total de ácidos grasos. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	35
Tabla XII	Valores totales de los ácidos grasos de <i>N. incerta</i> cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en μg de ácidos grasos por mg de peso seco orgánico. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	36
Tabla XIII	Valores totales de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en porcentaje del total de ácidos grasos. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	36
Tabla XIV	Valores promedio de la clorofila <i>a</i> para cultivos de <i>N. incerta</i> mantenidos en distintas condiciones experimentales y en distintas fechas. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.	38
Tabla XV	Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de <i>N. incerta</i> cultivada en baja irradiancia (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja	42

Lista de Tablas (continuación)

temperatura (20 °C) y en dos tipos de medio de cultivo (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en **negrito** son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.

Tabla XVI	Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de <i>N. incerta</i> cultivada en baja irradiancia (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura (25 °C) y en dos tipos de medio de cultivo (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.	43
Tabla XVII	Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de <i>N. incerta</i> cultivada en alta irradiancia (300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja temperatura (20 °C) y en dos tipos de medio de cultivo (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.	44
Tabla XVIII	Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de <i>N. incerta</i> cultivada en alta irradiancia (300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura (25 °C) y en dos tipos de medio de cultivo (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.	45

Capítulo I

Introducción

La importancia del estudio de las microalgas radica en que son el primer eslabón de la cadena trófica (Brown *et al.*, 1989). Su notable diversidad fisiológica les permite producir compuestos de uso acuícola, biotecnológico, cosmetológico y farmacéutico, como el almidón, glicerol, pigmentos, biopolímeros y vitaminas entre otros (Richmond, 1986a,b; Lembi y Waaland, 1988), por lo que su utilización ha adquirido importancia económica. Las microalgas se utilizan para la remoción de nutrientes y metales pesados en el tratamientos de aguas residuales (de la Noüe *et al.*, 1992; Radway *et al.*, 2001). Además las microalgas, se utilizan como alimento para organismos marinos y dulceacuícolas, en particular para larvas y juveniles de crustáceos y moluscos (Richmond, 1990) y como suplemento en las dietas de peces debido a su contenido en minerales (Fábregas *et al.*, 1987). La producción de microalgas como alimento vivo, en comparación con formulaciones alternativas, garantiza mejores niveles de crecimiento y supervivencia (De Pauw y Persoone, 1988; Laing y Millican, 1992), ya que aportan nutrientes importantes de diferente naturaleza y composición (López-Elías, 1990) y satisfacen con mayor eficiencia los requerimientos nutricionales y energéticos a través de la ingestión de las microalgas vivas (Hoff y Snell, 1999).

La productividad y la calidad del cultivo de microalgas depende no sólo de un factor, sino de un conjunto de factores tales como: la irradiancia y la composición espectral de la luz, la temperatura, la salinidad, el tipo y la concentración de nutrientes (Björn *et al.*, 1996). Estos factores causan diversos cambios en la fisiología de las células incluyendo la tasa de crecimiento (Thompson y Guo, 1992a,b; Carvalho y Malcata, 2003), el volumen celular, la composición bioquímica (Renaud *et al.*, 1991), la concentración y la

composición de pigmentos (Ericksen e Iversen, 1995; Sciandra *et al.*, 2000), la actividad fotosintética, el metabolismo del carbono (Turpin, 1991) y la composición nutrimental (Brown *et al.*, 1996).

La luz provee la energía para el crecimiento de las microalgas y es indispensable para el desarrollo de células fotoautotróficas, por lo que es un factor importante en el éxito de un cultivo microalgal. La eficiencia de la utilización de la luz, depende de las características fisiológicas de las células para utilizarla con distinta irradiancias y composición espectral (Rivkin, 1989; Rodríguez *et al.*, 2000).

La temperatura es un parámetro clave, ya que controla el metabolismo y las tasas de todas las reacciones químicas en las microalgas, pero específicamente tiene un efecto directo en los componentes estructurales de las células particularmente en los lípidos (Oliveira *et al.*, 1999; Coles y Jones, 2000; Carvalho y Malcata, 2003).

En estudios previos con varias especies de microalgas, *Rhodomonas* sp. cultivadas entre 27-30 °C, *Cryptomonas*, *Isochrysis* sp. y una Prymnesiofita cultivadas entre 25-35 °C, se ha encontrado una relación directa entre las mayores temperaturas de cultivo respecto a un aumento en la tasa de crecimiento, un incremento en el contenido de lípidos pero con un bajo contenido proteico (Renaud *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha evaluado que la síntesis de lípidos inducida por efecto de la temperatura es una respuesta especie-específica. *e.g.* Tomaselli *et al.* (1988) y Oliveira *et al.* (1999), encontraron que en altas temperaturas (30 °C) las células de *Spirulina platensis* producen altos contenidos de carbohidratos y lípidos. Otros estudios muestran que al incrementar la temperatura del medio se aumenta el contenido proteico y disminuye el contenido de carbohidratos y lípidos para *Spirulina maxima* y *Spirulina plantensis* (Oliveira *et al.*, 1999); *Chaetoceros gracilis* (Mortensen *et al.*, 1988), *Anabaena variabilis* (Satu y Murata, 1980), *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis* sp. (Renaud *et al.*, 1999), *Nitzschia closterium* y *Nitzschia paleacea* (Renaud *et al.*, 1995).

El valor nutritivo de una especie de microalga depende de la composición bioquímica, del tamaño y de su fácil digestibilidad (Thompson *et al.*, 1992a,b). Se han encontrado altas tasas de crecimiento de organismos marinos que han sido alimentados con dietas a base de microalgas con altos contenidos de lípidos y proteínas (Kawamura *et al.*,

1995). Sin embargo, la relación entre la composición bioquímica del alimento y su valor nutricional depende además de otros factores como la disponibilidad del alimento, de la tasa de ingestión y de la capacidad de asimilación del organismo (Webb y Chu, 1983).

La nutrición adecuada de crustáceos, moluscos y peces se ha convertido en una de las áreas importantes dentro de la acuicultura. Por lo que el conocer y satisfacer los requerimientos nutricionales de los diversos organismos cultivados, ha llevado al aumento de los estudios relacionados con la evaluación de los contenidos de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales de diversas especies de microalgas (Richmond, 1990). Brown *et al.* (1989), realizaron una amplia revisión de la literatura del tema y resumieron los requerimientos de diversos constituyentes en las dietas basadas en cultivos de microalgas. Estos autores indican que para un buen crecimiento de larvas de moluscos se requiere entre el 30 y 60% de proteína, entre el 5 y 30% de carbohidratos y entre el 10 y 25% de lípidos.

Los lípidos son moléculas que tienen diversas e importantes funciones biológicas, actúan como componente estructural de las membranas, en el transporte y almacenamiento de combustible catalítico y como cubierta protectora de la superficie de organismos, entre otras importantes funciones fisiológicas. Dentro de los tipos de lípidos se encuentran principalmente triglicéridos, ceras, y fosfolípidos (Lehninger, 1995; Mckee y Mckee, 2003). Los lípidos polares que principalmente se encuentran en las diatomeas son los fosfolípidos, glicolípidos y sulfolípidos (Álvarez-Cobelas y Zarco-Lechado, 1989) y estos lípidos son abundantes en varias especies de diatomeas que se incrementan en la fase estacionaria de su ciclo de vida (Dustan *et al.*, 1994). En la actualidad el uso de ácidos grasos provenientes de diversas especies de microalgas se ha convertido en un aporte de producción de energía a partir de ácidos poliinsaturados (PUFA's). Los PUFA's son componentes esenciales, ya que varios grupos de organismos no tienen la capacidad metabólica para sintetizar *de novo* ácidos grasos con doble ligadura en las posiciones n-3 y n-6, como el ácido araquidónico (AA) 20:4 de la clase n-6, el ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 de la clase n-3 y el ácido docosahexanoico (DHA) 22:6 de la clase n-3 (Tacon, 1990; Brown *et al.*, 1996). Desafortunadamente la cantidad de PUFA's que tienen las microalgas no pueden competir con el contenido de PUFA's que tiene el aceite de pescado,

sin mencionar antes los altos costes de producción de los cultivos microalgales (Zhang *et al.*, 2001). Estos costes pueden ser reducidos con la implementación de cultivos controlados y por la combinación de diversos factores ambientales. Lo anterior contribuirá en una producción exitosa de cultivos microalgales con un valor nutritivo adecuado para el organismo que los consuma.

Las microalgas se caracterizan por su alto contenido de lípidos y ácidos grasos esenciales, en particular el EPA, que las hace adecuadas como alimento para estos organismos (Renaud *et al.*, 1994). Las diatomeas bentónicas tienen un papel muy importante en diferentes etapas del ciclo de vida del abulón. En diversos trabajos se menciona que son inductoras para el asentamiento de larvas y la metamorfosis y en la alimentación del abulón durante la etapa de vida de postlarva y juvenil (Hahn, 1989). Se ha documentado que la larva nadadora de abulón reconoce su nuevo hábitat bentónico por medio de estímulos químicos. Estos estímulos naturales y químicos son producidos por diversos compuestos asociados a neurotransmisores ya sea por microalgas bentónicas (*Navicula* spp., *Nitzschia* spp. y *Cocconeis* spp.), algas coralinas (*Phymatolithon* spp.), mucus de abulones adultos y el ácido γ -amino-n-butírico (GABA) (Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998).

El uso de diatomeas bentónicas como alimento en la acuicultura resulta ser un elemento clave en la producción de cultivos de abulón y de otros organismos herbívoros (erizo), ya que en función de la cantidad y el valor nutricional de las diatomeas se modificará la tasa de crecimiento y de supervivencia de los organismos en cultivo.

Existen pocos estudios sobre el cultivo de microalgas bentónicas (Correa-Reyes *et al.*, 2001; Carbajal-Miranda *et al.*, 2005; Simental-Trinidad *et al.*, 2001, 2004; Daume *et al.*, 2003; Sánchez-Saavedra, 2006). La mayoría de estos trabajos ha sido de tipo descriptivo, listados florísticos y algunos de aspectos fisiológicos (Mercado *et al.*, 2004), ecológicos, reproductivos y taxonómicos (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 1991).

Dada la importancia de las microalgas bentónicas en la alimentación de diversos organismos y los pocos estudios a cerca de las condiciones de cultivo, es importante conocer las mejores condiciones de irradiancia, de temperatura y la concentración de nutrientes en que pueden crecer. Por tal motivo, este trabajo contribuirá en el conocimiento

de las condiciones óptimas para el desarrollo de las diatomeas bentónicas que se usan como alimento para las post-larvas de abulón y para el desarrollo de la acuicultura en Baja California.

Capítulo II

Hipótesis

La irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes son factores que se encuentran estrechamente relacionados en diversos procesos fisiológicos de las microalgas, por lo que esperamos que la combinación de valores elevados de estas tres variables resulte tasas de crecimiento más elevadas, una mayor producción de ácidos grasos, pigmentos fotosintéticos y un mayor consumo de nutrientes.

Capítulo III

Objetivos

III. 1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes respecto al crecimiento, la composición bioquímica, la fotosíntesis y el consumo de nutrientes en cultivos de la diatomea bentónica *Navicula incerta*.

III. 2. Objetivos particulares

1. Evaluar la tasa de crecimiento de *N. incerta* cultivada en dos distintas irradiancias, dos temperaturas y dos concentraciones de nutrientes.
2. Evaluar el efecto de la intensidad luminosa sobre la fotosíntesis máxima, la eficiencia fotosintética y el índice de saturación lumínica de los cultivos de *N. incerta* cultivada en dos distintas irradiancias, dos temperaturas y dos concentraciones de nutrientes.
3. Conocer la composición bioquímica en los cultivos de *N. incerta* bajo distintas irradiancias, temperaturas y concentración de nutrientes.
4. Analizar el perfil y concentración de ácidos grasos de *N. incerta* bajo distintas irradiancias, temperatura y concentración de nutrientes.
5. Estudiar el contenido de pigmentos fotosintéticos en cultivos *N. incerta* bajo distintas irradiancias, temperatura y concentración de nutrientes.
6. Conocer el consumo de nutrientes en cultivos de *N. incerta* bajo distintas irradiancias, temperatura y concentración de nutrientes.

Capítulo IV

Materiales y métodos

IV. 1. Cultivo de *Navicula incerta*

La cepa de *N. incerta* fue proporcionada por el laboratorio de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa fue aislada por el personal del Instituto de Investigaciones Oceanológicas a partir de muestras de agua obtenidas de la Bahía de Playitas en Ensenada, Baja California, México.

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura del CICESE. Se utilizó agua de mar para la preparación de los medios de cultivo, la cual provino del sistema de abastecimiento de agua semicerrado del Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua fue pasada por una serie de filtros de: arena, carbón activado, cartuchos de un gradiente de 20, 10 y 5 μm y para la eliminación de partículas suspendidas fue irradiada con luz ultravioleta.

Los cultivos de *N. incerta* fueron mantenidos de forma rutinaria en cultivos no axénicos y estáticos (Stein, 1973) en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 1.05 kg m⁻² de presión durante 15 min.

Se utilizaron distintas condiciones experimentales para el mantenimiento de los cultivos estáticos de *N. incerta*, descritos en la tabla I. Se mantuvieron dos temperaturas experimentales: 20 ± 1 °C y de 25 ± 1 °C. La iluminación fue continua suministrada por medio de 8 lámparas fluorescente de luz fría (Silvana F40CW). La irradiancia fue medida con un irradiómetro (modelo QSL-100, sensor 4π , Biospherical Instruments), construyendo líneas de igual irradiancia y ajustando los valores experimentales a 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con el propósito de conocer el efecto de la concentración de nitrógeno disponible en el

medio de cultivo, se utilizó el medio de cultivo “f” descrito por Guillard y Ryther (1962) y una doble concentración de aporte de todos los nutrientes en el medio “2f” (Tabla I).

Tabla I. Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de *N. incerta* mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias, dos temperaturas y dos concentraciones de nutrientes (con base a lo descrito por Guillard y Ryther, 1962).

VARIABLES	CONDICIONES EXPERIMENTALES							
Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	100	100	100	100	300	300	300	300
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	20	25	25	20	20	25	25
Concentración de nutrientes	“f”	“2f”	“f”	“2f”	“f”	“2f”	“f”	“2f”

IV. 2. Disgregación de la biomasa de diatomeas

Debido a que las diatomeas bentónicas se adhieren a los sustratos, con el propósito de disgregar, suspender y homogeneizar la distribución de las células, se colocaron 10 gramos de esferas de cristal de 2 mm de diámetro en cada recipiente de cultivo, previo a ser esterilizado. Para la obtención de submuestras para los diversos experimentos, los recipientes de cultivo se agitaron de forma manual con movimientos circulares por 10 segundos, durante 8 días

IV. 3. Evaluación de la cantidad de biomasa producida

IV. 3. 1. Conteos de la biomasa celular

Para evaluar el crecimiento de *N. incerta* mantenida en los cultivos experimentales se realizaron conteos diarios del número de células durante 7 días. Para los conteos se utilizó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (marca Hausser Scientific) y las células fueron observados al microscopio compuesto (Olimpus CX31). Con los datos del conteo de las concentraciones celulares de cada una de las muestras se determinó la tasa específica de crecimiento (μ) utilizando la ecuación propuesta por Fogg y Thake (1987) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) (Nieves *et al.*, 1998).

IV. 3. 2. Peso seco y contenido de cenizas

Se tomaron submuestras de los cultivos de cada condición experimental y se filtró 15 ml del cultivo. Se suspendieron los 15 ml de submuestra en filtros de fibra de vidrio (marca Poretics GF-F de 45 mm) y se enjuagaron con una solución de formiato de amonio al 3% para eliminar las sales del medio. Previamente se lavaron los filtros con agua destilada y se preincineraron en una mufla (Lindeberg Blue M, modelo 828) a una temperatura de 450 °C por un periodo de 6 horas.

El peso seco y el contenido de cenizas de los cultivos se evaluaron siguiendo la metodología descrita por Sorokin (1973). Para evaluar el peso seco, los filtros se mantuvieron en una estufa (marca Liberberg Blue M, modelo OV 560A-2) a una temperatura de 60 °C por un periodo de 8 horas y a distintos intervalos de tiempo los filtros se pesaron en una balanza (marca Mettler, modelo AE-240), hasta alcanzar peso constante. Para evaluar el contenido de cenizas los filtros fueron incinerados en una mufla (Lindeberg Blue M, modelo 828), a una temperatura de 450 °C por un periodo de 6 horas y al final de este procedimiento se obtuvo el peso constante. El peso orgánico de las muestras se calculó para cada caso por medio de la diferencia entre el peso seco y el peso de las cenizas.

IV. 4. Curvas fotosíntesis – Irradiancia (P-I)

Las curvas P-I se realizaron al final del experimento (día 7) y se tomaron 10 ml de submuestra de cultivo de cada condición experimental. Las muestras se colocaron en oscuridad durante 5 minutos, con el fin que las células se mantuviesen ávidas de luz y se pudiera medir su respiración. Para medir la producción de oxígeno de las diatomeas se utilizó una cámara de acrílico, un electrodo de oxígeno de alta sensibilidad y un graficador de la señal detectada por el electrodo.

Se colocaron 7 ml de medio de cultivo en una cámara de acrílico y se burbujeó con nitrógeno gaseoso para obtener un 0% de oxígeno en el medio de cultivo y posteriormente se burbujeó con oxígeno para obtener el 100% de saturación. La respiración de las diatomeas se registró colocando la cámara en oscuridad. La fotosíntesis se midió por medio de la evolución de oxígeno producido con distintas irradiancias. Las muestras fueron irradiadas utilizando como suministro de luz una lámpara de halógeno de 250 W (Xenophot HLX, Osram, Munish, Germany). Las distintas irradiancias se obtuvieron

colocando 6 filtros con malla de distinta abertura dejando pasar diferentes porcentajes de luz. La cantidad de oxígeno producido se determinó con un electrodo de oxígeno de alta sensibilidad (YSI 5331, Yellow Spring Instruments Co., USA).

Se hizo un ajuste de los datos de la producción de oxígeno y de la intensidad luminosa a una regresión lineal y se obtuvo la tasa fotosintética máxima ($P_{\text{máx}}$), el índice de saturación lumínica (I_k) y la eficiencia fotosintética (α) (Platt, 1981; Figueroa *et al.*, 1997).

IV. 5. Análisis bioquímicos

Durante los días 0, 3 y 7, para cada condición experimental se tomaron por triplicado, muestras para análisis de la composición bioquímica. Del volumen cosechado, se tomó una submuestra de 20 ml y se concentró en filtros de fibra de vidrio (Poretics GF/F). Cada filtro fue previamente lavado con agua destilada e incinerado a 470 °C por 4 h.

Todas las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C y se almacenaron hasta obtener el total de las muestras en los experimentos e iniciar los análisis químicos respectivos.

IV. 5. 1. Proteínas

La extracción de las proteínas se hizo con hidróxido de sodio, siguiendo el método descrito por Malara y Charra (1972a). La extracción de proteínas fue con 0.1 N de NaOH a 100 °C por 30 minutos según recomendaciones de Campa-Ávila (2002) y Correa-Reyes (2001). La determinación de proteínas se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu y su cuantificación fue por el método de Lowry *et al.* (1951). Para la elaboración de la curva de calibración de las proteínas, se utilizó como estándar suero de albúmina de bovino (98%).

IV. 5. 2. Carbohidratos

La extracción de carbohidratos se efectuó con ácido sulfúrico siguiendo la técnica descrita por Whyte (1987) y la determinación se realizó con fenol según el método de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972b). El estándar utilizado para la elaboración de la curva de calibración fue una solución de glucosa (99 %).

IV. 5. 3. Lípidos

La extracción de lípidos se realizó mediante una mezcla de cloroformo-metanol-agua, siguiendo la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini

(1972). La cuantificación de lípidos se efectuó por el método de Pande *et al.* (1963). Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó como solución estándar tripalmitina (99 %).

IV. 5. 4. Ácidos grasos

Para conocer la composición de ácidos grasos se utilizaron 20 ml de submuestra de cada tratamiento. Para cada submuestra se realizó una extracción de lípidos siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959) utilizando una mezcla de metanol, cloroformo y agua (1:1:0.9), las alícuotas de los lípidos extraídos fueron puestas a reflujo por tres minutos en una solución en metanol de 0.5 M KOH. La metilación fue lograda por reflujo por tres minutos en una solución de trifluoruro de boro 14% en metanol (BF₃-MeOH), según lo sugerido por Durazo-Beltrán (2003) y Metcalfe *et al.* (1966). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas con cuadrupolo simple (VARIAN CP-3800-1200), con una columna capilar (Omegawax 250) (30 m · 0.32 mm, 0.25 µm grosor de la película, Supelco), detector de ionización de flama (260 °C) e hidrógeno como gas de acarreo. La temperatura inicial del horno fue de 140 °C y se mantuvo por 5 minutos. Posteriormente, se incrementó a una tasa de 4 °C por minuto hasta alcanzar los 250 °C. La identificación de los ácidos grasos se efectuó por comparación con los tiempos de retención relativos de estándares (ésteres metílicos de aceites de fuente marina PUFA-1, PUFA-3, Supelco). Para la cuantificación de ácidos grasos se realizó mediante el uso del ácido nonadecanoico (19:0) como estándar interno.

IV. 5. 5. Clorofila *a*

Para calcular el contenido de pigmentos se utilizó acetona al 90% y se siguió el procedimiento descrito por Parsons *et al.* (1984), siguiendo las técnicas espectrofotométricas descritas para un Hach modelo DR/4000 UV-VIS.

IV. 6. Nutrientes

Los días 0, 3 y 7, se evaluaron los nitratos, los nitritos y los ortofosfatos, siguiendo las técnicas espectrofotométricas descritas para un Hach modelo DR/4000 UV-VIS. Los

nitratos se evaluaron por el método de reducción de cadmio, los nitritos por el medio de diazotización y los ortofostafos con el método de ácido ascórbico (Hach, 1997).

IV. 7. Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las posibles diferencias entre los tratamientos experimentales de conteos celulares, la tasa de crecimiento (μ), la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$), el peso seco total y cenizas, la fotosíntesis, la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y perfiles de ácidos grasos) y la concentración de pigmentos se realizó para cada caso un Análisis factorial (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1979), con un nivel de significancia de $P < 0.05$, los datos debieron cumplir con los postulados de homogeneidad de varianzas, homoscedasticidad, normalidad e independencia.

En los casos en que se detectaron diferencias significativas se utilizó una prueba estadística *a posteriori* de Tukey HSD. Para evaluar las diferencias entre los valores de ácidos grasos obtenidos en los distintos tratamientos, se utilizó una prueba t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0.05$. En el caso de datos obtenidos que no cumplieron las condiciones de normalidad y homoscedasticidad, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATISTICA® versión 6.1 (Statsoft, Inc. 2002).

Capítulo V

Resultados

V. 1. Evaluación de la cantidad de biomasa producida

Las curvas de crecimiento obtenidas en las distintas condiciones experimentales mostraron que *N. incerta* tuvo una fase de crecimiento exponencial desde el primer día de cultivo. La fase exponencial duró hasta el cuarto día y después se inició la fase de crecimiento estacionario, caracterizada por la reducción significativa de la división celular. En ninguno de los tratamientos con *N. incerta* hubo una fase de decaimiento durante el período experimental (Fig. 1).

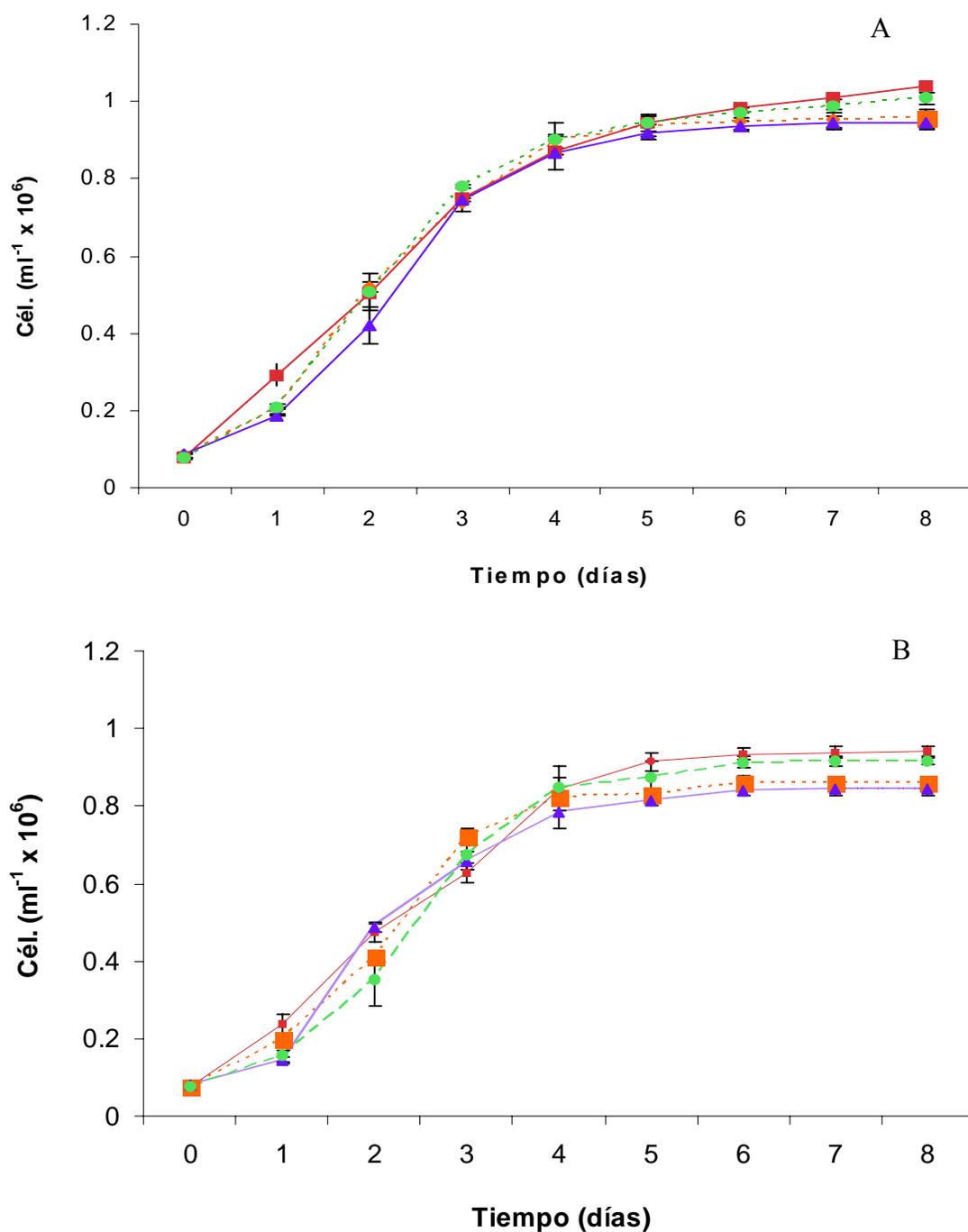


Figura 1. Valores promedio del número de células de cultivos de *N. incerta* mantenidos en dos distintas irradiancias, (A: $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y B: $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes ("F" y "2f"). Donde: ---■--- "F" 20 °C, —■— "F" 25 °C,▲..... "2f" 20 °C y ---◆--- "2f" 25 °C. Las barras indican ± 1 desviación estándar.

En la tabla II se muestra un resumen de los valores promedio de la densidad celular inicial y final, la tasa de crecimiento en la fase exponencial (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) obtenidas en las distintas condiciones de cultivo. Todos los tratamientos se iniciaron con una densidad celular similar, la cual en promedio fue 7.9×10^4 células ml^{-1} con una desviación estándar de 4.8×10^3 células ml^{-1} .

No se encontraron diferencias significativas en los valores de la densidad celular inicial (DI) por efecto del factor irradiancia ($F = 2.38$; $P = 0.676$), temperatura ($F = 0.55$; $P = 0.730$) y de la concentración de nutrientes ($F = 3.78$; $P = 0.607$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 1).

En los valores de la densidad celular final (DF) existieron diferencias significativas (Ver Anexo 2) por efecto del factor irradiancia ($F = 9.97$; $P = 0.015$) (Ver Anexo 2.a), temperatura ($F = 18.93$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 2.b.) y concentración de nutrientes ($F = 3.94$; $P = 0.001$) (Ver Anexo 2.c.). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$).

En los valores de la tasa de crecimiento en la fase exponencial (μ) no se encontraron diferencias significativas por efecto del factor irradiancia ($F = 3.82$; $P = 0.309$), temperatura ($F = 1.93$; $P = 0.357$) y de la concentración de nutrientes ($F = 2.13$; $P = 0.437$). No hay diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 3).

No se encontraron diferencias significativas en los valores de la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$), causados por el efecto del factor irradiancia ($F = 1.51$; $P = 0.249$), la temperatura ($F = 3.54$; $P = 0.371$) y de la concentración de nutrientes ($F = 7.37$; $P = 0.807$). No hay diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 4).

Tabla II. Valores promedio de la densidad celular inicial (DI) y final (DF) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) en 8 días de cultivo de *N. incerta* en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ} \text{C}$)	Concentración de nutrientes	DI	DF	μ	$\Sigma\mu$
100	20	“f”	7.83 (0.15)	86.28 (1.54)	1.07 (0.08)	3.47 (0.25)
		“2f”	8.16 (0.64)	84.38 (1.55)	1.29 (0.04)	3.37 (0.13)
	25	“f”	7.58 (0.88)	93.96 (1.50)	1.32 (0.55)	3.63 (0.04)
		“2f”	7.54 (0.19)	91.64 (1.08)	1.15 (0.03)	3.60 (0.02)
300	20	“f”	8.49 (0.68)	95.54 (2.32)	1.31 (0.07)	3.49 (0.15)
		“2f”	8.86 (0.32)	94.52 (1.64)	1.12 (0.01)	3.41 (0.04)
	25	“f”	7.75 (0.21)	96.73 (1.12)	1.35 (0.06)	3.64 (0.02)
		“2f”	7.58 (0.32)	99.44 (0.04)	1.25 (0.06)	3.73 (0.26)

Debido a las diversas interacciones que existen entre los factores de la irradiancia, temperatura y del medio de cultivo utilizados en los ensayos de *N. incerta*, para los valores promedio del número de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) no se hicieron los análisis *a posteriori* estadísticos para cada factor (Tablas III a VI).

Durante el cultivo, se observó un incremento similar en la densidad celular en los cultivos expuestos a distintas condiciones de irradiancia, gradientes de temperatura y la concentración de nutrientes. La diferencia en la densidad celular entre los tratamientos se detectó después del cuarto día, e independientemente de la concentración de nutrientes el crecimiento de *N. incerta* fue mayor en los cultivos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25°C .

Tabla III. Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) de *N. incerta* cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	DC	μ	$\Sigma \mu$	DC	μ	$\Sigma \mu$
0	7.83 (0.15)	---	---	8.16 (0.64)	---	---
1	19.87 (1.18)	1.35 (0.28)	0.41 (0.08)	14.41 (0.68)	0.82 (0.11)	0.41 (0.08)
2	41.30 (0.72)	1.06 (0.11)	2.41 (0.20)	48.83 (1.39)	1.76 (0.10)	2.58 (0.09)
3	72.17 (2.20)	0.80 (0.06)	3.21 (0.25)	65.92 (2.33)	0.43 (0.07)	3.02 (0.16)
4	82.28 (1.48)	0.19 (0.06)	3.40 (0.20)	78.45 (4.22)	0.25 (0.03)	3.27 (0.19)
5	83.10 (1.27)	0.01 (0.01)	3.42 (0.20)	81.43 (1.15)	0.06 (0.07)	3.32 (0.13)
6	86.09 (1.56)	0.05 (0.05)	3.47 (0.25)	84.15 (1.62)	0.05 (0.01)	3.37 (0.13)
7	86.15 (1.52)	0.00 (0.00)	3.47 (0.25)	84.30 (1.56)	0.00 (0.00)	3.37 (0.13)
8	86.28 (1.54)	0.00 (0.00)	3.47 (0.25)	84.38 (1.25)	0.00 (0.00)	3.37 (0.13)

Tabla IV. Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^4$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) de *N. incerta* cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Medio de cultivo						
Días	DC	“f”		“2f”		
		μ	$\Sigma \mu$	DC	μ	$\Sigma \mu$
0	7.58 (0.88)	---	---	7.54 (0.19)	---	---
1	23.62 (2.50)	1.63 (0.11)	0.41 (0.08)	15.50 (1.40)	1.04 (0.14)	0.41 (0.08)
2	47.36 (2.30)	1.01 (0.22)	2.64 (0.11)	35.04 (6.44)	1.16 (0.41)	2.20 (0.28)
3	62.79 (2.46)	0.41 (0.10)	3.05 (0.02)	67.62 (4.05)	0.96 (0.27)	3.16 (0.12)
4	84.50 (2.75)	0.43 (0.01)	3.48 (0.03)	84.75 (5.74)	0.33 (0.18)	3.49 (0.08)
5	91.53 (2.37)	0.12 (0.01)	3.59 (0.03)	87.19 (4.58)	0.04 (0.03)	3.53 (0.06)
6	93.40 (1.41)	0.03 (0.02)	3.62 (0.04)	91.24 (1.43)	0.07 (0.06)	3.60 (0.02)
7	93.82 (1.39)	0.01 (0.01)	3.63 (0.04)	91.57 (1.33)	0.01 (0.00)	3.60 (0.02)
8	93.96 (1.50)	0.00 (0.00)	3.63 (0.04)	91.64 (1.08)	0.00 (0.00)	3.60 (0.02)

Tabla V. Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) de *N. incerta* cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“F” y “2F”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Medio de cultivo						
Días	DC	“F”		“2F”		
		μ	$\Sigma \mu$	DC	μ	$\Sigma \mu$
0	8.49 (0.68)	---	---	8.86 (0.32)	---	---
1	20.41 (1.33)	1.27 (0.02)	0.41 (0.08)	18.75 (0.02)	1.08 (0.05)	0.41 (0.08)
2	52.08 (1.37)	1.35 (0.12)	2.62 (0.14)	41.19 (4.68)	1.15 (0.17)	2.24 (0.21)
3	73.58 (2.08)	0.50 (0.07)	3.12 (0.13)	74.50 (0.57)	0.84 (0.17)	3.07 (0.05)
4	89.66 (0.01)	0.29 (0.05)	3.40 (0.14)	86.58 (4.26)	0.22 (0.07)	3.29 (0.04)
5	93.73 (2.54)	0.06 (0.01)	3.47 (0.16)	92.05 (2.12)	0.09 (0.06)	3.38 (0.07)
6	94.88 (2.18)	0.02 (0.01)	3.48 (0.15)	93.47 (1.35)	0.02 (0.02)	3.40 (0.04)
7	95.49 (2.33)	0.01 (0.01)	3.49 (0.15)	94.49 (1.64)	0.02 (0.01)	3.41 (0.04)
8	95.54 (2.32)	0.00 (0.00)	3.49 (0.15)	94.52 (1.64)	0.00 (0.00)	3.41 (0.04)

Tabla VI. Valores promedio de la densidad celular (DC) ($\times 10^6$ células ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) de *N. incerta* cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	DC	μ	$\Sigma \mu$	DC	μ	$\Sigma \mu$
0	7.75 (0.21)	---	---	7.58 (0.32)	---	---
1	29.24 (2.83)	1.91 (0.12)	0.41 (0.08)	20.66 (0.14)	1.46 (0.26)	0.41 (0.08)
2	50.20 (3.02)	0.78 (0.19)	2.69 (0.13)	50.79 (1.38)	1.30 (0.03)	2.76 (0.27)
3	74.96 (2.04)	0.58 (0.08)	3.27 (0.06)	78.04 (3.04)	0.62 (0.08)	3.38 (0.20)
4	89.96 (1.97)	0.21 (0.04)	3.49 (0.07)	93.29 (3.58)	0.26 (0.11)	3.36 (0.31)
5	93.73 (2.54)	0.12 (0.04)	3.61 (0.04)	97.37 (0.49)	0.06 (0.05)	3.70 (0.25)
6	95.92 (0.87)	0.02 (0.01)	3.63 (0.03)	97.45 (0.47)	0.00 (0.01)	3.70 (0.24)
7	96.69 (1.16)	0.01 (0.01)	3.64 (0.02)	97.93 (0.00)	0.00 (0.01)	3.71 (0.25)
8	96.73 (1.12)	0.00 (0.00)	3.64 (0.02)	99.44 (0.04)	0.02 (0.01)	3.73 (0.26)

V. 1. 1 Peso seco y contenido de cenizas

En la tabla VII se muestran los resultados de la biomasa final representados por los valores promedio del peso seco total (PST) y del peso seco orgánico (PSO), ambos en $\mu\text{g ml}^{-1}$ en las distintas condiciones de cultivo. Se aplicaron tres estadísticos para analizar los datos de forma individual y conjunta; el primero es solo del día 4 del muestreo, el siguiente es del día 7, y el último analizó el día 4 y 7 de muestreo en forma conjunta.

No hay diferencias significativas en el peso seco total por efecto del factor irradiancia ($F = 1.37$; $P = 0.249$), temperatura ($F = 0.81$; $P = 0.374$) y de la concentración de nutrientes ($F = 0.28$; $P = 0.601$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 5).

Se observó que los mayores valores de peso seco total de *N. incerta* fueron para el cuarto día ($129.50 \mu\text{g ml}^{-1}$), en los cultivos mantenidos a $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f” y para el séptimo día ($142.9 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos expuestos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

No se encontraron diferencias significativas en el peso seco orgánico por efecto del factor irradiancia ($F = 0.49$; $P = 0.827$), temperatura ($F = 0.68$; $P = 0.417$) y de la concentración de nutrientes ($F = 0.38$; $P = 0.544$) (Ver Anexo 6). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del tiempo de cultivo ($F = 56.63$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 6.a.). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de estos factores ($P < 0.050$)

Los mayores valores de peso seco total de *N. incerta* se detectaron en el cuarto día de cultivo ($51.57 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f” y para el séptimo día ($69.40 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

Tabla VII. Valores promedio del peso seco total (PST) y peso seco orgánico (PSO) de cultivos de *N. incerta* mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ} \text{C}$)	Medio de cultivo	Tiempo (días)	PST ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	PSO ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
100	20	“f”	4	79.55 (0.001)	44.46 (4.23)
			7	105.10 (0.001)	59.04 (5.29)
	25	“2f”	4	90.06 (0.001)	46.28 (0.00)
			7	116.22 (0.001)	60.07 (3.17)
		“f”	4	99.97 (0.001)	42.02 (6.26)
			7	100.05 (0.002)	60.07 (3.16)
300	20	“f”	4	92.75 (0.001)	46.28 (0.00)
			7	115.05 (0.002)	58.93 (2.46)
		“2f”	4	129.50 (0.001)	48.37 (16.83)
			7	133.40 (0.001)	63.74 (20.21)
	25	“f”	4	100.52 (0.002)	51.47 (4.44)
			7	125.45 (0.003)	68.65 (0.63)
		“2f”	4	123.45 (0.001)	43.46 (5.12)
			7	142.9 (0.001)	69.40 (3.22)

V. 2. Curvas fotosíntesis – Irradiancia (P-I)

La tabla VIII muestra los valores promedio de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$), la eficiencia fotosintética (α), el índice de saturación lumínica (I_k) y el valor de correlación (r^2).

En el análisis estadístico de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$) no hubo diferencias significativas por efecto de la concentración de nutrientes ($F = 0.27$; $P = 0.667$) (Ver Anexo 7). Sin embargo, hay diferencias significativas por efecto del factor irradiancia ($F = 17.24$; $P = 0.048$) (Ver Anexo 7.a.) y temperatura ($F = 9.29$; $P = 0.001$) (Ver Anexo 7.b.). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$).

Se observó que los mayores valores de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$) de *N. incerta* fueron ($10.45 \mu\text{g clorofila } \alpha \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 10^{-16}$) en los cultivos mantenidos a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2F”.

En la eficiencia fotosintética (α) no se detectaron diferencias significativas por efecto de la concentración de nutrientes ($F = 0.79$; $P = 0.781$) (Ver Anexo 8). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del factor irradiancia ($F = 25.57$; $P = 0.031$) (Ver Anexo 8.a.) y temperatura ($F = 10.80$; $P = 0.001$) (Ver Anexo 8.b.). Para los niveles de interacción de los factores las diferencias fueron significativas en el efecto conjunto de la irradiancia y de la concentración de nutrientes ($F = 7.32$; $P = 0.003$) (Ver Anexo 8.c.). Mientras que en las interacciones no existieron diferencias significativas ($P < 0.050$) (Ver Anexo 8).

De forma análoga a lo descrito para la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$), los mayores valores de la eficiencia fotosintética (α) de *N. incerta* fueron ($4.49 \text{ fmol O}_2 \times 10^{-18} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al mantener los cultivos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

En el índice de saturación lumínica (I_k) no hubo diferencias significativas por efecto de los factores de la temperatura ($F = 0.67$; $P = 0.960$) y por la concentración de nutrientes ($F = 0.79$; $P = 0.875$) (Ver Anexo 9). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del factor de la irradiancia ($F = 3.15$; $P = 0.141$) (Ver Anexo 9.a.). Para los niveles de interacción de los factores no existieron diferencias significativas ($P < 0.050$).

Se observó que los mayores valores del índice de saturación lumínica (I_k) de *N. incerta* fueron ($120.23 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

Tabla VIII. Valores promedio de la fotosíntesis máxima por clorofila *a* ($P_{\text{máx}}$), eficiencia fotosintética (α), índice de saturación lumínica (I_k) y coeficiente de correlación (r^2) de las curvas P-I para cultivos de *N. incerta* mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración de nutrientes	$P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g clorofila } \alpha$ $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1} \times 10^{-16}$)	α ($\text{fmol } \text{O}_2 \times 10^{-18}$ $\text{células}^{-1} \text{h}^{-1}$)	I_k ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	r^2
100	20	“F”	9.18 (0.81)	4.26 (0.77)	63.88 (0.45)	0.94 (0.05)
		“2f”	8.70 (0.47)	4.24 (0.57)	65.11 (0.13)	0.97 (0.01)
	25	“F”	9.32 (0.32)	4.35 (1.73)	65.66 (0.15)	0.94 (0.05)
		“2f”	10.45 (0.21)	4.49 (0.15)	67.88 (0.21)	0.98 (0.02)
300	20	“F”	4.46 (0.01)	3.26 (0.15)	113.23 (0.25)	0.97 (0.01)
		“2f”	4.35 (0.37)	3.27 (0.77)	119.43 (0.23)	0.95 (0.03)
	25	“F”	4.01 (0.35)	3.33 (0.15)	119.67 (0.29)	0.93 (0.00)
		“2f”	4.23 (0.12)	3.40 (0.00)	120.23 (0.05)	0.89 (0.05)

V. 3. Análisis bioquímicos

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de *N. incerta* cultivada en distintas condiciones se muestra en la tabla IX.

V. 3. 1. Proteínas

La irradiancia no afectó significativamente en los porcentajes de proteínas por efecto del factor irradiancia ($F = 1.82$; $P = 0.186$) y temperatura ($F = 0.99$; $P = 0.326$) (Ver Anexo 10). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto de la concentración de nutrientes ($F = 5.12$; $P = 0.031$) (Ver Anexo 10.a.) y el tiempo de cultivo ($F = 10.80$; $P = 0.003$) (Ver Anexo 10.b.). Para los niveles de interacción entre los factores no fueron estadísticamente diferente ($P < 0.050$).

Los mayores porcentajes en el contenido de proteínas de *N. incerta* fueron para el cuarto día (37.48%) y séptimo día (31.41%) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f” (Tabla XI).

V. 3. 2. Carbohidratos

La irradiancia ($F = 0.99$; $P = 0.329$), la temperatura ($F = 0.10$; $P = 0.754$) y la concentración de nutrientes ($F = 0.71$; $P = 0.408$) no afectaron significativamente los porcentajes de carbohidratos (Ver Anexo 11). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del tiempo de cultivo ($F=31.58$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 11.a.). Para los niveles de interacción de los factores no hubo diferencias significativas en los ($P < 0.050$).

Los mayores porcentajes en el contenido de carbohidratos de *N. incerta* fueron para el cuarto día (15.45%) y séptimo día (12.32%) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f” (Tabla XI).

V. 3. 3. Lípidos

La temperatura no afectó significativamente los porcentajes de lípidos ($F = 0.25$; $P = 0.620$) y la concentración de nutrientes ($F = 3.58$; $P = 0.068$) (Ver Anexo 12). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del factor de la irradiancia ($F = 6.94$; $P = 0.013$) (Ver Anexo 12.a.) y el tiempo de cultivo ($F = 20.39$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 12.b.). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$).

Los mayores porcentajes en el contenido de lípidos de *N. incerta* fueron para el cuarto día (13.45%) y séptimo día (16.05%) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f” (Tabla XI).

V. 3. 4. Cenizas

La irradiancia ($F = 0.90$; $P = 0.350$), la temperatura ($F = 0.04$; $P = 0.838$) y la concentración de nutrientes ($F = 1.78$; $P = 0.192$) no afectaron significativamente los porcentajes de cenizas (Ver Anexo 13). Sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del tiempo de cultivo ($F = 31.05$; $P = 0.000$) (Ver Anexo 13.a.). Entre los niveles de interacción de los factores se encontraron diferencias significativas en el efecto conjunto de la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 4.70$; $P = 0.038$) (Ver Anexo 13.b.) y entre la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes ($F = 6.97$; $P = 0.013$) (Ver Anexo 13.c.). Para los demás interacciones no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.050$).

Los mayores porcentajes en el contenido de cenizas de *N. incerta* fueron para el cuarto día (48.33%) y séptimo día (37.73%) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f” (Tabla XI).

Tabla IX. Valores promedio de la composición bioquímica en el peso seco orgánico de los cultivos de *N. incerta* mantenidos en distintas condiciones experimentales. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración de nutrientes	Tiempo (días)	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Total
100	20	“f”	4	31.10 (1.14)	13.56 (0.49)	10.79 (0.24)	40.57 (8.25)	96.02 (2.52)
			7	29.59 (2.58)	12.20 (1.09)	13.39 (1.85)	35.37 (1.38)	90.55 (1.73)
		“2f”	4	31.90 (3.03)	13.88 (1.31)	11.62 (0.64)	43.38 (2.37)	100.77 (1.84)
			7	29.07 (2.05)	11.99 (0.50)	14.39 (1.17)	40.13 (6.42)	95.57 (2.54)
	25	“f”	4	32.24 (1.21)	14.48 (0.64)	10.85 (0.84)	47.63 (0.88)	105.19 (0.89)
			7	28.08 (0.22)	11.73 (0.24)	12.98 (0.93)	39.79 (0.25)	92.59 (0.41)
		“2f”	4	34.80 (9.52)	13.77 (4.00)	11.88 (3.29)	40.51 (0.97)	100.95 (4.45)
			7	30.19 (5.53)	9.78 (1.74)	13.00 (2.37)	36.35 (2.17)	89.33 (2.95)
300	20	“f”	4	29.66 (2.61)	12.79 (1.13)	10.84 (1.40)	48.33 (1.26)	101.62 (1.60)
			7	29.63 (1.77)	12.11 (0.52)	14.21 (0.09)	37.73 (0.83)	93.68 (0.80)
		“2f”	4	36.18 (6.03)	15.05 (2.87)	13.00 (2.27)	42.89 (2.65)	107.11 (3.46)
			7	31.35 (0.28)	11.01 (0.11)	15.38 (1.44)	38.22 (3.84)	95.96 (1.42)
	25	“f”	4	33.40 (4.64)	15.45 (1.98)	12.44 (1.46)	44.89 (1.19)	106.17 (2.32)
			7	29.39 (0.59)	12.32 (0.37)	15.00 (0.49)	38.33 (0.56)	95.04 (0.50)
		“2f”	4	37.48 (1.68)	14.16 (0.93)	13.45 (4.53)	40.99 (0.98)	106.08 (2.03)
			7	31.41 (1.73)	12.02 (0.62)	16.05 (1.37)	39.76 (5.73)	99.24 (2.37)

V. 3. 5. Ácidos grasos

En la tabla X a XIII se muestran los resultados de los ácidos grasos en $\mu\text{g mg}^{-1}$ de biomasa orgánica y en porcentajes, para las diferentes irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), las dos temperaturas (20 y 25 °C) y las dos concentraciones de nutrientes (“F” y “2F”).

Entre los ácidos grasos saturados (SFA) se encontraron el 15:0, 16:0, 18 y 20:0. Para los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se detectaron el 16:1, 18:1n-9 y 22:1n-9. En los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se encontraron el 18:2n-6 trans, 18:2n-6 cis, 18:3n-3, 20:2n-6, 20:4n-6 y 20:5n-3.

En los cultivos de *N. incerta*, los ácidos grasos con las concentraciones mayores (en % del total de ácidos grasos) fueron los MUFA's y PUFA's. Los MUFA's se evaluaron con porcentajes de 36.45% hasta el 45.63%, y los PUFA's con porcentajes de 30.38% hasta el 42.63%. Mientras que los SFA se midieron en porcentajes de 15.64% hasta 23.78% del total de los ácidos grasos y las concentraciones en las muestras se evaluaron en promedio de $5.40 \mu\text{g mg}^{-1} \pm 0.38$ (Tabla XI).

La irradiancia ($F = 2.47$; $P = 0.245$), la temperatura ($F = 1.81$; $P = 0.332$) y la concentración de nutrientes ($F = 0.64$; $P = 0.312$) no afectaron significativamente el contenido del ácido graso 15:0. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 14).

Se observó que los mayores valores de 15:0 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.33% en los cultivos mantenidos con 300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 20 °C y medio “2F”.

No hubo diferencias significativas en el contenido del ácido graso 16:0 por efecto del factor irradiancia ($F = 1.12$ $P = 0.062$), temperatura ($F = 3.42$; $P = 0.120$) y la concentración de nutrientes ($F = 0.34$; $P = 0.079$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 15).

Se observó que los mayores porcentajes de 16:0 en los cultivos de *N. incerta* fueron 22.68% en los cultivos mantenidos con 100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25 °C y medio “F”.

La irradiancia ($F = 2.17$; $P = 0.024$), la temperatura ($F = 0.91$; $P = 0.212$) y la concentración de nutrientes ($F = 1.14$; $P = 0.084$) no afectaron significativamente en el ácido graso 18:0. No existieron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 16).

Se observó que los mayores valores del contenido del 18:0 en los cultivos de *N. incerta* fueron 1.75% en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

No hubo diferencias significativas en el contenido del ácido graso 20:0 por efecto del factor irradiancia ($F = 1.56$; $P = 0.221$), temperatura ($F = 4.64$; $P = 0.090$) y la concentración de nutrientes ($F = 3.93$; $P = 0.071$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 17).

Los mayores valores de 20:0 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.33% en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

Estadísticamente no existieron diferencias significativas en el contenido del ácido graso 16:1 por efecto irradiancia ($F = 2.54$; $P = 0.121$), temperatura ($F = 8.35$; $P = 0.056$) y la concentración de nutrientes ($F = 9.20$; $P = 0.099$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 18).

Los mayores valores de 16:1 en los cultivos de *N. incerta* fueron 43.46% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f”.

La irradiancia ($F = 1.24$; $P = 0.081$), la temperatura ($F = 2.32$; $P = 0.053$) y la concentración de nutrientes ($F = 7.25$; $P = 0.124$), no afectaron en los valores del ácido graso 18:1n-9. No hubo diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 19).

Los mayores valores de 18:1n-9 en los cultivos de *N. incerta* fueron 1.82% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f”.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido del ácido graso 22:1n-9 por efecto del factor irradiancia ($F = 9.28$; $P = 0.325$), temperatura ($F = 6.24$; $P = 0.324$) y la concentración de nutrientes ($F = 3.01$; $P = 0.245$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 20).

Los mayores valores de 22:1n-9 en los cultivos de *N. incerta* fueron 3.24% en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f”.

Los factores irradiancia ($F = 6.28$; $P = 0.349$), temperatura ($F = 6.24$; $P = 0.076$) y la concentración de nutrientes ($F = 3.01$; $P = 0.185$) no afectaron estadísticamente a los valores de ácido graso 18:2n-6 trans. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 21).

Los mayores valores de 18:2n-6 trans en los cultivos de *N. incerta* fueron 1.35% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “F”.

No existieron diferencias significativas en el contenido del ácido graso 18:2n-6 cis por efecto del factor irradiancia ($F = 1.24$; $P = 0.098$), temperatura ($F = 6.04$; $P = 0.376$) y la concentración de nutrientes ($F = 8.24$; $P = 0.421$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 22).

Los mayores valores de 18:2n-6 cis en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.05% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “F”.

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en el contenido del ácido graso 18:3n-3 por efecto del factor irradiancia ($F = 7.24$; $P = 0.127$), temperatura ($F = 8.14$; $P = 0.671$) y la concentración de nutrientes ($F = 1.12$; $P = 0.097$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 23).

Los mayores valores de 18:3n-3 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.54% en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “F”.

La irradiancia no afectó significativamente en el contenido del ácido graso 18:3n-6 ($F = 2.23$; $P = 0.124$), la temperatura ($F = 8.29$; $P = 0.087$) y la concentración de nutrientes ($F = 7.31$; $P = 0.324$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 24).

Se observó que los mayores valores de 18:3n-6 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.41% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “F”.

No hubo diferencias significativas en el contenido del ácido graso 20:2n-6 por efecto del factor irradiancia ($F = 1.27$; $P = 0.061$), temperatura ($F = 8.14$; $P = 0.627$) y la concentración de nutrientes ($F = 3.27$; $P = 0.197$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 25).

Los mayores valores de 20:2n-6 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.33% en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “F”.

La irradiancia ($F = 2.37$; $P = 0.457$), la temperatura ($F = 10.27$; $P = 0.217$), la concentración de nutrientes ($F = 9.04$; $P = 0.087$) no afectaron significativamente en el

contenido del ácido graso 20:4n-6. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 26).

Los mayores contenidos de 20:5n-3 en los cultivos de *N. incerta* fueron 0.71% en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f”.

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en el contenido del ácido graso 20:3n-3 por efecto del factor irradiancia ($F = 12.24$; $P = 0.771$), temperatura ($F = 1.47$; $P = 0.801$) y la concentración de nutrientes ($F = 6.23$; $P = 0.697$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores ($P < 0.050$) (Ver Anexo 27).

Los mayores valores de 20:5n-3 los cultivos de *N. incerta* fueron 39.41 % en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f”.

Tabla X. Valores promedio de ácidos grasos de *N. incerta* cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en μg de ácidos grasos por mg de peso seco orgánico. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

TRATAMIENTOS								
Ácidos Grasos	100 20 f	100 20 2f	100 25 f	100 25 2f	300 20 f	300 20 2f	300 25 f	300 25 2f
SFA								
15:00	0.03 (0.01)	0.02 (0.00)	0.03 (0.01)	0.03 (0.00)	0.02 (0.00)	0.02 (0.00)	0.03 (0.00)	0.02 (0.00)
16:00	2.16 (0.39)	1.90 (0.02)	2.73 (1.64)	2.55 (0.12)	1.66 (0.10)	0.57 (0.45)	1.95 (0.58)	1.19 (0.05)
18:00	0.10 (0.11)	0.09 (0.00)	0.11 (0.06)	0.13 (0.00)	0.08 (0.00)	0.07 (0.02)	0.19 (0.12)	0.07 (0.00)
20:00	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)	0.03 (0.00)	0.03 (0.00)	0.02 (0.00)	0.01 (0.01)	0.02 (0.00)	nd
MUFA								
16:1	3.40 (0.76)	3.38 (0.06)	5.29 (3.23)	4.88 (0.30)	2.94 (0.27)	1.53 (0.39)	4.17 (0.38)	2.54 (0.01)
18:1n-9	0.19 (0.05)	0.07 (0.00)	0.06 (0.04)	0.07 (0.00)	0.10 (0.00)	0.07 (0.02)	0.11 (0.07)	0.06 (0.00)
22:1n-9	0.30 (0.05)	0.19 (0.03)	0.19 (0.11)	0.23 (0.02)	0.32 (0.01)	0.13 (0.02)	0.25 (0.03)	0.14 (0.01)
PUFA								
18:2n-6 trans	0.14 (0.04)	0.09 (0.00)	0.07 (0.04)	0.08 (0.01)	0.09 (0.00)	0.06 (0.01)	0.12 (0.02)	0.05 (0.00)
18:2n-6 cis	nd	nd	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	nd	nd	0.01 (0.02)	nd
18:3n-3	0.05 (0.01)	0.03 (0.00)	0.02 (0.00)	0.03 (0.00)	0.03 (0.00)	0.02 (0.00)	0.04 (0.00)	0.02 (0.00)
18:3n-6	0.05 (0.03)	0.02 (0.00)	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)	0.02 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)
20:2n-6	0.03 (0.01)	nd	nd	nd	nd	0.01 (0.01)	0.04 (0.00)	nd
20:4n-6 (AA)	0.08 (0.01)	0.04 (0.00)	0.04 (0.01)	0.04 (0.00)	0.03 (0.00)	0.00 (0.00)	0.04 (0.00)	0.07 (0.01)
20:5n-3 (EPA)	4.17(0.88)	2.94 (0.05)	3.52 (2.28)	3.71 (0.15)	3.56 (0.22)	1.66 (0.33)	3.68 (0.36)	2.17 (0.11)

nd: dato no detectado

Tabla XI. Valores promedio de ácidos grasos de *N. incerta* cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en porcentaje del total de ácidos grasos. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

TRATAMIENTOS								
Ácidos Grasos	100 20 f	100 20 2f	100 25 f	100 25 2f	300 20 f	300 20 2f	300 25 f	300 25 2f
SFA								
15:00	0.25 (0.02)	0.27 (0.01)	0.22 (0.03)	0.26 (0.01)	0.23 (0.01)	0.33 (0.08)	0.30 (0.02)	0.26 (0.04)
16:00	20.01 (1.25)	21.57 (0.37)	22.68 (1.64)	21.60 (1.12)	18.56 (0.10)	18.16 (0.53)	18.13 (3.76)	18.76 (0.23)
18:00	0.91 (0.83)	1.06 (0.04)	0.88 (0.04)	1.12 (0.07)	0.93 (0.03)	1.75 (0.42)	1.67 (0.80)	1.07 (0.05)
20:00	0.18 (0.01)	0.19 (0.00)	nd	0.22 (0.02)	0.24 (0.02)	0.30 (0.07)	0.22 (0.02)	nd
MUFA								
16:1	31.78 (0.55)	38.50 (0.43)	43.46 (3.01)	41.30 (0.52)	32.78 (1.28)	36.69 (3.09)	39.30 (2.49)	40.14 (0.80)
18:1n-9	1.82 (0.18)	0.82 (0.01)	0.51 (0.06)	0.63 (0.06)	1.14 (0.07)	1.80 (0.46)	1.02 (0.52)	0.89 (0.08)
22:1n-9	2.85 (0.24)	2.14 (0.32)	1.57 (0.11)	1.95 (0.07)	3.59 (0.27)	3.24 (0.35)	2.35 (0.17)	2.20 (0.16)
PUFA								
18:2n-6 trans	1.35 (0.17)	0.97 (0.01)	0.57 (0.07)	0.71 (0.03)	1.05 (0.02)	1.45 (0.22)	1.15 (0.12)	0.80 (0.06)
18:2n-6 cis	nd	nd	0.05 (0.02)	nd	nd	nd	0.10 (0.16)	nd
18:3n-3	0.42 (0.03)	0.31 (0.00)		0.26 (0.01)	0.36 (0.01)	0.54 (0.04)	0.35 (0.03)	0.25 (0.04)
18:3n-6	0.41 (0.14)	0.21 (0.01)	0.18 (0.04)	0.15 (0.03)	0.17 (0.03)	0.00 (0.00)	0.18 (0.06)	0.31 (0.05)
20:2n-6	0.23 (0.07)	nd	nd	nd	nd	0.33 (0.03)	nd	nd
20:4n-6 (AA)	0.71 (0.02)	0.44 (0.03)	0.51 (0.36)	0.34 (0.01)	0.35 (0.00)	0.00 (0.00)	0.41 (0.04)	1.06 (0.16)
20:5n-3 (EPA)	39.08 (0.28)	35.50 (0.56)	39.07 (3.99)	39.41 (0.42)	34.70 (0.50)	34.32 (4.94)	34.68 (2.11)	34.25 (0.66)

nd: dato no detectado

Tabla XII. Valores totales de los ácidos grasos de *N. incerta* cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en μg de ácidos grasos por mg de peso seco orgánico. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

TRATAMIENTOS								
Ácidos Grasos	100 20 f	100 20 2f	100 25 f	100 25 2f	300 20 f	300 20 2f	300 25 f	300 25 2f
SFA	2.31	2.03	2.9	2.74	1.78	0.67	2.19	1.28
MUFA	3.89	3.54	5.54	5.18	3.36	1.73	4.53	2.74
PUFA	4.52	3.12	3.68	3.89	3.73	1.75	3.95	2.33
Total	10.72	8.79	12.12	11.81	8.87	4.15	10.67	6.35

Tabla XIII. Valores totales de ácidos grasos de *N. incerta* cultivada a dos irradiancias (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Expresado en porcentaje del total de ácidos grasos. Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar.

TRATAMIENTOS								
Ácidos Grasos	100 20 f	100 20 2f	100 25 f	100 25 2f	300 20 f	300 20 2f	300 25 f	300 25 2f
SFA	21.35	23.12	23.78	23.21	19.96	15.64	20.33	20.10
MUFA	36.45	41.46	45.63	43.88	37.51	41.73	42.67	43.23
PUFA	42.20	35.45	30.38	32.87	41.63	42.63	36.88	36.67
Total	100.00	100.00	99.78	99.96	99.10	100.00	99.88	100.00

V. 3. 6. Clorofila *a*

En la tabla XIV se muestran los valores de clorofila *a* de los cultivos de *N. incerta*. Se encontraron diferencias significativas en los valores de clorofila *a* (Ver Anexo 28) por efecto de la irradiancia ($F = 22.12$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.a.), de la temperatura ($F = 20.94$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.b.), de la concentración de nutrientes ($F = 46.58$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.c.) y del tiempo ($F = 25.07$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.d.). También se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores de la irradiancia y la concentración de nutrientes ($F = 15.25$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.e.), la temperatura y la concentración de nutrientes ($F = 15.16$; $P = 0.000$) (Ver Anexo 28.f.), la irradiancia y el tiempo de cultivo ($F = 22.12$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.g.), la temperatura y el tiempo de cultivo ($F = 20.94$; $P = 0.000$) (Ver Anexo 28.h.), la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 46.58$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.i.), la irradiancia, la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 15.25$ $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.j.) la temperatura, la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 15.16$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 28.k.).

El valor inicial de clorofila *a* de *N. incerta* fue de $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los menores valores fueron para el cuarto día ($0.39 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f” y el séptimo día ($0.30 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “f”. Los mayores valores fueron para el cuarto día ($0.86 \mu\text{g ml}^{-1}$) y séptimo día ($0.83 \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y medio “2f” (Tabla XIV).

Tabla XIV. Valores promedio de la clorofila *a* para cultivos de *N. incerta* mantenidos en distintas condiciones experimentales y en distintas fechas. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración de nutrientes	Tiempo (días)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
100	20	“F”	0	0.80 (0.01)
			4	0.81 (0.06)
			7	0.71 (0.06)
		“2f”	0	0.80 (0.01)
			4	0.84 (0.01)
			7	0.81 (0.05)
	25	“F”	0	0.80 (0.01)
			4	0.87 (0.06)
			7	0.69 (0.00)
		“2f”	0	0.80 (0.01)
			4	0.86 (0.01)
			7	0.83 (0.05)
300	20	“F”	0	0.80 (0.01)
			4	0.70 (0.06)
			7	0.39 (0.09)
		“2f”	0	0.80 (0.01)
			4	0.72 (0.01)
			7	0.42 (0.00)
	25	“F”	0	0.80 (0.01)
			4	0.40 (0.02)
			7	0.33 (0.03)
		“2f”	0	0.80 (0.01)
			4	0.39 (0.05)
			7	0.40 (0.01)

V. 4. Nutrientes

En las tablas XV a XVIII se presentan los valores promedio de la remoción de nitratos (NO_3) y ortofosfatos (PO_4) y la producción de nitritos (NO_2).

V. 4. 1. Nitratos

No se encontraron diferencias significativas en los valores de nitratos (NO_3) por efecto de los factores de la temperatura ($F = 2.12$; $P = .0153$) (Ver Anexo 29). Se encontraron diferencias significativas en los valores de nitratos por efecto del factor de la irradiancia ($F = 37.81$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 29.a.), de la concentración de nutrientes ($F = 22850.24$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 29.b.) y del tiempo de cultivo ($F = 6947.70$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 29.c.). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción por efecto del factor de la irradiancia y temperatura ($F = 8.80$; $P = 0.005$) (Ver Anexo 29.d.), de la irradiancia y el tiempo de cultivo ($F = 37.80$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 29.e.), de la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 609.31$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 29.f.) y la irradiancia, la temperatura y tiempo de cultivo ($F = 8.83$; $P = 0.005$) (Ver Anexo 29.g.).

Para el medio de cultivo “f” el valor inicial de nitratos de *N. incerta* fue de 4.60 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (2.11 mg l^{-1}) y séptimo día (0.84 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25 °C (Tabla XVIII).

Para el medio de cultivo “2f” el valor inicial de nitratos (NO_3) de *N. incerta* fue de 9.70 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (0.84 mg l^{-1}) y séptimo día (0.86 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25 °C (Tabla XVIII).

V. 4. 2. Ortofosfatos

Se encontraron diferencias significativas en los valores de ortofosfatos (PO_4) (Ver Anexo 30) por efecto de la irradiancia ($F = 1359429.30$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.a.), la temperatura ($F = 53.24$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.b.), de la concentración de nutrientes ($F = 246.02$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.c.) y el tiempo de cultivo ($F = 89926.20$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.d.). También se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores de la irradiancia y la temperatura ($F = 653789.35$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.e.), la irradiancia y la concentración de nutrientes ($F = 570.70$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.f.), la temperatura y la concentración de nutrientes ($F = 157.28$; $P < 0.050$)

(Ver Anexo 30.g.), la irradiancia y el tiempo de cultivo ($F = 1254.81$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.h.), la temperatura y el tiempo ($F = 53.14$; $P = 0.005$) (Ver Anexo 30.i.), la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 246.56$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.j.), la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes ($F = 76836.75$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.k.), la irradiancia, la temperatura y el tiempo de cultivo ($F = 390.01$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.l.) la irradiancia, la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 570.09$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.m.), la temperatura, la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 157.71$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.n.) y la irradiancia, la temperatura, de la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 1254.41$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 30.ñ.).

Para el medio de cultivo “f” el valor inicial de ortofosfatos de *N. incerta* fue de 5.90 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (2.11 mg l^{-1}) y séptimo día ($0.00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Tabla XVII).

Para el medio de cultivo “2f” el valor inicial de ortofosfatos de *N. incerta* fue de 1.080 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (3.70 mg l^{-1}) y séptimo día ($0.00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Tabla XVIII).

V. 4. 3. Nitritos

Se encontraron diferencias significativas en los valores de nitritos (NO_2) (Ver Anexo 31) por efecto del factor de la irradiancia ($F = 2549.60$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.a.), la temperatura ($F = 32.05$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.b.), la concentración de nutrientes ($F = 474.00$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.c.) y el tiempo de cultivo ($F = 15594.00$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.d.). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de interacción de los factores de la irradiancia y de la concentración de nutrientes ($F = 653789.35$ $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.e.), irradiancia y el tiempo de cultivo ($F = 570.70$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.f.), la temperatura y el tiempo ($F = 157.28$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.g.) la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 1254.81$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.h.), la irradiancia, la temperatura y la concentración de nutrientes ($F = 53.14$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.i.), la irradiancia, la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 53.14$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.j.) y la irradiancia, la temperatura,

la concentración de nutrientes y el tiempo de cultivo ($F = 53.14$; $P < 0.050$) (Ver Anexo 31.k.).

Para el medio de cultivo “f” el valor inicial de nitritos de *N. incerta* fue de 0.00 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (0.114 mg l^{-1}) y séptimo día ($0.158 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Tabla XVIII).

Para el medio de cultivo “2f” el valor inicial de nitritos de *N. incerta* fue de 0.00 mg l^{-1} , los menores valores de remoción fueron para el cuarto día (0.199 mg l^{-1}) y séptimo día ($0.289 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en los cultivos mantenidos con $300 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Tabla XVII).

Tabla XV. Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de *N. incerta* cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)
0	4.60 (0.05)	5.90 (0.01)	0.00 (0.00)	9.70 (0.02)	10.8 (0.01)	0.00 (0.00)
	100	100	0	100	100	0
4	3.18 (0.08)	1.44 (0.00)	0.06 (0.00)	6.33 (0.02)	2.11 (0.02)	0.08 (0.01)
	69	24	0.06	68	19	0.08
7	2.63 (0.02)	0.03 (0.00)	0.08 (0.00)	4.73 (0.05)	0.07 (0.07)	0.121 (0.00)
	56	0	0.08	48	0	0.12

Tabla XVI. Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de *N. incerta* cultivada en baja irradiancia ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)
0	4.60 (0.05)	5.90 (0.01)	0.00 (0.00)	9.70 (0.02)	10.8 (0.01)	0.00 (0.00)
	100	100	0	100	100	0
4	3.16 (0.00)	1.04 (0.00)	0.06 (0.03)	6.83 (0.02)	1.95 (0.02)	0.06 (0.01)
	68	18	0.06	70	10	0.06
7	2.27 (0.02)	0.06 (0.00)	0.07 (0.00)	4.39 (0.04)	0.067 (0.05)	0.14 (0.00)
	49	0	0.07	45	0	0.14

Tabla XVII. Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de *N. incerta* cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)
0	4.60 (0.05)	5.90 (0.01)	0.00 (0.00)	9.70 (0.02)	10.8 (0.01)	0.00 (0.00)
	100	100	0	100	100	0
4	2.88 (0.08)	1.08 (0.00)	0.13 (0.00)	6.57 (0.02)	1.95 (0.02)	0.19 (0.01)
	62	18	0.13	59	17	0.19
7	2.55 (0.02)	0.01 (0.00)	0.14 (0.00)	3.80 (0.03)	0.05 (0.02)	0.28 (0.00)
	55	0	0.14	55	0	0.28

Tabla XVIII. Valores promedio de la cantidad de nitratos, ortofosfatos y nitritos de *N. incerta* cultivada en alta irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en dos concentraciones de nutrientes (“f” y “2f”). Los valores entre paréntesis indican ± 1 desviación estándar. Los valores en negrito son porcentajes de remoción de los nitratos y ortofosfatos y de los nitritos son valores de producción.

Medio de cultivo						
Días	“f”			“2f”		
	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)	Nitratos (mg l ⁻¹)	Ortofosfatos (mg l ⁻¹)	Nitritos (mg l ⁻¹)
0	4.60 (0.05)	5.90 (0.01)	0.00 (0.00)	9.70 (0.02)	10.8 (0.01)	0.00 (0.00)
	100	100	0	100	100	0
4	2.71 (0.00)	1.04 (0.00)	0.11 (0.00)	6.24 (0.02)	1.16 (0.02)	0.19 (0.01)
	67	17	0.11	64	10	0.19
7	2.10 (0.02)	0.02 (0.01)	0.16 (0.02)	3.7 (0.02)	0.03 (0.01)	0.26 (0.00)
	39	0	0.16	38	0	0.26

Capítulo VI

Discusión

VI. 1. Evaluación de la cantidad de biomasa producida

Los resultados de este estudio indican que las células de *N. incerta* tienen la capacidad de formar un tapete celular homogéneo que se adhiere fuertemente al sustrato a 20 y 25 °C, a 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero solo con el medio “f”. En los tratamientos con el medio “2f” hubo muy poca adhesión al sustrato, formando una serie de grumos suspendidos en el agua. Estudios de la producción de carbohidratos de diatomeas mencionan que la adhesión está en función de las condiciones ambientales y por eso es importante entender su bioquímica y ecología.

Myklestad y Haug (1972), encontraron evidencia en un análisis estructural de los exopolisacáridos, los cuales son los responsables de la adhesión de las células microalgales al sustrato. Myklestad (1974) demostró con *Chaetoceros affinis* y *Skeletonema costatum* evidencia, de que los cambios en el metabolismo de carbohidratos estaban en función de las proporciones de nitrógeno y fósforo. Estos resultados demuestran que la síntesis de polisacáridos extracelulares depende de la proporción del nitrógeno y el fósforo en el medio de cultivo y estos cambios en el metabolismo se ven también reflejados en la adhesión de las microalgas al sustrato.

Hudon y Bourget (1983), mencionan que las cepas de los géneros *Navicula* y *Nitzschia* son altamente móviles y con poca capacidad de adhesión al sustrato. Mientras que el género de *Amphora* son de bajo movimiento y tiene fuerte capacidad de adhesión al sustrato. En este trabajo no se aplicó el tratamiento de ultrasonido debido a que en estudios previos se demostró que produce importantes cambios en el crecimiento y en la composición bioquímica de *N. incerta* (Correa-Reyes, 2001). Por lo anterior se optó por

utilizar pequeñas esferas de cristal, para poder remover y disgregar los tapetes de *N. incerta* en los sistemas experimentales.

El crecimiento de *N. incerta* a través del tiempo, fue exponencial desde el día 0 hasta el día 4 del cultivo. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Cota-Sánchez (1988) y Cuevas-Rocha (1988) y Correa-Reyes (2001), en donde obtuvieron crecimientos exponenciales en microalgas bentónicas hasta el día 4 y 5 de cultivo.

VI. 1. 1. Conteos de la biomasa celular

Las distintas condiciones de irradiancia, temperatura y nutrientes afectan de forma significativa el crecimiento de cultivos de microalgas.

La biomasa celular de *N. incerta* tuvo una clara tendencia a incrementarse a 300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 25 °C. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por varios autores con especies de diatomeas bentónicas y otras especies de microalgas planctónicas como en: *Amphiprora* c.f. *paludosa*, *Nitzschia sigma*, *Nitzschia* c.f. *dissipata*, *Navicula arenaria* (Admiral, 1977), *Navicula gregaria*, *N. ammophila* (Kennett y Hargraves, 1985) e *Isochrysis galbana* (López-Muñoz *et al.*, 1992), para las que se mencionan que los factores de irradiancia y temperatura incrementan la cantidad de biomasa o densidad celular hasta el valor óptimo para cada especie.

Las curvas de crecimiento de *N. incerta* solo registraron diferencias significativas en la densidad final (DF), ya que durante la fase exponencial, se observó un incremento en la DF para todos los tratamientos. Estas diferencias se deben al efecto sinérgico entre los factores de irradiancia, temperatura y cantidad de nutrientes. La tasa de crecimiento de *N. incerta* (μ), aumentó en función de la mayor irradiancia (300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y la mayor temperatura (25 °C) hasta alcanzar su valor máximo. Sin embargo, la tendencia de los resultados obtenidos en este estudio, solo concuerda con lo reportado por otros autores en la relación de la irradiancia y la temperatura y difiere en la respuesta medida en las diferentes concentraciones de nutrientes. Maddux y Jones (1964), en cultivos de *Nitzschia closterium* y *Tetraselmis* sp., mostraron que la diferencia en la concentración de nutrientes produce cambios en el requerimiento de luz para alcanzar la máxima tasa de crecimiento. Rhee y Gotham (1981) en *Scenedesmus* sp. y *Fragilaria crotonensis*, encontraron una

tendencia similar a lo encontrado en este estudio y lo atribuyen a una relación compensatoria entre un equilibrio entre la disponibilidad de luz y/o nutrientes.

VI. 1. 2 Peso seco y contenido de cenizas

El peso seco total y el peso seco orgánico de *N. incerta* mostraron que las mayores biomásas se obtuvieron en la irradiancia de $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en la temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Flores-Vergara (1998), encontró que con las distintas especies de diatomeas bentónicas estudiadas las mayores biomásas se obtuvieron a 20 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, aunque la respuesta es especie-específica. Otros autores, en experimentos con gradientes de temperatura, encontraron que distintas cepas de microalgas bentónicas crecieron más a temperaturas de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ que las de 15 y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Cox *et al.*, 1977; James *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1996).

VI. 2. Curvas fotosíntesis – Irradiancia (P-I)

Diversos autores encontraron que hay un incremento en la capacidad fotosintética cuando se incrementa la temperatura hasta un nivel óptimo y después declina. Reynolds (1984), observó que los mayores cambios en las tasas fotosintéticas para las diatomeas del género *Navicula* ocurren entre 25 a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los cultivos de *N. incerta* en baja irradiancia, $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y alta temperatura, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, registraron valores superiores de $P_{\text{máx}}$ y α , respecto a los cultivos aclimatados en alta irradiancia. Estos resultados coinciden con otros estudios para la misma especie y otras diatomeas bentónicas (Harris, 1980; Reynolds, 1984; Mercado, 2004). Lo que sucede es que la tasa fotosintética y la irradiancia, están relacionadas positivamente con la temperatura. Perry *et al.* (1981) utilizando *Ditylum brightwelli* Westt, Thinh (1983) en *Cryptomonas* cepa Lis, Sakshaug (1977) con *Skeletonema*, Redalje y Laws (1983) al estudiar *Thalassiosira allni* y *S. costatum* y Bartual *et al.* (2002) con *Rhodomonas salina*, indican que la saturación de luz se obtuvo en las temperaturas más bajas (15 y $20 \text{ }^\circ\text{C}$), mientras que las condiciones de no saturación se encontraron en las temperaturas más elevadas (25 y $28 \text{ }^\circ\text{C}$).

También se ha encontrado, que la tasa de crecimiento de varias diatomeas alcanza su nivel de saturación entre 50 y $200 \mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con distintas temperaturas (Coljin y Van Buur, 1975, Thompson *et al.*, 1990; Susuki y Takahashi, 1995). Sin

embargo, algunos autores mencionan que la saturación de la luz para las diatomeas bentónicas se alcanza a valores de irradiancia mayores de $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Mills y Wilkinson, 1986; Kromkamp *et al.*, 1998). Estos autores encontraron que la fotoinhibición por efecto de la irradiancia está casi ausente a altos niveles de irradiancia, con valores de $700 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en verano de $1200 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en invierno (Cox *et al.*, 1977; James *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1996).

VI. 3. Análisis bioquímicos

La composición bioquímica de los cultivos microalgales depende de la especie utilizada, de la técnica del cultivo seleccionada, de la fase de crecimiento y de las condiciones ambientales del laboratorio o granja, las cuales suelen variar ampliamente (Richmond, 1986a,b). La interacción de la irradiancia, la temperatura y los nutrientes son los que modifican de la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos en los cultivos de microalgas (Mortensen *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1992a, 1992b). Brown (1991) analizó la composición bioquímica de varias diatomeas, donde las proteínas fueron siempre el componente principal, seguido usualmente por los lípidos y por último los carbohidratos. Esta secuencia también sucedió en todos los tratamientos utilizados para los cultivos de *N. incerta* en éste estudio. Zhu *et al.* (1997), encontraron que existe una tendencia hacia la acumulación de carbohidratos en la fase estacionaria y en los tratamientos a $15 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que el mayor contenido de proteínas se presentó en la fase exponencial. En los estudios relacionados con la nutrición de organismos acuáticos como los moluscos, se menciona que los lípidos son importantes componentes estructurales y de las membranas celulares y que la mayoría de los organismos marinos los requieren como componentes esenciales.

Se ha demostrado que ecológicamente la proporción de de proteínas y carbohidratos encontrados en las diatomeas representan un buen indicador del estado fisiológico de las poblaciones en cultivo o en condiciones naturales (Sakshaug y Myslestad, 1973).

VI. 3. 1. Proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas

En la composición proximal de *N. incerta*, se obtuvieron porcentajes de proteínas de 29.39 a 37.48%, carbohidratos de 9.78 a 15.45% y lípidos y 10.79 a 16.05%, similares a los valores de Simental-Trinidad *et al.* (2001) para la misma especie, 23.34 a 35.15%, de

carbohidratos 7.18 a 13.19% y de lípidos 9.249 a 15.16% en cultivos mantenidos a $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ y con menor concentración de nutrientes (“f/2”) elaborados con fertilizante agrícolas. Flores-Vergara (1998) para *Navicula* c.f. *cincta* encontró valores de proteína de 22.03 a 36.94%, de carbohidratos 6.22 a 13.57% y de lípidos 20.67 a 52.71%, para cultivos mantenidos a temperaturas de 15 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e irradiancias de 80 y $160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos se encuentra influenciado por una gran variedad de factores, entre los que se encuentran, la calidad y la cantidad de luz incidente, la concentración de nutrientes, la forma química de los nutrientes, la temperatura, el pH, la disponibilidad de carbono, la especie bajo cultivo, entre otros factores (Thompson *et al.*, 1990, Renaud *et al.*, 1995).

La deficiencia de algunos nutrientes como el nitrógeno, fósforo y sílice, en cultivos microalgales aumentan de la producción de carbohidratos y lípidos a expensas de la síntesis de proteínas (Bhosle *et al.*, 1993). En los cultivos de *N. incerta* estas deficiencias no se evaluaron, ya que la proporción de nutrientes disponibles en el medio no se agotó, según los valores de nitratos y fosfatos evaluados en el medio “f” y “2f”.

De forma análoga a lo descrito para los valores de proteínas de *N. incerta*, los mayores porcentajes de carbohidratos se evaluaron con la mayor temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y en la mayor irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El contenido de carbohidratos en *Thalassiosira allni* (Redalje y Laws, 1983), *Isochrysis* (clone T. ISO) (Brown *et al.*, 1996), *Phaeodactylum tricorutum* (Chismandha y Borowitzka, 1994), *Isochrysis* (clone T. ISO), *Nitzschia closterium* y *Nitzschia paleacea* (Renaud *et al.*, 1995), en *Thalassiosira pseudonana* (Brown *et al.*, 1993) y para la especie *Navicula* c.f. *cincta* (Flores-Vergara, 1998) evalúan que se incrementa directamente con la irradiancia y en las especies *Hymenomonas elongata* e *Isochrysis galbana* (Clasutre y Gostan, 1987) y *Amphora* (de la Peña, 2007) los carbohidratos aumentan por efecto de la temperatura (Tomaselli *et al.*, 1988; Oliveria *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos con *N. incerta* muestran que los mayores porcentajes de lípidos se encontraron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y en $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El porcentaje de lípidos en las diatomeas se ve afectado por los cambios de la irradiancia y la temperatura, induciendo cambios en la membrana fosfolípida. Estos cambios modifican la fluidez de la membrana

e interrumpen el proceso de biosíntesis de los lípidos en la elongación o desaturación. Lo anterior implica que la luz puede producir cambios en la calidad de los ácidos grasos de las microalgas usadas como alimento en diversas especies marinas y dulceacuícolas (Tomaselli *et al.*, 1988; Oliveria *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1990; Bhosle *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Chismandha y Borowitzka, 1994; Renaud *et al.*, 1995; Flores-Vergara, 1998; Lafarga de la Cruz, 2000; Sáenz-Gaxiola, 2002).

Las diatomeas contienen altos porcentajes de cenizas, aportados principalmente por el sílice de la pared celular de la microalga. En este trabajo se evaluaron porcentajes de 35.37 a 48.33%, estos porcentajes son mayores a los mencionados por Simental-Trinidad *et al.* (2001), quienes describen para *N. incerta* valores de 28 a 41.10% para cultivos mantenidos en 21 °C y 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Flores-Vergara (1998) indica para *Navicula c.f. cincta* tienen porcentajes de 28.83 a 38.39% al cultivarla a 15, 20 y 25 °C y con irradiancias de 80 y 160 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

VI. 3. 2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son uno de los componentes más importantes en la dieta de los organismos cultivados. En diversas especies de moluscos, crustáceos y peces se ha observado que los ácidos grasos 20:4, 20:5 y 20:6, especialmente el n-3 y n-6, son indispensables para obtener mejores niveles de crecimiento y de supervivencia (Brown *et al.*, 1996; Correa-Reyes *et al.*, 2008).

Existen pocos estudios sobre la evaluación de ácidos grasos en diatomeas bentónicas. Las cantidades relativas de ácidos grasos (en % con respecto al total de ácidos grasos) en las diatomeas estudiadas se encontraron dentro de los intervalos por otros autores para diversas diatomeas. Flores-Vergara (1998), menciona que para *Navicula c.f. cincta*, *Amphora* sp. y *Nitzschia* sp. cultivadas a diferentes intensidades luminosas encontró una diferencia mínima en los porcentajes de ácidos grasos, lo cual es similar a lo encontrado en el trabajo de Brown *et al.* (1993) con *Isochrysis* sp.

Los porcentajes de los ácidos grasos de 14:0 y 16:0 en la dieta de peces y crustáceos se han correlacionado con altos niveles de crecimiento. Por lo que dietas con altos niveles de estos ácidos grasos saturados son importantes para un rápido crecimiento de larvas, ya que la energía es liberada más eficientemente (Thompson *et al.*, 1992a). Se ha

documentado que el 16:0 es principalmente un producto de reserva de la energía excedente en diatomeas. Además, el 16:0 decrece en las diatomeas a bajas irradiancias (Thompson *et al.*, 1990). Esta tendencia podría explicar los altos porcentajes del 16:0 encontrados en los tratamientos de altas intensidades luminosas en los cultivos con *N. incerta*.

En este estudio, el perfil de ácidos grasos encontrados en *N. incerta*, es similar a lo descrito para otras especies de diatomeas bentónicas, se encontraron altos valores de 16:0, 16:1 y 20:5 n-3. En la literatura se indica que la suma de los porcentajes de estos ácidos rebasa el 60% del total de los ácidos (Zhukova y Aizdaicher, 2000; Correa-Reyes *et al.*, 2008). Este porcentaje coincide con este trabajo ya que la suma de 16:0, 16:1 y 20:5 n-3 rebasó el 90% del total de los ácidos grasos.

Dustan *et al.* (1994) menciona la predominancia de los ácidos grasos 16:1 con respecto al 16:0 como una característica propia de las diatomeas y la misma predominancia de estos ácidos grasos se encontró en este estudio. Este ácido graso no interviene en las funciones metabólicas; sin embargo, se menciona que este ácido graso es precursor de los ácidos de cadena larga como el 18:2 y 18:4.

Para la diatomeas de los géneros de *Navicula*, *Amphora*, *Nitzschia*, *Cocconeis*, *Chaetoceros*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* los valores del ácido graso C₁₈ son menores al 2% (Volkman *et al.*, 1989; Dunstan *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996). Los valores del C₁₈ encontrados en este estudio fueron entre el 5 y 10 % mayores a lo de otros autores.

Se considera que el 18:1 es un intermediario en la biosíntesis de ácidos grasos y precursor de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en diatomeas. Las concentraciones de los ácidos de C₁₈, a excepción del 18:1, son bajas en diatomeas bentónicas y raramente exceden el 1% (Reitan *et al.*, 1994).

Los valores de los ácidos grasos (C₂₀) evaluados con *N. incerta* en este trabajo se ha reportado por varios autores (Renaud *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996; Flores-Vergara, 1998; Sáenz-Gaxiola; 2002). El ácido graso 20:4 n-6 (ácido araquidónico) es común en los estudios relacionados con diatomeas, con valores entre el 0.1 y 0.9% y varias especies de diatomeas tienen proporciones significativas de este ácido (Volkman *et al.*, 1989; Dunstan *et al.*, 1994). Se ha sugerido que los peces marinos, especialmente los salmónidos requieren ácido araquidónico, ya que este ácido es precursor de prostaglandinas y eicosanoides, que

son de suma importancia en mecanismos bioquímicos de crecimiento y reproducción así como en procesos de inflamación, estrés y contracción muscular, lo cual es de suma importancia en el cultivo de distintos organismos acuáticos (Napolitano *et al.*, 1990). Este ácido fue detectado en este estudio con valores desde el 0% hasta el 1.08%. Las concentraciones de este ácido se hayan en proporciones muy bajas entre el 0.01% hasta el 2.5% para otras especies de diatomeas cultivadas (Flores-Vergara, 1998). Investigaciones realizadas por diversos autores demuestran que el ácido araquidónico quizá puede ser crítico en la reproducción y desarrollo de bivalvos, el cual es acumulado como fosfolípido, lo que indica su papel específico en la membrana celular (Joseph, 1982). Por otro lado, el ácido araquidónico está involucrado en la maduración gonadal de *Crassostrea gigas* (Ono *et al.*, 1982), también en la regulación osmótica de *Mytilus demisus* (Freas y Grollman, 1980) y en la inducción del desove del abulón *H. rufescens* y el mejillón *M. californianus* (Morse *et al.*, 1977).

Las diatomeas bentónicas presentan altos valores del ácido graso 20:5 n-3, (EPA), especialmente cuando son cultivadas a irradiancias menores a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Thompson *et al.*, 1990; Viso y Marty, 1993), lo cual concuerda con lo evaluado en este trabajo para *N. incerta*, ya que con la menor intensidad luminosa se encontró la mayor concentración de este ácido graso en valores promedio de 39.41%. Correa-Reyes *et al.* (2008) 14.2% de EPA para la misma especie. Sukenik *et al.* (1989) señalan que la mayor concentración de EPA se presenta cuando las células se desarrollan en condiciones limitantes de luz ($0.03 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Esto es debido a que existe una baja capacidad fotosintética y ante esta limitante los triglicéridos se consumen como fuente de energía directa y mantenimiento celular, además los lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, galactolípidos, entre otros) aumentan, por lo tanto el EPA también lo hace debido a que la mayoría de los HUFA's se encuentran en la parte polar de la membrana celular.

Thompson *et al.* (1990) no encontraron una relación específica entre la intensidad luminosa y la concentración de un ácido graso en particular en ocho especies de microalgas estudiadas. En la mayoría de las especies de microalgas el 20:6n3 disminuye conforme la intensidad luminosa, lo cual fue constatado por Harrison *et al.* (1990) para *Chaetoceros calcitrans*.

Además, Zhu *et al.* (1997), mencionan que *Isochrysis* spp. que son microalgas marinas que principalmente habitan en la zonas tropicales y soportan temperaturas relativamente altas, reportan cantidades elevadas de PUFA's n-3, principalmente el DHA, el cual se acumula en las membranas celulares del sistema nervioso y el sistema visual, así como en los tejidos reproductivos (Dratz y Deese, 1986). Sin embargo, para *N. incerta* el 20:6n3 que no se evaluó en los tratamientos, existe la posibilidad de que este ácido se haya perdido por oxidación durante el almacenamiento de las muestras (2 meses a -20 °C). Se menciona que los ácidos grasos entre mas poliinsaturado son más susceptible al proceso de oxidación y otra posible razón podría ser una extracción incompleta (Cordero-Esquivel *et al.*, 1993).

Las proporciones de cada ácido graso pueden cambiar por la alteración de las condiciones de cultivo; pero estos cambios dependen de la especie (Thompson *et al.*, 1992a, 1992b). La proporción de ácidos grasos en microalgas cambia principalmente por limitación de nutrimentos o cambios en la temperatura (Fábregas *et al.*, 1985; James *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1992a, 1992b; Correa-Reyes *et al.*, 2001) y también por la variación de la irradiancia (Fork *et al.*, 1979; Thompson *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993; Chrismadha y Borowitzka, 1994).

VI. 3. 3. Clorofila *a*

El contenido total de clorofila *a*, tuvo una relación inversa con la menor irradiancia, $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con la mayor temperatura, 25 °C y con el mayor concentración de nutrientes, medio "2f". Además, se observó una correlación entre el contenido total de clorofila *a* y la densidad celular final. Esta tendencia se ha visto en otros estudios con microalgas en donde integran la respuesta de la irradiancia y la temperatura (Tilzer, 1987; Kowalewska y Szymczak, 2001). Chaneva *et al.*, (2007), evaluaron la irradiancia y la temperatura en la producción de pigmentos en los cultivos de *Arthrocnemum africanus*, donde observaron que el contenido de clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas aumenta en los tratamientos con menores irradiancias $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y mayores temperatura 30 y 40 °C, ya que en los tratamientos con mayor irradiancia $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, existe una destrucción parcial de los pigmentos fotosintéticos. Critchley (1988), Tang y Vincent (1999) y López-Muñoz *et al.* (1992) en *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricoratum*, *Tetraselmis suecica* y

Dunaliella tertiolecta, encontraron una respuesta similar, en donde en altas irradiancias 300 y 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperaturas de 20 a 25 °C existe una reducción de contenido pigmentario (clorofila *a* y *c*) y destrucción de pigmentos fotosintéticos. Robards y Zohary (1987), hicieron un experimento con cianobacterias donde consideraron que la temperatura es un factor independiente de las reacciones biofísicas y un factor dependiente de las reacciones bioquímicas. Existen algunos estudios ultraestructurales de la fotoadaptación en microalgas, en estos trabajos se concluye que existe una serie de mecanismos adaptativos, tales como la organización de los tilacoides, la conservación del número de PSUs y alteraciones en el tamaño de la antena del PSII (Lichtlé, 1979; Rhiel *et al.*, 1985; Lewitus *et al.*, 1991).

El contenido de clorofila *a* de *N. incerta* varió respecto al tiempo de cultivo. Para el cuarto día, el contenido de clorofila *a* aumentó en los cultivos mantenidos a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y decreció en los cultivos mantenidos a 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La relación entre el contenido de clorofila *a* y la concentración de nutrientes fue inversa. Cultivos con medio “2f”, produjeron mayor concentración de clorofila *a*. Esta respuesta, se debe a que en los tratamientos con medio “f”, la tasa de crecimiento fue mayor, por lo que el consumo de nutrientes por célula fue mayor. Turpin (1991) y Geider *et al.* (1993), mencionan que el nitrógeno, es un elemento formador de clorofilas y de las proteínas asociadas, además que la disponibilidad influye en la concentración de los pigmentos celulares.

Después del día 7 de cultivo de *N. incerta*, el contenido de clorofila *a* disminuyó y las diferencias entre tratamientos fueron causadas por efecto de la irradiancia. La tendencia a disminuir el contenido de clorofila *a* para *N. incerta*, estuvo relacionada directamente con el tiempo de cultivo y con la tasa de crecimiento.

La relación inversa entre el contenido de clorofila *a* y la irradiancia puede deberse a una disminución en el número y/o el tamaño de las unidades cosechadoras de luz como respuesta de la microalga a un exceso de energía lumínica. La reducción del contenido de pigmentos celulares se considera un proceso de autorregulación o protección del aparato fotosintético, para alcanzar un balance entre la ganancia y demanda de energía necesaria para el mantenimiento y funcionamiento de la microalga. Estos aspectos han sido también

observados en otras especies de fitoplancton (Jeffrey, 1974; Chan, 1978; Claustre y Gostan, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992).

En los estudios de Boussiba y Richmond (1980), Yamanaka y Glazer (1980) y Stevens *et al.* (1981), se observó que el agotamiento de nutrientes provoca un descenso en el contenido pigmentario y en la eficiencia fotosintética, estos resultados concuerdan con lo encontrado en este trabajo para *N. incerta*, donde los tratamientos con rápido agotamiento de nutrientes, el contenido de clorofila *a* y la eficiencia fotosintética son los menores al resto de los tratamientos.

VI. 4. Nutrientes

Se ha estudiado el efecto del tipo y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo y distintos aportes químicos de nitrógeno y fósforo para el crecimiento de las microalgas (Fábregas *et al.*, 1987; Herrero *et al.*, 1991; Perera-Carbonell, 1994; López-Ruiz *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 1996). Otros autores han investigado la respuesta en la composición bioquímica de cultivos de microalgas mantenidos con distintos tipos de medios de cultivo (Wikfors, 1986; Brown, 1991; Herrero *et al.*, 1991; López-Elías y Voltolina, 1993, Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Uriarte *et al.*, 2006) y el efecto de la cantidad de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia en el crecimiento y composición bioquímica principalmente para *Isochrysis galbana* (Flynn *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1997).

Eppley (1972), Goldman y Carpenter (1974) mencionan que es difícil distinguir los efectos de la temperatura, la irradiancia y los nutrientes sobre la composición bioquímica de microalgas. Rhee y Gothman (1981) estudiaron en *Scenedesmus* sp. la interacción entre la temperatura y los nutrientes, donde encontraron que aunque se tenga limitación de nutrientes, el factor irradiancia es la variable que controla el crecimiento. Se evaluó una tendencia similar en el experimento de Redalje y Laws (1983) con *Thalassiosira allni*, y se encontró que la irradiancia fue el factor que influyó en los cambios bioquímicos y en el crecimiento. Sin embargo, Laws y Wong (1978), encontraron que la relación de N/C fue mayor a ≤ 25 °C respecto a los ≥ 20 °C, concluyendo que el factor temperatura era el responsable del cambio en la relación N/C y no los nutrientes. Lafarga de la Cruz (2000), encuentra una relación directa en la concentración residual de los nutrientes y el aumento

en la densidad celular de cultivos de *Rhodomonas* sp. Una tendencia similar se encontró para *N. incerta*, debido a que la población creció exponencialmente durante los primeros días de cultivo por lo que el requerimiento de nutrientes fue mayor para cubrir las demandas fisiológicas. En este estudio, el agotamiento del nitrógeno fue paralelo a la del fósforo. También se observó que para la fase final exponencial del crecimiento coincidió con el inicio del agotamiento de nutrientes en los tratamientos con mayor irradiancia ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

En este estudio se encontró una relación directa entre las condiciones de irradiancia, la temperatura, y el consumo de nutrientes durante toda la fase experimental. Cloren, (1977), dice que el consumo de nitratos y ortofosfatos durante la fase exponencial se encuentran correlacionados con la irradiancia y la temperatura, ya que estos dos factores se encuentran involucrados en diversos procesos fisiológicos (Renaud *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1992a, 1992b; Oliveira *et al.*, 1999).

El consumo de nitratos esta regulado principalmente con los requerimientos celulares, determinadas a su vez por el estado fisiológico de la célula microalgal. Mientras que las diferencias del consumo de ortofosfatos corresponden directamente a la concentración del medio. Se ha documentado, que cuando existen altas concentraciones de ortofosfatos en el medio, las células consumen en exceso este nutriente, ya que las células tienen la capacidad de almacenarlo en forma de polifosfatos dentro de gránulos citoplasmáticos (Fogg y Thake, 1987; Darley, 1987).

Capítulo VII

Conclusiones

- La tasa de crecimiento de *N. incerta* no fue modificada por efecto de la temperatura (20 y 25 °C), la irradiancia (100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo (medio “F” y “2F”). Sin embargo, se evaluó una mayor densidad celular final en los cultivos mantenidos a 25 °C, 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y medio “2F”.
- La mayor producción de biomasa celular de *N. incerta*, evaluada como peso seco, fue obtenida a 25 °C, 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y medio de cultivo “2F”. Durante el cuarto día de cultivo se alcanzó la mayor producción de biomasa de *N. incerta* en las distintas condiciones experimentales.
- La respuesta fotosintética de *N. incerta* fue modificada por la irradiancia utilizada pero no por la temperatura (20 y 25 °C) ni la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo (medio “F” y “2F”). La fotosíntesis máxima fue mayor en los cultivos mantenidos con la menor irradiancia (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a la mayor temperatura (25 °C) y la mayor cantidad de nutrientes en el medio de cultivo (“2F”).
- No se modificó la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *N. incerta* por efecto de la irradiancia, la temperatura y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo.
- La composición de ácidos grasos de *N. incerta* no fue modificada por efecto de la interacción de la irradiancia, la temperatura y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo.
- En todas los tratamientos de los cultivos de *N. incerta* se registró la presencia de los ácidos grasos 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4n-6 y 20:5n-3, que son considerados esenciales para funciones metabólicas de la membrana celular, para la maduración

gonadal de la regulación osmótica y como precursor de hormonas. Estas funciones se encuentran relacionadas con el mejoramiento de las tasas de crecimiento y la supervivencia de moluscos, bivalvos y peces marinos.

- En los cultivos de *N. incerta* el consumo de nitratos y fosfatos no fue modificado por la irradiancia, la temperatura y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo. El consumo de fosfatos fue total en todos los tratamientos experimentales. La producción de nitritos fue en respuesta a la interacción de la irradiancia, la temperatura y la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo. El mayor consumo de nutrientes ocurrió durante los primeros cuatro días de cultivo en los distintos tratamientos experimentales.
- Las distintas condiciones de cultivo utilizadas en este estudio produjeron células de *N. incerta* con una composición bioquímica adecuada para cubrir los requerimientos nutricionales de organismos bentónicos marinos en cultivo, en sus primeros estadios de desarrollo.

Capítulo VIII

Recomendaciones

1. Se recomienda para futuros experimentos con diatomeas bentónicas nuevos estudios comparativos bajo condiciones estables en el laboratorio, para tener más elementos que permitan distinguir las diferencias debidas a determinadas condiciones de irradiancia, temperatura y nutrientes. Además, es necesario realizar bioensayos diseñados en laboratorios comerciales, para obtener información sobre el rendimiento de los cultivos.
2. Se recomienda evaluar los perfiles de aminoácidos de *N. incerta* al cultivarse en distintas temperaturas, irradiancias y disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.
3. Se recomienda el uso de diversos recipientes de cultivo para diatomeas bentónicas para optimizar la producción y evaluar la composición proximal de las células.
4. Se recomienda la sustitución de micronutrientes en los medios de cultivo alternos con base a fertilizantes agrícolas o vitaminas de uso veterinario.
5. Se recomienda evaluar el valor nutrimental de otras especies de diatomeas bentónicas con las condiciones experimentales usadas en este trabajo y comparar con los resultados obtenidos en granjas comerciales en el sistema tradicional de cultivo.

Capítulo IX

Literatura citada

- Admiral, W. 1977. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Marine Biology*. 39:1-9.
- Álvarez-Cobelas, M. y J. Zarco-Lechado. 1989. Lipids in microalgae. A review of Biochemistry. *Grasas y Aceites*. 40:118-145.
- Bartual, A., L.M. Lúbian, J.A. Gálvez y F.X. Niell. 2002. Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae). *Ciencias Marinas* 28:381-329.
- Bhosle, N.B., L.V. Evans y R.G. J. Edyvean. 1993. Carbohydrate production by *Amphora coffeaeformis* a marine fouling diatom. *Biofouling*. 7:81-91.
- Björn, O.L., Cunningham, A., Dubinsky, Z., Estrada, M., Figueroa, F., García-Pichel, F., Häder, D., Hanelt, D., Levavasseur, G. y K. Lüning. 1996. Discussion I: underwater light measurements and light absorption by algae. *Scientia Marina*. 60: 293-297.
- Blanchard, G.F., J.M. Guarini P. Richard, P. Gros y F. Mornet. 1996. Quantifying the short-term temperature effect on light-sutured photosynthesis or intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series*. 134:309-313.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal Biochemistry Physiology*. 37: 911-917.
- Boussiba, S. y A.E. Richmond. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue green alga *Spirulina platensis*. *Microbiology*. 125:143-147.
- Brown, M.R. 1991. The aminoacid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 145:79-99.

- Brown, M.R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO). Marine Laboratories Report 205. Australia. 44 pp.
- Brown, M.R., G.D. Dustan, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, S.M. Barrett y J.M. LeRoi. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of Prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (Clone T. ISO). *Journal Phycology*. 29:601-612.
- Brown, M.R., G.D. Dustan, S.J. Nordwood y K.A. Millar. 1996. Effects of harvest stage on life on the biochemical composition of the diatom *T. pseudonana*. *Journal Phycology*. 32:64-73.
- Campa-Ávila, M.A. 2002. Evaluación del valor nutricional en dos especies de microalgas al ser suministradas como alimento al rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 97 pp.
- Carbajal-Miranda, M.J., Sánchez-Saavedra, M.P. y J.A. Simental-Trinidad. 2005. Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone postlarvae *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal Shellfish Research*. 24(2): 401-405.
- Carvalho, A.P. y Malcata F.X. 2003. Kinetic modeling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: study of the combined influence of light and temperature. *Biotechnology Progress*. 19:118-135.
- Chan, A.T. 1978. Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size I. Growth under continuous light. *Journal Phycology*. 14:619-632.
- Chaneva, G., Sevdalina, F., Kaledona, M.Y. y L. Jaromir. 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthonema africanus* a progressive phycobiliprotein producing strain. *Journal Applied Phycology*. 19:537-544.
- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Ville France sur mer. Notes de Travail 12. 12 pp.

- Claustre, H. y J. Gostan. 1987. Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: possible ecological implications. *Marine Ecology Progress Series*. 40:167-174.
- Cloren, J.E. 1977. Effects of light intensity and temperature on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyceae) growth and nutrient uptake rates. *Journal Phycology*. 13:389-395.
- Coles, J.F. y R.C. Jones. 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *Journal Phycology*. 36:7-16.
- Coljin, F. y G. Van Buurt. 1975. Influence on light and temperature on the photosynthetic rate of marine benthic diatoms. *Marine Biology*. 31:209-214.
- Cordero-Esquivel, B., D. Voltolina L. y F. Correa-Sandoval. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Physiology*. 105:369-323.
- Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo del abulón. Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California México. 135 pp.
- Correa-Reyes, J.G., M.P. Sánchez-Saavedra, D.A. Siqueiros-Beltrones y N. Flores-Acevedo. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *Journal Shellfish Research Special Issue in Abalone* 20(2):603-610.
- Correa-Reyes, J.G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M.T., Flores-Acevedo, N. y C. Vásquez-Peláez. 2008. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone postlarvae (*Haliotis rufescens*). *Journal of Applied Phycology*. En prensa.
- Cota-Sánchez, G. 1988. Cultivo mono y pluriespecífico de tres diatomeas bentónicas en condiciones de luz y temperatura constantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Facultad de Ciencias del Mar. Mazatlán, Sinaloa. 141 pp.

- Critchley, C. 1988. The molecular mechanism of photoinhibition facts and fiction. *Australian Journal Plants Physiology*. 15:235-717.
- Cuevas-Rocha, F. 1988. Competición e inhibición del crecimiento de tres diatomeas bentónicas de la laguna de Venecia. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Facultad de Ciencias del Mar. Mazatlán, Sinaloa. 148 pp.
- Cox, E.J., D.T. Rose y J.M. Lewis. 1977. Using laboratory culture experiments to explore the ecological tolerances of benthic diatoms. *Phycological Supplement* 36:4-22.
- Chismadha, T. y M.A. Borowitzka. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentanoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in a tubular photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. 6:67-74.
- Daume, S., Long, B.M. y P.Crouch. 2003. Changes in amino acid content of an algal feed species (*Navicula* sp.) and their effect on growth and survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). *Journal of Applied Phycology*. 15: 201-207.
- Darley, W.M. 1987. *Biología de las Algas Enfoque Fisiológico*. Ed. Limusa. México, D. F. 236 pp.
- de la Noüe, J., G. Laliberté y D. Proulx. 1992. Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology*. 4:427-452.
- de la Peña M.R. 2007. Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *Journal of Applied Phycology*. 7:91-99.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Microa-Algae for Aquaculture. En: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (eds.). *Micro-Algae Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. 197-221 pp.
- Dratz, E.A. y A.J. Deese. 1986. The role of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in biological membranes: examples from photoreceptors and model membrane bilayers. Academic Press, Orlando. 145 pp.

- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry*. 28: 350-356.
- Durazo-Beltrán, E. 2003. Efecto de los ácidos grasos de cadena larga en el crecimiento y metabolismo del abulón azul (*Haliotis fulgens*). Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México. 34 pp.
- Dunstan, G.A., J.K. Volkman, S.M. Barret, J.M. Leroi y S.W. Jeffrey. 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatoms (Bacillariophyceae). *Phychochemistry*. 35:155-161.
- Eppley R.W. 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fisheries*. NOAA. 70:1063-1085.
- Erisken, N.T. y L.J.J. Iversen. 1995. Photosynthetic pigments as nitrogen stores in the cryptophyte alga *Rhodomonas* sp. *Journal Marine Biotechnology*. 3:193-195.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas B. y J. Abalde. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. *Aquaculture*. 49:231-244.
- Fábregas, J., Toribio, L., Abalde, L., Cabezas B. y C. Herrero. 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. *Aquaculture Engineering* 49:231-244.
- Figuroa, L.F., J. Mercado, C. Jiménez, S. Salles, J. Aguilera, M.P. Sánchez-Saavedra, Lebert M., Häder D.P., Montero O. y L. Lubián. 1997. Relationship between bio-optical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquatic Botany*. 59(3):237-251.
- Flores-Vergara, C. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivadas bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 132 pp.

- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Öpic, H. y C.R. Hipkin. 1992. Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen during nitrogen starvation of ammonium and nitrate grown *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*. 4:95-104.
- Fogg, G.E. y B.J. Thake. 1987. *Algal Culture and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 266 pp.
- Fork, C.D., Murata, N. y N. Sato. 1979. Effect of growth temperature on the lipid and fatty acid composition and the dependence on temperature of light-induced redox reactions of cytochrome *f* and of light energy redistribution in the thermophilic blue alga *Synechococcus lividus*. *Plant Physiology*. 63:524-530.
- Freas, W., y S. Grollman. 1980. Ionic and osmotic influence on prostaglandin release from the gill tissue of marine bivalve, *Modiolus demissus*. *Journal Experimental Biology*. 84:169-185.
- Geider, R. J., LaRoche, J., Greene, R.M. y M. Olaizola. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal Phycology*. 29:755-66.
- Goldman, J.C. y E.J. Carpenter. 1974. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnology Oceanography*. 19: 756-766.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Journal Microbiology*. 8:229-239.
- Hach, 1997. DR:2010 Spectrophotometer Procedures Manual. Hach Company, Loveland, CO. 199 pp.
- Hahn, K.O. 1989. *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC. Press. Boca Raton., Florida. 348 pp.
- Harris, G.P. 1980. The measurement of photosynthesis in natural populations of phytoplankton. *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. University of California Press. 129 pp.

- Harrison, P.J., Thompson, P.A. y G.S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*. 2:45-46.
- Herrero, C., A. Cid, J. Fábregas y J. Abalde. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquaculture Engineering* 10:99-110.
- Hoff, F.H. y T.W. Snell. 1999. *Plankton Culture Manual*. 5th ed. Florida Aqua Farms, Dade City, Florida, USA. 160 pp.
- Hudon, C. y E. Bourget. 1983. The effect of light on the vertical structure of epibenthic diatom communities. *Botánica Marina* 26:317-330.
- James, C.M., S. Al-Hinty y A.E. Salman. 1989. Growth and omega fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*. 77: 337-351.
- Jeffrey, S.W. 1974. Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography. *Journal Marine Biology*. 26:101-110.
- Joseph, J.D. 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates, Part II, Mollusca. *Progress. Lipid Research*. 21:109-153.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami, H., y Y. Yamashita. 1995. Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 194 (2):189-199.
- Kennett, D.M. y P.E. Hargraves. 1985. Benthic diatoms and sulfide fluctuations: upper basin on Pettaquamscutt river, Rhode Island. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 21: 577-586.
- Kowalewska, G. y M. Szymczak. 2001. Influence of selected abiotic factors on the decomposition of chlorophylls. *Oceanologia*. 43:315-328.

- Kromkamp, J., C. Barranguet y J. Peene. 1998. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series*. 162:45-55.
- Lafarga de la Cruz, E. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México. 22 pp.
- Laing I. y P.F. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve mollusk using diets of dried algal. *Aquaculture*. 102: 231-234.
- Laws, E.A. y D.C.L. Wong. 1978. Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate-limited continuous culture. *Journal Phycology*. 14:406-416.
- Lembi C.A. y J.R. Waaland. 1988. *Algae and Human Affaire*. Cambridge University Press, New York, 590 pp.
- Lehninger, A.L. 1995. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega, Barcelona. 1013 pp.
- Lewitus, A.J., Caron, D.A. y K.R. Miller. 1991. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Crytophyceae). *Journal Phycology*. 27:578-587.
- Lichtlé, C. 1979. Effects on nitrogen deficiency and light of high intensity on *Cryptomonas refescens* (Crytophyceae). I. Cell and photosynthetic apparatus transformations and encystment. *Protoplasma*. 101:283-293.
- López-Elías, J.A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 163 pp.
- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio de cultivo no convencional. *Ciencias Marinas*. 19:169-180.

- López-Muñoz, I., Abalde, J. 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*. 3:59-65.
- López-Ruiz, J.L., García-García, R. y M.S. Ferreiro-Almeda. 1995. Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product zeotec-56 and commercial fertilizer as a nutrient *Aquaculture Engineering*. 14:367-372.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193: 265-275.
- Maddux, W.S. y R.F. Jones. 1964. Some interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration during the continuous culture of *Nitzschia closterium* and *Tetraselmis* sp. *Limnology and Oceanography*. 9:79-86.
- Malara, G. y R. Charra. 1972a. Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Sation Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:11 pp.
- Malara, G. y R. Charra. 1972b. Dosages des glucides particulaires de phytoplankton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:12 pp.
- Mckee, T. M. y R. Mckee. 2003. Bioquímica. La base molecular de la vida. Ediciones McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España. 332-416 pp.
- Mercado, J.M., Sánchez-Saavedra, M.P., Correa-Reyes, G., Lubián L., Montero O., y F. L. Figueroa. 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*. 78(3) 265-277.
- Metcalf, L.D., A.A. y J.R. Schmitz. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytic Chemistry*. 38: 514-515.
- Mills, D.K. y M. Wilkinson. 1986. Photosynthesis and light in estuarine benthic microalgae. *Botánica Marina*. 29:125-129.

- Morse, D.E., Duncan, H., Hooker, N. y A. Morse. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*. 96: 298-300.
- Mortensen, S.H., Borsheim, K.Y., y G. Knutsen. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 122:173-185.
- Myklestead, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms I. Comparison of nine different species in culture. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 15:261-274.
- Myklestead, S y A. Haug. 1972. Production of carbohydrates by marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 9:125-136.
- Napolitano, G.E., R.G. Ackman y W.M.N. Ratnayake. 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *Journal of World Aquaculture Society*. 21: 122-130.
- Nieves, M., Voltolina, D., Sapien, M.T., Gerhardus, H., Robles, A.L. y M. Villa. 1996. Coltivazione di microalghe con fertilizzanti agricoli. *Rivista Italiana di Acquacoltura*. 31:81-84.
- Nieves, M., Voltolina, D., y A. Barrera. 1998. A new parameter for comparison of microalgae growth. *Rivista Italiana di Acquacoltura*. 33:177-184.
- Oliveira M.A., C.L. Monteiro, M.P.C., Robbs y S.G.F. Leite. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*. 7:261-275.
- Ono, K., Osada, M., Matsutani, T., Mori, K. y T. Nomura. 1982. Gonadal prostaglandin F2a profile during sexual maturation in the oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biology*. 3: 223-230.

- Pande, S.V., R.K. Parvin y T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry* 6:415-423.
- Parsons, T.R., Y. Maita, y C.M. Lalli. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Perry, M.J., Talbot, M.C. y S. Alberte. 1981. Photoadaptation in marine phytoplankton: Response of the photosynthetic unit. *Marine Biology*. 62:91-101.
- Perera-Carbonell, C. 1994. Uso de fertilizantes para cultivos hidropónicos como medio de crecimiento de dos especies de microalgas marinas. *Revista de Investigación Marina*. 15(2):135-137.
- Platt, T. 1981. Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Department of Fisheries Oceanology Bulletin of Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 210. 145 pp.
- Radway, J.C, E.W. Wilde, M.J. Whitaker y J.C. Weissman. 2001. Screening of algal strains for metal removal capabilities. *Journal of Applied Phycology*. 13: 451- 455.
- Redalje, D.G. y E.A. Laws. 1983. The effects of environmental factor son growth and the chemical and biochemical composition of marine diatoms I. Lights and temperature effects. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 68:59-79.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R.y Y. Olsen.1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Aquaculture*. 155:1-4.
- Renaud S. M., Parry D.L., Luang-Van T., Padovan A., y N. Sammy. 1991. Effect of light intensity in 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.
- Renaud S.M., Parry, D.L. y L. Thinh.1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*. 6(3): 337-345.

- Renaud, S.M., H.C. Zhou, D.L. Parry, L.V. Thinh, y K.C. Woo. 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea* and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology*. 7: 595–602.
- Renaud, S.M., Loung-Van, T. y D.L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 170:147-159.
- Reynolds, C.S. 1984. *The Ecology of Freshwaters Phytoplankton*. Cambridge University Press, London. 12 pp.
- Richmond A. 1986a. Microalgae of economic potential. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc., Boca Raton. 192-244 pp.
- Richmond A. 1986b. Cell response to environmental factors. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Florida. 69-99 pp.
- Richmond A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. En: Chapman, R. (eds.) *Progress in Phycology Research*. Biopress Ltd. 166 pp.
- 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*. 55:2 91-304.
- Rhee, G.Y. y I.J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Light and the interactions of light with nitrate limitation. *Limnology Oceanography*. 26:649-659.
- Rhiel, E., Morschel E. y W. Wehrmeyer. 1985. Correlation of pigment deprivation and ultrastructural organization of thylakoid membranes in *Cryptomonas maculate* following nutrient deficiency. *Protoplasma*. 129:62-73.
- Robards, R. y T. Zohary. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *Journal Marine Freshwaters Researches*. 21:391-399.

- Rodríguez, M.A., C. Pereira, Y. Yoneshigue, D. Strbac y D.O. Hall. 2000. Photosynthetic light-response curves and photoinhibition of the deep water *Laminaria abyssalis* and the intertidal *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*. 36:97-106.
- Sáenz-Gaxiola L.M. 2002. Efecto de la temperatura e intensidad de luz sobre la composición de ácidos grasos de tres microalgas marinas utilizadas comúnmente para la alimentación de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California México. 54 pp.
- Sakshaug, E. 1977. Limiting nutrients and maximum growth rates for diatoms in Narragansett Bay. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 28:109-123.
- Sakshaug, E. y S. Myklestad. 1973. Studies on the phytoplankton ecology of the Tronheimsfjord III. Dynamics of Phytoplankton blooms in relations to environmental factors. Bioassays experiments and parameters for the physiological state of the populations. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 11:157-188.
- Sánchez-Saavedra, M.P. 2006. The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* .34:131-136.
- Satu N., y N. Murata. 1980. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. The central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo adaption. *Biochemistry Biophys Acta*. 619:353-365.
- Sciandra, A., Lazzara L., Claustre, H. y M. Babin. 2000. Response of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stress. *Marine Ecology Progress Series*. 201:107-120.
- Searcy-Bernal, R. y C. Anguiano-Beltrán. 1998. Optimizing the concentration of gamma-aminobutyric acid (GABA) for inducing larval metamorphosis in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of the World Aquaculture Society*. 29(4): 463-470.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P., y J.G. Correa-Reyes. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *Journal Shellfish Research*. 20(2): 611-617.

- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. y Carbajal-Miranda, M. 2004. Growth and survival of juvenile of red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with macroalgae enriched with a benthic diatom biofilm. *Journal Shellfish Research*. 23 (4): 995-999.
- Siqueiros-Beltrones, D.A., S.E. Ibarra-Obando, y M. Poumian-Tapia. 1991. Composición y estructura de las asociaciones de diatomeas bentónicas en el Estero de Punta Banda; análisis del periodo otoñal. *Ciencias Marinas*. 17(1): 119-138.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación*. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: Stein, J. (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, London. 448 pp.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, 448 pp.
- Stevens, S.E.Jr., Balkill, D.L. y D.A.M. Paoane. 1981. The effects of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Microbiology*. 130:204-212.
- StatSoft, Inc, 2002. *Statistica for Windows. Computer Program Manual*. StatSoft, Inc. 2300 East 14 th Street, Tulsa. Email:info@statsoft.com.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. y T. Berner 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*. 25:61-72.
- Suzuki, H. y M. Takahashi. 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *Journal Phycology*. 31:880-888.
- Tacon, A. 1990. *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*. Argent Laboratories Press, Redmont, Washington. 208 pp.

- Tang, E. y W. Vincent 1999. Strategies of thermal adaptation by high-latitude cyanobacteria. *Phycology*. 142:315-323.
- Thin, L.V. 1983. Effect of irradiance on the physiology and ultrastructure of the marine cryptomonad, *Cryptomonas* strain Lis. *Phycologia*. 22:7-11.
- Thompson, P.A., P.J. Harrison y J.N.C. Whyte. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *Journal of Phycology*. 26:278-288.
- Thompson, P.A. y M. Guo. 1992a. Effects of variation in temperature I. on the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*. 28:481-488.
- Thompson, P. A. y Guo, M. 1992b. Effects of variation in temperature II. on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal Phycology*. 28:488-492.
- Tilzer, M. 1987. Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. *Journal Marine Freshwater Research*. 21:401-412.
- Tomaselli, L., Giovannetti, L., Sacchi, A., y F. Bocci. 1988. Effects of temperature on growth and biochemical composition in *Spirulina platensis* strain M2. En: *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J. Mellion, M.C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan, D. Christiaen (eds.). Elsevier Applied Science, London. 303-314.
- Turpin, D.H. 1991. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH, exemplified with a pH drift experiment. *Sciences Marines*. 60:129-134.
- Uriarte, I., R., Roberts y A. Farías. 2006. The effect of nitrate supplementation on the biochemical composition of benthic diatoms and growth and survival of post-larval abalone. *Aquaculture* 261: 423-429.
- Valenzuela-Espinoza, E. Millan-Núñez, R. y F. Núñez-Cabrero. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture Engineering*. 20(3):135-147.

- Viso, A.C. y J.C. Marty. 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*. 34:1521-1533.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, R.D. y C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of ten species of microalgae used in mariculture. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 128:219-240.
- Yamanaka, G. y A.N. Glazer. 1980. Dynamic aspects of phycobilisome structure. phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp. *Microbiology*. 124:39-47.
- Wikfors, G. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*. 59:1-14.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- Webb, K.L. y Chu, F.E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Pruder, G.D., Langdon, C., Conklin, D. (eds.). *Aquaculture Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge. 272- 291 pp.
- Zhang Z., Zmora O., Koper R. y A. Richmond. 2001. An industrial-size flan plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture*. 195: 35-44.
- Zhu, C.J., Lee, Y.K. y C.T. Chao, 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*. 9:451-457.
- Zhukova, N.V. y N.A. Aizdaicher. 2000. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*. 2:351-356.

Capítulo X

Anexos

Anexo 1. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de densidad celular inicial (DI), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.38	0.676
$^{\circ}\text{C}$	0.55	0.730
M	3.78	0.607
I/$^{\circ}\text{C}$	0.18	0.891
I/M	2.21	0.276
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.09	0.587
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.98	0.522

Anexo 2. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de densidad celular final (DF), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	9.97	0.015*
$^{\circ}\text{C}$	18.93	0.000*
M	3.94	0.001*
I/$^{\circ}\text{C}$	0.13	0.781
I/M	1.23	0.356
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.19	0.847
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	2.96	0.232

* Diferencia significativa.

Anexo 2.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de densidad celular final (DF), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.040*
300	0.040*	

* Diferencia significativa.

Anexo 2.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de densidad celular final (DF), en donde el factor Temperatura (T) corresponde a los intervalos de 20 y 25 °C.

°C	20	25
20		0.031*
25	0.031*	

* Diferencia significativa.

Anexo 2.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de densidad celular final (DF), en donde el Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.046*
“2f”	0.046*	

* Diferencia significativa.

Anexo 3. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de la tasa de crecimiento (μ), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	3.82	0.309
°C	1.93	0.357
M	2.13	0.437
I/°C	11.18	0.671
I/M	0.21	0.265
°C/M	1.49	0.457
I/°C/M	0.89	0.633

Anexo 4. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.51	0.249
$^{\circ}\text{C}$	3.54	0.371
M	7.37	0.807
I/$^{\circ}\text{C}$	0.17	0.742
I/M	2.29	0.212
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	10.34	0.152
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	1.94	0.237

Anexo 5. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del peso seco total, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.37	0.248
$^{\circ}\text{C}$	0.81	0.373
M	0.27	0.600
T	0.63	0.430
I/$^{\circ}\text{C}$	0.67	0.416
I/M	2.53	0.121
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.51	0.479
I/T	0.02	0.870
$^{\circ}\text{C}/\text{T}$	0.01	0.932
M/T	0.31	0.577
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.01	0.956
I/$^{\circ}\text{C}/\text{T}$	1.87	0.180
I/M/T	0.16	0.686
$^{\circ}\text{C}/\text{M}/\text{T}$	1.01	0.324
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}/\text{T}$	0.57	0.452

Anexo 6. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del peso seco orgánico, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	0.04	0.826
$^{\circ}\text{C}$	0.67	0.416
M	0.37	0.543
T	56.62	0.000 *
I / $^{\circ}\text{C}$	1.23	0.274
I / M	0.00	0.987
$^{\circ}\text{C}$ / M	0.11	0.740
I / T	2.47	0.125
$^{\circ}\text{C}$ / T	1.85	0.182
M / T	1.43	0.240
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	0.01	0.905
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	0.61	0.440
I / M / T	1.58	0.216
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.56	0.457
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.12	0.727

* Diferencia significativa.

Anexo 6.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) del peso seco orgánico, en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 7. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	17.24	0.048*
$^{\circ}\text{C}$	9.24	0.000*
M	0.27	0.667
I/$^{\circ}\text{C}$	0.11	0.245
I/M	7.92	0.765
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.39	0.408
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	1.13	0.223

* Diferencia significativa.

Anexo 7.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.020*
300	0.020*	

* Diferencia significativa.

Anexo 7.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de la tasa máxima fotosintética ($P_{\text{máx}}$), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$.

$^{\circ}\text{C}$	20	25
20		0.001*
25	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 8. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de la eficiencia fotosintética (α), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	25.57	0.031*
$^{\circ}\text{C}$	10.80	0.001*
M	0.10	0.781
I/$^{\circ}\text{C}$	4.27	0.743
I/M	7.32	0.003*
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	11.45	0.243
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.18	0.178

* Diferencia significativa.

Anexo 8.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de la eficiencia fotosintética (α), en donde Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.018*
300	0.018*	

* Diferencia significativa.

Anexo 8.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de la eficiencia fotosintética (α), en donde el factor Temperatura (T) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$.

$^{\circ}\text{C}$	20	25
20		0.001*
25	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 8.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de la eficiencia fotosintética (α) en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	“f”		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	“2f”	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	300	“f”	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	“2f”	0.000*	1.000	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 9. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del índice de saturación lumínica (I_k), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	3.15	0.141*
$^{\circ}\text{C}$	0.67	0.960
M	0.79	0.875
I / $^{\circ}\text{C}$	0.17	0.742
I / M	7.32	0.003*
$^{\circ}\text{C} / \text{M}$	13.33	0.152
I / $^{\circ}\text{C} / \text{M}$	1.45	0.237

* Diferencia significativa.

Anexo 9.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) del índice de saturación lumínica (I_k), en donde el factor Irradiancia (I), corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.001*
300	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 10. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de los porcentajes de proteínas, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M) y Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.82	0.186
$^{\circ}\text{C}$	0.99	0.326
M	5.12	0.030*
T	10.80	0.003*
I / $^{\circ}\text{C}$	0.01	0.890
I / M	1.21	0.278
$^{\circ}\text{C}$ / M	0.06	0.794
I / T	0.04	0.829
$^{\circ}\text{C}$ / T	1.27	0.266
M / T	1.02	0.319
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	0.58	0.449
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	0.00	0.927
I / M / T	0.35	0.554
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.17	0.674
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.04	0.828

* Diferencia significativa.

Anexo 10.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de proteínas, en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.030*
“2f”	0.030*	

* Diferencia significativa.

Anexo 10.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de proteínas, en donde el factor Tiempo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7	4	7
4		0.327	0.078	0.866
7	0.327		0.000*	0.781
4	0.078	0.000*		0.011*
7	0.866	0.781	0.011*	

* Diferencia significativa.

Anexo 11. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de los porcentajes de carbohidratos, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M) y Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	0.99	0.329
$^{\circ}\text{C}$	0.10	0.754
M	0.71	0.408
T	31.58	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	1.86	0.181
I / M	0.35	0.556
$^{\circ}\text{C} / \text{M}$	2.39	0.131
I / T	0.00	0.997
$^{\circ}\text{C} / \text{T}$	1.28	0.264
M / T	1.36	0.251
I / $^{\circ}\text{C} / \text{M}$	0.00	0.991
I / $^{\circ}\text{C} / \text{T}$	0.67	0.415
I / M / T	0.02	0.867
$^{\circ}\text{C} / \text{M} / \text{T}$	1.05	0.312
I / $^{\circ}\text{C} / \text{M} / \text{T}$	2.02	0.164

* Diferencia significativa.

Anexo 11.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de carbohidratos, en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 12. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de los porcentajes de lípidos, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	6.94	0.013*
$^{\circ}\text{C}$	0.25	0.621
M	3.58	0.068
T	20.39	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	1.41	0.242
I / M	0.30	0.582
$^{\circ}\text{C}$ / M	0.20	0.654
I / T	0.25	0.617
$^{\circ}\text{C}$ / T	0.36	0.551
M / T	0.20	0.653
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	0.00	0.931
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	0.14	0.707
I / M / T	0.00	0.951
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.00	0.993
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.29	0.594

* Diferencia significativa.

Anexo 12.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de lípidos, en donde el factor Irradiancia (I), corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.014*
300	0.014*	

* Diferencia significativa.

Anexo 12.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de lípidos, en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7	4	7
4		0.021*	0.387	0.000*
7	0.021*		0.495	0.781
4	0.387	0.495		0.002*
7	0.000*	0.781	0.002*	

* Diferencia significativa.

Anexo 13. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de los porcentajes de cenizas, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	0.90	0.350
$^{\circ}\text{C}$	0.04	0.838
M	1.78	0.192
T	31.05	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	1.06	0.310
I / M	0.34	0.573
$^{\circ}\text{C}$ / M	4.01	0.053
I / T	0.11	0.739
$^{\circ}\text{C}$ / T	0.25	0.618
M / T	4.70	0.038*
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	6.97	0.013*
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	1.99	0.168
I / M / T	0.52	0.475
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.02	0.888
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	0.08	0.768

* Diferencia significativa.

Anexo 13.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de cenizas, en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa

Anexo 13.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de cenizas, en donde el factor Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	M	T	1	2	3	4
1	“f”	4		0.000*	0.099	0.000*
2	“2f”	7	0.000*		0.031	0.942
3	“f”	4	0.099	0.031*		0.114
4	“2f”	7	0.000*	0.781	0.114	

* Diferencia significativa.

Anexo 13.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de los porcentajes de cenizas, en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “F” y “2F”. Los números en itálicas representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	$^{\circ}\text{C}$	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	100	20	“F”		0.536	0.097	0.999	0.195	0.882	0.583	0.916
<i>2</i>	100	20	“2F”	0.536		0.970	0.685	0.997	0.998	1.000	0.996
<i>3</i>	100	25	“F”	0.097	0.970		0.158	0.999	0.737	0.957	0.681
<i>4</i>	100	25	“2F”	0.999	0.685	0.158		0.295	0.954	0.729	0.972
<i>5</i>	300	20	“F”	0.195	0.997	0.999	0.295		0.903	0.995	0.866
<i>6</i>	300	20	“2F”	0.882	0.998	0.737	0.954	0.903		0.999	1.000
<i>7</i>	300	25	“F”	0.583	1.000	0.957	0.729	0.995	0.999		0.998
<i>8</i>	300	25	“2F”	0.916	0.996	0.681	0.972	0.866	1.000	0.998	

* Diferencia significativa.

Anexo 14. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 15:0, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.47	0.247
$^{\circ}\text{C}$	1.81	0.332
M	0.641	0.312
I/$^{\circ}\text{C}$	0.37	0.356
I/M	0.24	0.395
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.43	0.462
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.08	0.356

Anexo 15. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 16:0, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.12	0.062
$^{\circ}\text{C}$	3.42	0.120
M	0.43	0.079
I/$^{\circ}\text{C}$	0.36	0.551
I/M	0.14	0.707
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.20	0.993
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.00	0.617

Anexo 16. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:0, en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.17	0.249
$^{\circ}\text{C}$	0.91	0.212
M	9.14	0.084
I/$^{\circ}\text{C}$	0.66	0.775
I/M	0.64	0.256
$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.13	0.561
I/$^{\circ}\text{C}/\text{M}$	0.01	0.866

Anexo 17. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 20:0, en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.56	0.221
°C	4.64	0.090
M	3.93	0.071
I/°C	0.87	0.557
I/M	0.45	0.240
°C/M	0.86	0.536
I/°C/M	0.45	0.255

Anexo 18. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 16:1, en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.54	0.121
°C	8.35	0.056
M	9.20	0.099
I/°C	1.23	0.243
I/M	4.54	0.134
°C/M	0.38	0.344
I/°C/M	1.34	0.075

Anexo 19. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:1 n-9 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.24	0.081
°C	2.32	0.053
M	7.25	0.124
I/°C	2.36	0.775
I/M	1.25	0.256
°C/M	0.55	0.061
I/°C/M	0.02	0.866

Anexo 20. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 22:1 n-9 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	9.28	0.325
°C	3.24	0.324
M	3.01	0.245
I/°C	3.24	3.455
I/M	1.35	0.346
°C/M	1.39	4.143
I/°C/M	2.43	0.126

Anexo 21. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:2 n-9 trans en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	6.28	0.349
°C	3.24	0.075
M	19.24	0.185
I/°C	3.23	1.244
L/M	2.45	1.535
°C/M	13.34	0.553
I/°C/M	1.34	0.546

Anexo 22. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:2 n-9 cis en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.24	0.349
°C	6.04	0.075
M	8.24	0.185
I/°C	1.24	0.024
I/M	5.54	0.353
°C/M	1.45	2.434
I/°C/M	0.34	1.346

Anexo 23. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:3 n-3 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	7.24	0.127
°C	8.14	0.671
M	1.12	0.097
I/°C	2.23	0.346
I/M	4.43	16.656
°C/M	1.45	0.345
I/°C/M	0.12	0.356

Anexo 24. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 18:3 n-6 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.23	0.124
°C	8.29	0.087
M	7.31	0.324
I/°C	3.23	1.254
I/M	2.45	2.465
°C/M	13.34	0.755
I/°C/M	1.34	13.678.

Anexo 25. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 20:2 n-6 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1.27	0.061
°C	8.14	0.627
M	3.27	0.197
I/°C	0.23	2.356
I/M	1.59	0.235
°C/M	8.49	1.245
I/°C/M	0.56	0.356

Anexo 26. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 20:4 n-6 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2.37	0.457
°C	10.27	0.217
M	9.04	0.087
I/°C	0.23	0.456
I/M	2.54	0.243
°C/M	1.01	2.356
I/°C/M	3.56	1.677

Anexo 27. Resumen del análisis factorial (ANOVA) del ácido graso 20:5 n-3 en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C) y Concentración de nutrientes (M) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
L	12.24	0.771
°C	1.97	0.801
M	6.23	0.697
I/°C	3.23	0.002
I/M	2.45	13.55
°C/M	13.34	1.245
I/°C/M	1.34	0.289

Anexo 28. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de clorofila *a*, en donde se muestran el valor de *F* y *P* para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura (°C), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	22.12	0.000*
°C	20.94	0.000*
M	46.58	0.000*
T	25.07	0.000*
I / °C	4.05	0.052
I / M	15.25	0.000*
°C / M	15.16	0.000*
I / T	22.12	0.000*
°C / T	20.94	0.000*
M / T	46.58	0.000*
I / °C / M	4.05	0.052
I / °C / T	4.05	0.052
I / M / T	15.25	0.000*
°C / M / T	15.16	0.000*
I / °C / M / T	4.05	0.052

* Diferencia significativa.

Anexo 28.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.000*
300	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Temperatura (T) corresponde a los intervalos de 20 y 25 °C.

°C	20	25
20		0.001*
25	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.000*
“2f”	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.d. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.e. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	L	M	I	2	3	4
<i>1</i>	100	“f”		0.186	0.000*	0.449
<i>2</i>	100	“2f”	0.186		0.000*	0.941
<i>3</i>	300	“f”	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	“2f”	0.449	0.941	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.f. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	M	I	2	3	4
<i>1</i>	20	“f”		0.183	0.000*	0.398
<i>2</i>	20	“2f”	0.183		0.000*	0.962
<i>3</i>	25	“f”	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	25	“2f”	0.398	0.962	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.g. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	4		0.996	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	7	0.996		0.996	0.000*
<i>3</i>	300	4	1.000	0.996		0.000*
<i>4</i>	300	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.h. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	20	4		0.996	1.000	0.000*
<i>2</i>	20	7	0.990		0.990	0.000*
<i>3</i>	25	4	0.990	0.990		0.000*
<i>4</i>	25	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.i. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f” y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	“f”	4		0.000*	1.000	0.578
<i>2</i>	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	“f”	4	1.000	0.000*		0.578
<i>4</i>	“2f”	7	0.578	0.000*	0.578	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.j. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Luz (L) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios "f" y "2f" y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en itálicas representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	100	"f"	4		0.739	1.000	0.889	1.000	0.000*	1.000	0.999
<i>2</i>	100	"2f"	7	0.73		0.739	0.101	0.739	0.000*	0.739	0.423
<i>3</i>	100	"f"	4	1.000	0.739		0.889	1.000	0.000*	1.000	0.999
<i>4</i>	100	"2f"	7	0.889	0.101	0.889		0.889	0.000*	0.889	0.992
<i>5</i>	300	"f"	4	1.000	0.739	1.000	0.889		0.000*	1.000	0.999
<i>6</i>	300	"2f"	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>7</i>	300	"f"	4	1.000	0.739	1.000	0.889	1.000	0.000*		0.999
<i>8</i>	300	"2f"	7	0.999	0.423	0.999	0.992	0.999	0.000*	0.999	

* Diferencia significativa.

Anexo 28.k. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de clorofila *a*, en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$, Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	20	“f”	4		0.698	1.000	0.910	1.000	0.000*	1.000	0.999
<i>2</i>	20	“2f”	7	0.698		0.698	0.099	0.698	0.000*	0.698	0.351
<i>3</i>	25	“f”	4	1.000	0.698		0.910	1.000	0.000*	1.000	0.999
<i>4</i>	25	“2f”	7	0.910	0.099	0.910		0.910	0.000*	0.910	0.996
<i>5</i>	20	“f”	4	1.000	0.698	1.000	0.910		0.000*	1.000	0.999
<i>6</i>	20	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>7</i>	25	“f”	4	1.000	0.698	1.000	0.910	1.000	0.000*		0.999
<i>8</i>	25	“2f”	7	0.999	0.351	0.999	0.996	0.999	0.000*	0.999	

* Diferencia significativa

Anexo 29. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de nitratos (NO_3), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2549.60	0.000*
$^{\circ}\text{C}$	32.05	0.000*
M	474.00	0.000*
T	15594.00	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	0.00	1.000
I / M	218.31	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M	2.60	0.117
I / T	2549.60	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / T	32.05	0.000*
M / T	474.00	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	35.26	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	0.00	1.000
I / M / T	218.31	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	2.60	0.117
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	35.26	0.000*

* Diferencia significativa.

Anexo 29.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.000*
300	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.000*
“2f”	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitratos (NO_3), donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.d. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	$^{\circ}\text{C}$	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	20		0.715	0.131	0.000*
<i>2</i>	100	20	0.715		0.011*	0.000*
<i>3</i>	300	25	0.131	0.011*		0.018*
<i>4</i>	300	25	0.000*	0.000*	0.018*	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.e. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	4		0.715	0.131	0.000*
<i>2</i>	100	7	0.715		0.011*	0.000*
<i>3</i>	300	4	0.131	0.011*		0.018*
<i>4</i>	300	7	0.000*	0.000*	0.018	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.f. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “1f” y “2f” y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	“1f”	4		0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	“1f”	4	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 29.g. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitratos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

<i>I</i>	<i>°C</i>	<i>T</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	
<i>1</i>	<i>100</i>	<i>20</i>	<i>4</i>		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	<i>100</i>	<i>20</i>	<i>7</i>	0.000*		0.000*	0.801	0.000*	0.057	0.000*	0.000*
<i>3</i>	<i>100</i>	<i>25</i>	<i>4</i>	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	<i>100</i>	<i>25</i>	<i>7</i>	0.000*	0.801	0.000*		0.000*	0.001	0.000*	0.000*
<i>5</i>	<i>300</i>	<i>20</i>	<i>4</i>	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*
<i>6</i>	<i>300</i>	<i>20</i>	<i>7</i>	0.000*	0.057	0.000*	0.001	0.000*		0.000*	0.002*
<i>7</i>	<i>300</i>	<i>25</i>	<i>4</i>	1.000	0.000	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*
<i>8</i>	<i>300</i>	<i>25</i>	<i>7</i>	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.002*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de ortofosfatos (PO_4), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	1359429	0.000*
$^{\circ}\text{C}$	53.24	0.000*
M	246.02	0.000*
T	89926.20	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	653789.35	0.000*
I / M	570.70	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M	157.28	0.000*
I / T	1254.81	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / T	53.14	0.000*
M / T	246.56	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	76836.75	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	390.01	0.000*
I / M / T	570.09	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	157.71	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	1254.41	0.000*

* Diferencia significativa.

Anexo 30.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4) en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.000*
300	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$.

$^{\circ}\text{C}$	20	25
20		0.001*
25	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.000*
“2f”	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.d. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.e. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$. Los números en itálica representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	$^{\circ}\text{C}$	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	20		0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	20	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	300	25	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	25	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.f. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Concentración de nutrientes (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en itálica representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	“f”		0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	“2f”	0.000*		0.000*	0.004*
<i>3</i>	300	“f”	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	“2f”	0.000*	0.004*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.g. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	20	“f”		0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	20	“2f”	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	25	“f”	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	25	“2f”	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.h. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	4		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	300	4	1.000	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.i. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	20	4		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	20	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	25	4	1.000	0.000*		0.000*
<i>4</i>	25	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.j. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f” y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	“f”	4		0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	“f”	4	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.k. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y Concentración de nutrientes (M) corresponde a “1” y “2f”. Los números en itálicas representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	$^{\circ}\text{C}$	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	100	20	“1”		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	20	“2f”	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	25	“1”	0.000*	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>4</i>	100	25	“2f”	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.0999
<i>5</i>	300	20	“1”	0.000*	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
<i>6</i>	300	20	“2f”	0.000*	0.001*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.002*
<i>7</i>	300	25	“1”	0.002*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
<i>8</i>	300	25	“2f”	0.000*	0.000*	0.000*	0.0999	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.1. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

<i>I</i>	<i>°C</i>	<i>T</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	
<i>1</i>	100	20	4		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	20	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	25	4	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	100	25	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>5</i>	300	20	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*
<i>6</i>	300	20	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.002*
<i>7</i>	300	25	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*
<i>8</i>	300	25	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.m. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentración de nutrientes (M) corresponde a “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	100	“f”	4		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	“f”	4	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	100	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>5</i>	300	“f”	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
<i>6</i>	300	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.933
<i>7</i>	300	“f”	4	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
<i>8</i>	300	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.933	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.n. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}C$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}C$, Concentración de nutrientes (M) corresponde a “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}C$	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	20	“f”	4		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	20	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	25	“f”	4	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	25	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>5</i>	20	“f”	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
<i>6</i>	20	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>7</i>	25	“f”	4	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
<i>8</i>	25	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 30.ñ. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de ortofosfatos (PO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$, la Concentración de nutrientes (M) corresponde a “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

<i>I</i>	$^{\circ}\text{C}$	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	
<i>1</i>	100	20	f	4		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	20	f	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	20	2f	4	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	100	20	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*
<i>5</i>	100	25	f	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>6</i>	100	25	f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>7</i>	100	25	2f	4	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*
<i>8</i>	100	25	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.999
<i>9</i>	300	20	f	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	1.000	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*
<i>10</i>	300	20	f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>11</i>	300	20	2f	4	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*
<i>12</i>	300	20	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>13</i>	300	25	f	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
<i>14</i>	300	25	f	7	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>15</i>	300	25	2f	4	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
<i>16</i>	300	25	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.999	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31. Resumen del análisis factorial (ANOVA) de nitritos (NO_4), en donde se muestran el valor de F y P para los distintos factores: Irradiancia (I), Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Concentración de nutrientes (M), Tiempo de cultivo (T) y los niveles de interacción ($P < 0.05$).

Factores	F	P
I	2549.60	0.000*
$^{\circ}\text{C}$	32.05	0.000*
M	474.00	0.000*
T	15594.00	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$	0.00	1.000
I / M	218.31	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M	2.60	0.117
I / T	2549.60	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / T	32.05	0.000*
M / T	474.00	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / M	35.26	0.000*
I / $^{\circ}\text{C}$ / T	0.00	1.000
I / M / T	218.31	0.000*
$^{\circ}\text{C}$ / M / T	2.60	0.117
I / $^{\circ}\text{C}$ / M / T	35.26	0.000*

* Diferencia significativa.

Anexo 31.a. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I	100	300
100		0.000*
300	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.b. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Temperatura (T) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$.

$^{\circ}\text{C}$	20	25
20		0.001*
25	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.c. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”.

M	“f”	“2f”
“f”		0.000*
“2f”	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.d. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7.

T	4	7
4		0.001*
7	0.001*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.e. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y Medio de cultivo (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f”. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	“f”		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	“2f”	0.000*		0.000*	0.004*
<i>3</i>	300	“f”	1.000	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	“2f”	0.000*	0.004*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.f. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P<0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	100	4		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	300	4	1.000	0.000*		0.000*
<i>4</i>	300	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.g. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	$^{\circ}\text{C}$	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	20	4		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	20	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	25	4	1.000	0.000*		0.000*
<i>4</i>	25	7	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.h. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_4), en donde el factor Concentración de nutrientes (M) corresponde a las concentraciones de los medios “f” y “2f” y el Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálica* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>1</i>	“f”	4		0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*
<i>3</i>	“f”	4	0.000*	0.000*		0.000*
<i>4</i>	“2f”	7	1.000	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.i. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$ y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

<i>I</i>	<i>°C</i>	<i>T</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	
<i>1</i>	100	20	4		0.000*	0.981	0.999	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>2</i>	100	20	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	25	4	0.981	0.000*		0.999	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>4</i>	100	25	7	0.997	0.000*	0.999		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>5</i>	300	20	4	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*
<i>6</i>	300	20	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.999
<i>7</i>	300	25	4	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
<i>8</i>	300	25	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.999	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.j. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la Concentración de nutrientes (M) corresponde a “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en itálicas representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>1</i>	100	“f”	4		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	“2f”	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	“f”	4	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	100	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>5</i>	300	“f”	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*
<i>6</i>	300	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>7</i>	300	“f”	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*
<i>8</i>	300	“2f”	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

Anexo 31.k. Resumen de la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($P < 0.05$) de nitritos (NO_3), en donde el factor Irradiancia (I) corresponde a las irradiancias 100 y 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) corresponde a los intervalos de 20 y 25 $^{\circ}\text{C}$, la Concentración de nutrientes (M) corresponde a “f” y “2f” y el factor Tiempo de cultivo (T) corresponde a los días 4 y 7. Los números en *itálicas* representan los códigos pertenecientes a cada combinación.

	I	$^{\circ}\text{C}$	M	T	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>	<i>15</i>	<i>16</i>
<i>1</i>	100	20	f	4		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>2</i>	100	20	f	7	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.992	0.000*	0.992	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>3</i>	100	20	2f	4	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>4</i>	100	20	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*
<i>5</i>	100	25	f	4	1.000	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>6</i>	100	25	f	7	0.000*	0.992	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>7</i>	100	25	2f	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>8</i>	100	25	2f	7	0.000*	0.992	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.999
<i>9</i>	300	20	f	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>10</i>	300	20	f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>11</i>	300	20	2f	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*
<i>12</i>	300	20	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000		0.000*	0.000*	0.000*	0.999
<i>13</i>	300	25	f	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*	1.000	0.000*
<i>14</i>	300	25	f	7	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*
<i>15</i>	300	25	2f	4	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*	1.000	0.000*		0.000*
<i>16</i>	300	25	2f	7	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.999	0.000*	0.000*	0.000*	0.999	0.000*	0.000*	0.000*	

* Diferencia significativa.

