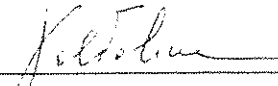


RESUMEN de la tesis de José Antonio López Elías presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA con opción en ECOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, México.

CULTIVOS SEMICONTINUOS DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON MEDIOS SIMPLIFICADOS: EVALUACION DE TECNICAS ANALITICAS Y DE PRODUCCION

Resumen aprobado por:


Dr. Domenico Voltolina L.
Director de Tesis

Este trabajo es parte de un estudio global sobre la calidad nutricional de las microalgas, que consistió en cultivos semicontinuos de Chaetoceros sp., Tetraselmis sp., Phaeodactylum tricornutum y Pavlova lutheri en un sistema semimasivo a diferentes razones de dilución y con un medio simplificado (fertilizante para cítricos), comparando los resultados con los obtenidos con un medio estándar.

Se encontró que las dos diatomeas y la clorofícea tuvieron una alta tasa de reproducción en ambos medios, por lo que se llegó rápidamente a la biomasa máxima. En el caso de Pavlova lutheri, su lento crecimiento facilitó la contaminación y la muerte de los cultivos.

En el medio alternativo se tuvo el mayor crecimiento y cantidad de biomasa para las dos especies de diatomeas; para Tetraselmis sp., la producción resultó ser menor pero se mantuvo constante durante el tiempo de experimentación. En el caso de Pavlova lutheri el medio alternativo no dió buenos resultados, debido a que ésta es una especie que requiere de medios complejos.

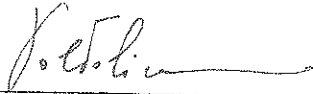
La producción de biomasa como peso seco total y de materia orgánica fue mayor en el medio alternativo para las dos diatomeas. Además el costo de producción es más bajo que en el medio control (aún cuando se trabaje con sales de grado industrial en vez que de grado reactivo) lo cual hacen de este medio una opción real en cultivos masivos. Para el caso de Tetraselmis sp. la cosecha es menor en el alternativo pero el costo de producción podría todavía justificar el uso de este medio, aumentando si fuera preciso el número de unidades productivas. Pavlova lutheri requiere de técnicas

de cultivo difícilmente aplicables en sistemas masivos, ya que su lento crecimiento favorece la contaminación y muerte de las poblaciones . A esto se agrega el hecho de que no acepta medios simplificados, ya que requiere de todos los microelementos y vitaminas de un medio complejo, lo cual aconseja insistir en la búsqueda de una especie con las mismas características morfológicas y de composición bioquímica, que permita el uso de técnicas y medios de cultivo simplificados.

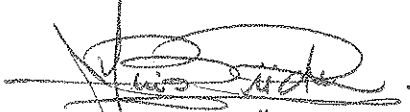
TESIS DEFENDIDA POR:

JOSE ANTONIO LOPEZ ELIAS

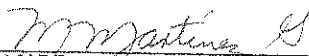
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE



DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA.- Director del Comité



DR. LUIS F. BUCKLE RAMIREZ.- Miembro del Comité



DR. MARIO MARTINEZ GARCIA.- Miembro del Comité



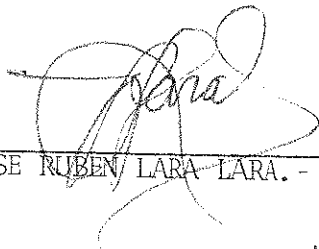
DR. JAIME FARBER LORDA.- Miembro del Comité



M.C. GILBERTO GAXIOLA CASTRO.- Miembro del Comité



M.C. GILBERTO GAXIOLA CASTRO.- Jefe Departamento de Ecología



DR. JOSE RUBEN LARA LARA.- Director de la División de Oceanología



DR. HECTOR ECHAVARRIA HERAS.- Director Académico Interino

MARZO 16, 1990

CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTIFICA Y DE
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA MARINA

CULTIVOS SEMICONTINUOS DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON
MEDIOS SIMPLIFICADOS: EVALUACION DE TECNICAS ANALITICAS
Y DE PRODUCCION

TESIS

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

JOSE ANTONIO LOPEZ ELIAS

Ensenada, B.C., marzo de 1990.

DEDICATORIA.

A Gisela :

Porque los dos nos bañamos en el mismo mar, inmersos entre sus olas y entre sus playas, en ese ir y venir, y más aún: seguimos unidos y en pie hasta el final.

A mi hijo :

Con amor, porque cuando tu comenzaste a caminar, caminamos juntos por este escrito y alegraste los instantes de descanso y los tiempos de trabajo.

A mis padres :

Con mucho afecto y cariño, y porque hace tiempo prometí llegar hasta donde las olas se desvisten entre su espuma y la arena con suavidad, y aquí estoy con Ustedes respirando ese aliento a agua y a sal.

A mis hermanos :

Por el cariño que les tengo, que aunque no estuvieron conmigo yo se que me apoyaban y deseaban que pudiera salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Domenico Voltolina por su decidido apoyo y atinada dirección desde antes que iniciara la tesis hasta el final de esta y por su valiosa enseñanza en todos los cursos que lleve con él. Además porque realmente es un verdadero e integro investigador.

A los sinodales Dr. Luis Fernando Bückle R., M. C. Gilberto Gaxiola, Dr. Jaime Farber-Lorda y Dr. Mario Martínez, por todas sus observaciones y sugerencias durante la preparación de este trabajo.

A Gisela, por haberme apoyado durante todo el transcurso de la tesis, que se dice fácil, pero es algo mucho más significativo. Gracias.

A Ma. del Pilar Sánchez S. muchísimas gracias por sus observaciones y ayuda durante el desarrollo de este trabajo y a su asesoría incondicional en la estadística aplicada en esta investigación.

A Beatriz Cordero E. le agradezco su gran ayuda para la preparación del escrito de la tesis y que me tendió la mano desde que entre al Depto. de Acuicultura.

A Roxana Rico M. le doy las gracias por su colaboración en parte de los trabajos experimentales y que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en esta investigación.

A mis amigos : Francisco Correa, Julio Villaescusa, Norberto Flores, Irene González, Lourdes Trujillo y Saul González, que de una manera u otra me apoyaron en este trabajo.

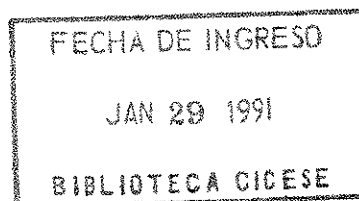
A mis padres y hermanos por el vínculo que siempre nos ha unido.

Al CO.NA.C.y.T. y al C.I.C.E.S.E. por haberme otorgado las becas para mis estudios de maestría.

Al C.I.C.T.U.S. por su apoyo recibido para la terminación de esta investigación.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	12
II.1 Selección de cepas de microalgas	12
II.2 Selección de medios de cultivo	13
II.3 Métodos de cultivo	15
II.4 Composición bioquímica de las microalgas	18
II.5 Tratamiento estadístico de los datos	21
II.6 Costo de producción de las microalgas	22
III. RESULTADOS	25
III.1 Cultivo semicontinuo de <u>Chaetoceros</u> sp.	25
III.1.1 Composición proximal de las células	31
III.1.2 Producción de <u>Chaetoceros</u> sp.	35
III.2 Cultivo semicontinuo de <u>Tetraselmis</u> sp.	38
III.2.1 Composición proximal de las células	45
III.2.2 Producción de <u>Tetraselmis</u> sp.	49
III.3 Cultivo semicontinuo de <u>Phaeodactylum tricornutum</u>	52
III.3.1 Composición proximal de las células	61
III.3.2 Producción de <u>Phaeodactylum tricornutum</u>	61
III.4 Cultivo semicontinuo de <u>Pavlova lutheri</u>	66



	<u>Página</u>
III.4.1 Composición proximal de las células	77
III.4.2 Producción de <u>Pavlova lutheri</u>	77
IV. DISCUSION	86
IV.1 <u>Chaetoceros</u> sp.	86
IV.1.1 Composición proximal de las células	87
IV.2 <u>Tetraselmis</u> sp.	89
IV.2.1 Composición proximal de las células	90
IV.3 <u>Phaeodactylum tricornutum</u>	91
IV.3.1 Composición proximal de las células	93
IV.4 <u>Pavlova lutheri</u>	94
IV.4.1 Composición proximal de las células	95
V. CONCLUSIONES	97
V.1 <u>Chaetoceros</u> sp.	97
V.2 <u>Tetraselmis</u> sp.	98
V.3 <u>Phaeodactylum tricornutum</u>	100
V.4 <u>Pavlova lutheri</u>	102
V.5 Conclusiones generales	104
LITERATURA CITADA	107
APENDICE	115

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
I Solución madre de nutrientes para preparar 1000 L del medio de cultivo f (Guillard y Ryther, 1962).	14
II Formulación química del fertilizante para cítricos.	16
III Condiciones óptimas para la extracción de proteínas de las cuatro cepas de microalgas.	20
IV Costo del medio f (grado reactivo e industrial) y del medio alternativo (fertilizante con adición de otros nutrientes de grado industrial) en dólares por 1000 L de cultivo.	24
V Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	26
VI Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de <u>Chaetoceros</u> sp.	30
VII <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	30
VIII Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de <u>Chaetoceros</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	32
IX Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de <u>Chaetoceros</u> sp. A la	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	34
X Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de <u>Chaetoceros</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	37
XI Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de <u>Chaetoceros</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	40
XII Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de <u>Tetraselmis</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	42
XIII Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de <u>Tetraselmis</u> sp.	46
XIV <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	46
XV Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa en número de células x μL^{-1} (A) y μg peso seco x 10^{-6} células (B) de <u>Tetraselmis</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	47

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
XVI Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de <u>Tetraselmis</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	50
XVII Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de <u>Tetraselmis</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	53
XVIII Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de <u>Tetraselmis</u> sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	55
XIX Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	57
XX Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> .	60
XXI <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios para diluciones iguales.	60
XXII Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg peso seco \times	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
10 ⁻⁶ células (B) de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.	62
XXIIISignificancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa como µg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	64
XXIV Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	68
XXV Significancia de la prueba t de Student y valores promedio + desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	69
XXVI Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	71
XXVII Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de <u>Pavlova lutheri</u> .	75
XXVIII <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio.	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	75
XXIX Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de <u>Pavlova lutheri</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	76
XXX Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de <u>Pavlova lutheri</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales	79
XXXI Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de <u>Pavlova lutheri</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	83
XXXII Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de <u>Pavlova lutheri</u> . A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.	85
XXXIII Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de <u>Chaetoceros</u> sp. a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción.	116
XXXIV Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de <u>Tetraselmis</u> sp. a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
diferentes temperaturas y tiempos de extracción.	117
XXXV Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción	118
XXXVICantidad de proteína extraída en μg de peso seco de <u>Pavlova lutheri</u> a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción.	119
XXXVII <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células $\times \mu\text{L}^{-6}$. C: cultivos en medio control; A: cultivos en medio alternativo.	120
XXXVIII <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	121
XXXIX <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	122
XL <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	123
XLI <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	124
XLII <u>Chaetoceros</u> sp. Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	125
XLIII <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	126
XLIV <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	127
XLV <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	128
XLVI <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	129
XLVII <u>Chaetoceros</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	130
XLVIII <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de medias (t de Student de valores de biomasa, en número de células x μL^{-1} . C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	131
XLIX <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco x 10^{-6} células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	132
L <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	133
LI <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	134
LII <u>Tetraselmis</u> sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	135
LIII <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	136
LIV <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	137
LV <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	138
LVI <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	139
LVII <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	140
LVIII <u>Tetraselmis sp.:</u> Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	141
LIX <u>Phaeodactylum tricornutum:</u> Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	142
LX <u>Phaeodactylum tricornutum:</u> Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	143
LXI <u>Phaeodactylum tricornutum:</u> Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos	

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	144
LXII <u>Phaeodactylum tricornutum</u> . Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	145
LXIII <u>Phaeodactylum tricornutum</u> .: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	146
LXIV <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	147
LXV <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	148
LXVI <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	149
LXVII <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	150
LXVIII <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	151
LXIX <u>Phaeodactylum tricornutum</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	152

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
LXX <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células x μL^{-1} . C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	153
LXXI <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco x 10^{-6} células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	154
LXXII <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	155
LXXIII <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	156
LXXIV <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	157
LXXV <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas x mg^{-1} de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	158
LXXVI <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	159
LXXVII <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: Cultivos en el medio alternativo.	160
LXXVIII <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	161

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
LXXIX <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.	162
LXXX <u>Pavlova lutheri</u> : Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivo en el medio alternativo.	163

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Curva de crecimiento de una microalga mantenida en fase de crecimiento exponencial (A) y de lento crecimiento (B) en un sistema semicontinuo.	8
2	Sistema de cultivo semicontinuo de microalgas empleado para la experimentación.	17
3	Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio control a las tres razones de dilución.	28
4	Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio alternativo a las tres razones de dilución.	29
5	Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	33
6	Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT. ORG.) por cosecha de unidad productiva de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	36
7	Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de <u>Chaetoceros</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	39
8	Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Tetraselmis</u> sp. en el medio control a las tres razones de dilución.	43
9	Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Tetraselmis</u> sp. en el medio alternativo a las tres razones de dilución.	44
10	Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de <u>Tetraselmis</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	48

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
11 Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT ORG.) por cosecha de unidad productiva de <u>Tetraselmis</u> sp en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	51
12 Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de <u>Tetraselmis</u> sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	54
13 Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Phaeodactylum tricorutum</u> en el medio control a las tres razones de dilución.	58
14 Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Phaeodactylum tricorutum</u> en el medio alternativo a las tres razones de dilución.	59
15 Biomasa promedio en µg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de <u>Phaeodactylum tricorutum</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	63
16 Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT ORG.) por cosecha de unidad productiva de <u>Phaeodactylum tricorutum</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	65
17 Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de <u>Phaeodactylum tricorutum</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	67
18 Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio control a las tres razones de dilución.	72
19 Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio alternativo a las tres razones de dilución.	73

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
20	Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.	78
21	Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT ORG.) por cosecha de unidad productiva de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	80
22	Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de <u>Pavlova lutheri</u> en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.	84

CULTIVOS SEMICONTINUOS DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON
MEDIOS SIMPLIFICADOS: EVALUACION DE TECNICAS ANALITICAS
Y DE PRODUCCION

I. INTRODUCCION

A pesar de muchos esfuerzos para el desarrollo de tecnologías alternativas (Jones et al., 1974; Chu et al., 1982; Langdon et al., 1985; Laing, 1987; Millamena et al., 1988) el cultivo de organismos filtroalimentadores sigue dependiendo del suministro de microalgas para fines dietéticos (Becker, 1986; Laing et al., 1987), ya que éstas aparentemente aportan nutrientes de diferente naturaleza y composición (Geldenhuis et al., 1988), como es el caso de especies con diferente contenido de lípidos (Pillsbury, 1985; Emdadi y Berland, 1989), de carbohidratos (Myklestad, 1974; Myklestad et al., 1972; Flaak y Epifanio, 1978) o de proteínas (Parsons et al., 1961; Conover, 1975). Aparte de lo mencionado anteriormente, la importancia de las microalgas como fuente dietética estriba en la presencia de otros constituyentes, total o parcialmente desconocidos, que satisfacen los diferentes requerimientos de las diversas especies que se mantienen en sistemas de cultivo (Laing y Millican, 1986; Laing, op. cit.; Whyte, 1987).

Es por esto que la disponibilidad de microalgas de composición bioquímica adecuada y constante es de gran importancia en el cultivo de organismos marinos que, como por ejemplo los moluscos bivalvos, dependen para su alimentación de partículas orgánicas en suspensión (Claus et al., 1979; Bardach et al., 1986; Pruder et al., 1982).

Varios autores estudiaron la composición bioquímica de las microalgas en relación a la luz, la temperatura y con diferentes medios de cultivo. En general, las conclusiones reportadas coinciden en determinar que:

a) Las microalgas mantenidas en medios no limitantes no difieren significativamente en su composición bioquímica cuando se cultivan en diferentes medios (Sakshaug y Holm-Hansen, 1977; Rhee, 1978; Utting, 1985; Wickfors, 1986).

b) Las microalgas en diferentes fases de crecimiento (Myklestad, op. cit.; Myklestad, 1977; Borowitzka, 1988; Becker, op. cit.) o limitadas en su crecimiento por diferentes factores como la cantidad de luz (Marmelstein, 1970; Langowska y Zawadzki, 1979; Brand y Guillard, 1981; Richardson et al., 1983), la calidad de la luz (Wallen y Geen, 1971; Kowalik, 1970; Voskresenskaya, 1972; Humphrey, 1979; Glover et al., 1987), la disponibilidad de uno o más nutrientes (Harrison et al., 1977; Sakshaug y

Holm-Hansen op. cit.; McClusky y Berry, 1978; Gallagher y Mann, 1982; Fabregas et al., 1984), temperatura (Jorgensen, 1968; Morris y Glover, 1974; Eppley, 1972), difieren significativamente en su composición bioquímica.

Resultados de este tipo, y la relación existente entre las razones carbono:nitrógeno y carbohidratos:proteínas sugieren que la manipulación de diferentes variables de importancia para el crecimiento de las microalgas (por ejemplo luz, temperatura, disponibilidad de uno u otro nutriente) podría resultar en la producción de microalgas de características bioquímicas y nutricionales definidas y constantes. Además, técnicas de este tipo permitirían el uso de medios de cultivo alternativos a los comúnmente utilizados en acuicultura, que normalmente tienen formulaciones complejas, desarrolladas para trabajos de experimentación fisiológica y que utilizan compuestos químicos orgánicos e inorgánicos de costo elevado.

Para la producción de microalgas, bien sea a nivel experimental o para producción masiva, se utilizan tres modalidades diferentes, ampliamente descritas en varias publicaciones como por ejemplo en Ukeles (1973), Vonshak (1986) y Fogg y Thake (1987) bajo el nombre de cultivos estáticos (batch cultures), cultivos semicontinuos y cultivos continuos. En el primer caso, un determinado volumen de

medio de cultivo se inocula con una cantidad inicial de microalgas. Estas, al multiplicarse a una velocidad dependiente de sus características biológicas y de las condiciones de cultivo, alcanzarán en un tiempo determinado su densidad máxima, cuyo valor depende de los factores limitantes del sistema. Cultivos de este tipo se utilizan ampliamente en estudios experimentales, aunque se conocen varios casos de unidades de producción de microalgas para uso acuicultural que emplean este mismo sistema (AQUACOP, 1983; Rodríguez y Reprieto, 1985; Voltolina, Depto. Acuicultura, C.I.C.E.S.E., com. pers.).

Los cultivos de tipo continuo se caracterizan por un recambio continuo de parte del cultivo, que es reemplazado con medio fresco. En esta forma, se sigue produciendo con regularidad una cantidad aproximadamente constante de biomasa microalgal. Según varias indicaciones de la literatura este método sería comunmente empleado en sistemas de producción masiva (Zebal, 1984; Laing y Jones, 1988) aunque en muchos casos una revisión de las técnicas empleadas revela que en realidad el cultivo es del tipo semicontinuo que se describe más abajo. La razón de esta discrepancia se debe al hecho que hasta años relativamente recientes se reconocían dos modalidades de cultivo continuo. La primera (quimiostato) consiste en una renovación continua del medio a través de una bomba que funciona con flujo constante. Con este sistema,

como lo demostraron por primera vez Monod (1950) y más tarde Droop (1975), la tasa de reproducción de las microalgas es igual a la velocidad de flujo del medio. El segundo caso (turbidostato) consiste en la cosecha periódica y automatizada de parte del cultivo, cuando la densidad de las microalgas llegue a un valor predeterminado y medido en general por nefelometría. Al mismo tiempo, se agrega medio fresco al sistema hasta llegar a un valor nefelométrico también previamente determinado. Como tal, este sistema tendría en realidad que considerarse como una versión automatizada de la metodología definida como cultivo semicontinuo (cosecha manual a intervalos regulares, en general determinados por la tasa de crecimiento intrínseco de la microalga en las condiciones de cultivo específicas, y sucesivo reemplazo del volumen cosechado con medio fresco). Este último método es probablemente el más comúnmente empleado en sistemas de producción de microalgas, debido en parte a su simplicidad, y también a la costumbre de proporcionar alimento en porciones diarias, la cual es debida al hecho que los organismos filtroalimentadores tienen una actividad de filtración discontinua. De hecho, varios autores han encontrado que la alimentación discontinua da lugar a una mayor eficiencia de filtración y a un mayor crecimiento en moluscos bivalvos que una alimentación continua (Cordero, Depto. Acuicultura, C.I.C.E.S.E., com. pers.; Langton y McKay, 1976). La técnica de cultivo

semicontinuo es también la más común en la actividad definida como microagricultura (cultivo de microalgas para consumo humano o para fines industriales), que se está desarrollando en países como Israel y Australia (Richmond, 1986; Becker, 1988), como alternativa al uso de zonas áridas en la proximidad del mar, de lagos salados, o de otras fuentes de agua no aprovechables para fines más tradicionales.

Este método, como el quimiostato, permite mantener una producción constante, no solamente en términos de biomasa producida, sino también en el porcentaje de los diferentes constituyentes celulares (Lechuga y Costan, 1986; Moal et al., 1978; Gallagher y Mann, op. cit.). Esta misma uniformidad de la composición proximal permite poder proporcionar dietas con razones de carbohidratos:proteínas constantes durante todo el período de crecimiento, lo cual repercute de manera directa en el desarrollo de los organismos cultivados con estas dietas (Gallagher y Mann, op. cit.; Epifanio, op. cit.).

Es posible mantener las microalgas en diferentes fases de su crecimiento utilizando el sistema semicontinuo, ya que el variar la tasa de dilución causa cambios en la tasa de crecimiento específico (μ)

Que la μ dependa de la razón de dilución se explica

utilizando la ecuación logística, que relaciona el cambio de la biomasa-(x) en el tiempo, con las tasas de reproducción (μ) y de mortalidad (en este caso, de dilución (D)) :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = X (\mu - D) \quad (1)$$

Cuando no haya incremento de biomasa en tiempos sucesivos, tendremos $\frac{\partial X}{\partial t} = 0$, lo cual significa que la tasa de crecimiento tiene que ser igual a la tasa de dilución ($\mu - D = 0$). La tasa máxima de dilución puede corresponder a la tasa máxima de crecimiento (μ max.) para ese sistema (figura 1.A); alternativamente, una menor tasa de dilución resultará en una población en la fase de crecimiento lento, cuya concentración se estabilizará alrededor del valor máximo posible para ese sistema, como se ejemplifica en la figura 1.B. Esto repercute de manera directa en el estado fisiológico de las microalgas, obteniéndose así diversas proporciones entre sus constituyentes químicos celulares. Como consecuencia, la constancia de una determinada tasa de dilución resulta en una composición celular constante de las microalgas.

El crecimiento de las microalgas se caracteriza por tener cuatro fases separadas. La primera fase se conoce como

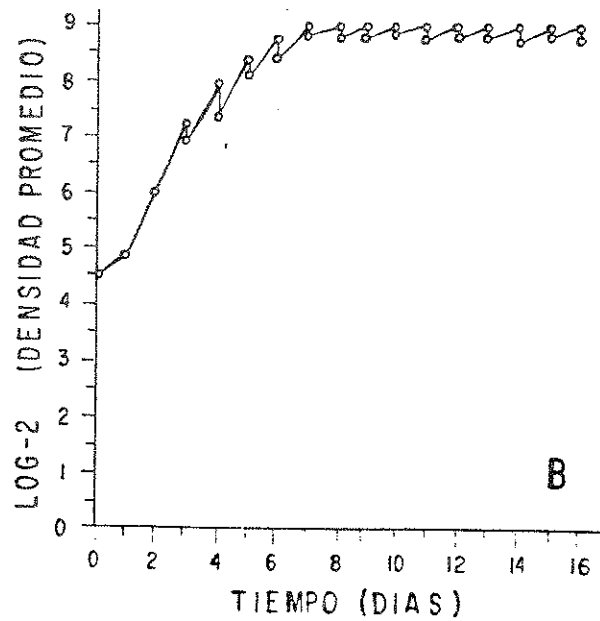
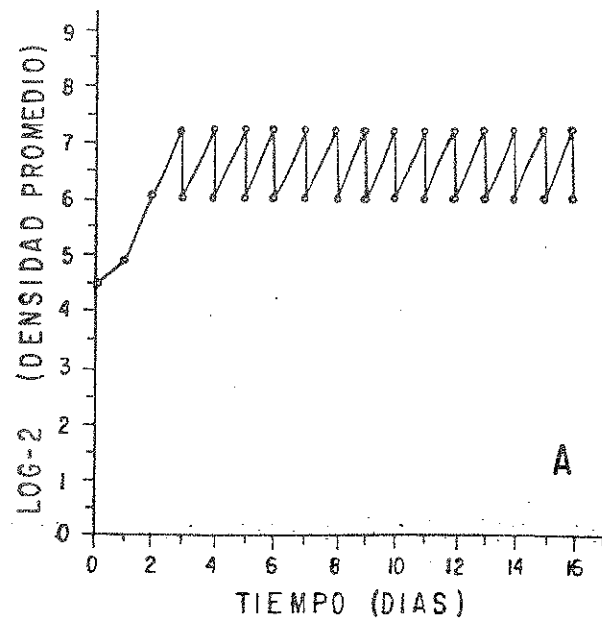


Figura 1. Curva de crecimiento de una microalga mantenida en fase de crecimiento exponencial (A) y de lento crecimiento (B) en un sistema semicontinuo.

la fase de acondicionamiento o de retraso (lag); la segunda fase, o de crecimiento exponencial, se caracteriza por una rápida y constante división celular. En esta fase no existe ningún factor limitante y se logra una alta producción de material protéico (Conover, op. cit.; Myklestad y Haug, 1972). La tercera fase, o de crecimiento lento, se caracteriza porque la tasa de crecimiento empieza a declinar debido a factores como el agotamiento de los nutrientes, cambios del pH, limitación de luz y otros. La disminución de la tasa de crecimiento causa alteraciones celulares debido al aumento de las sustancias de reserva (carbohidratos y lípidos) y con el consiguiente decremento de la concentración relativa de proteínas. La cuarta fase (fase estacionaria o de crecimiento nulo) es cuando el número de células se mantiene constante debido a un factor limitante. En esta fase aumentan ulteriormente los carbohidratos y los lípidos (estos últimos sobre todo cuando el nitrógeno es el factor limitante) debido a que las rutas metabólicas se desvían hacia la producción de estos dos últimos constituyentes (Pugh, 1971, 1975, Myklestad, 1974; Emdadi y Berland, op. cit.). La quinta fase o de muerte está caracterizada por una disminución de la biomasa debido al efecto del agotamiento de los nutrientes y en ocasiones a la acumulación de sustancias tóxicas en el medio, o de la contaminación por bacterias y hongos, a la aglomeración de sustancias orgánicas y a otros fenómenos que causan la caída del cultivo.

Como conclusión, a través del sistema semicontinuo se puede mantener un cultivo en una determinada fase de crecimiento al poder manipular la tasa de dilución lo cual, por los motivos mencionados, permite cosechar biomasa de características conocidas y constantes.

El presente trabajo es parte complementaria de un estudio global sobre la calidad nutricional de varias especies de microalgas, llevado a cabo en el Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. Dicho proyecto contempla como paso inicial aislar nuevas cepas de microalgas de esta región (Ensenada, B.C.) que reúnan ciertas características, como la de tener un rápido crecimiento, un tamaño adecuado y la facultad de crecer en medios de cultivo económicos. Por otro lado se continuará experimentando con las cepas ya tradicionalmente usadas en la acuicultura como Isochrysis galbana Parke, Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green, Skeletonema costatum Cleve y Phaeodactylum tricornutum Bohlin. El proyecto también contempla estudiar medios alternativos para las cepas tradicionales y nuevas, y definir para cada una medios y métodos de cultivo alternativos para cultivos masivos.

El objetivo particular de este trabajo es estudiar la composición bioquímica de Chaetoceros sp., Phaeodactylum tricornutum Bohlin, Tetraselmis sp. y Pavlova (Monochrysis)

lutheri (Droop) Green cultivadas en sistema semicontinuo a diferentes razones de dilución y con un medio de cultivo alternativo y comparar los resultados con los obtenidos con el medio f descrito por Guillard y Ryther (1962), por ser éste el medio que se emplea más frecuentemente en la acuicultura.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 Selección de cepas de microalgas

Las cuatro especies de microalgas utilizadas para este trabajo pertenecen al cepario del C.I.C.E.S.E.. De estas, dos son subcepas obtenidas en años anteriores del National Marine Fisheries Service de La Jolla (California, E.U.A.), y dos se aislaron y seleccionaron localmente por su interés potencial en acuicultura, usando como criterios iniciales de selección sus características morfológicas, su crecimiento rápido y su aceptación de medios simplificados (Trujillo-Valle y González-Leonardo, Depto. de Acuicultura, C.I.C.E.S.E., com. pers.).

A continuación se identifican las cuatro especies, y se dan las claves de identificación en el cepario del C.I.C.E.S.E. y el lugar de donde proviene cada una de ellas.

ESPECIE	No DE CEPA	LUGAR
<u>Phaeodactylum tricornutum</u>	PH-T-1	Nat. Mar. Fish. Serv.
<u>Pavlova lutheri</u>	PA-L-1	Nat. Mar. Fish. Serv.
<u>Chaetoceros</u> sp.	CH-X-1	C.I.C.E.S.E.
<u>Tetraselmis</u> sp.	TE-X-1	C.I.C.E.S.E.

Las cepas se mantuvieron según las modalidades

especificadas en el reporte interno que se está preparando, relativo al cepario del C.I.C.E.S.E., hasta el momento de su utilización para la preparación de los inóculos necesarios. Estas consisten en el mantenimiento en medio f preparado con agua de mar de una salinidad de 30 - 33 ‰, a una temperatura de 15 °C y una iluminación constante con una mezcla de tubos de neon de luz blanca fría y luz de día.

II.2 Selección de medio de cultivo.

Para todas las especies o cepas, se utilizó como medio control el descrito por Guillard y Ryther (1962), que es ampliamente utilizado para una gran variedad de especies planctónicas o bentónicas, importantes en la acuicultura. La composición química de este medio se presenta en la Tabla I.

Los medios alternativos se seleccionaron independientemente para cada especie, tomando como medios iniciales los descritos por Trujillo-Valle (trabajo en proceso) y Voltolina (1987) y modificandolos según los resultados de experimentos adicionales, para obtener los medios definitivos como se especifica mas adelante. En sí, la base del nitrógeno y del fósforo del medio alternativo fue para todas las especies cultivadas un fertilizante para cítricos (marca TAG LINE), cuya formulación se presenta en la Tabla II. En el caso de las dos diatomeas, el medio

Tabla I. Solución madre de nutrientes para preparar 1000 L del medio de cultivo f (Guillard y Ryther, 1962).

CONSTITUYENTES	Moles/L de agua destilada
Nitrato de sodio	1.76
Fosfato de Sodio monobasico	0.072
Metasilicato de Sodio	0.107
Fierro Secuestreno	0.023
Sulfato Cuprico	0.079×10^{-3}
Sulfato de Zinc	0.153×10^{-3}
Cloruro de Cobalto	0.085×10^{-3}
Cloruro Manganoso	1.83×10^{-3}
Molibdato de Sodio	0.052×10^{-3}
Biotina	1.00 mg
Cianocobalamina	1.00 mg
Tiamina	200.00 mg

alternativo se enriqueció con 0.53 moles de silicatos (equivalente a la mitad de los utilizados para el medio control). Con la excepción de Chaetoceros sp., el medio simplificado tuvo que enriquecerse con la misma cantidad de quelante (FeEDTA) de la prevista para el medio f. Pavlova lutheri tuvo un crecimiento satisfactorio en este medio sólo después de su enriquecimiento con vitamina B₁₂, confirmando su auxotrofia obligada en relación a esta particular vitamina. Estas necesidades adicionales se comprobaron experimentalmente, al verificar el crecimiento de las microalgas en medios sin y con enriquecimiento.

II.3 Método de cultivo

Para mantener los cultivos primarios y la obtención de inóculos se siguieron las técnicas tradicionales (por ejemplo la descrita en Fox, 1983), hasta llegar al nivel deseado de unidad productiva (carboys con una capacidad de 18 L, con 10 L de cultivo), a partir del cual se mantuvieron según la técnica de cultivo semicontinuo a tres diferentes razones de dilución que se determinaron empíricamente para cada una de las cepas con los criterios que se describen más adelante, en la sección de resultados. El sistema semicontinuo empleado se ilustra en la figura 2.

Las condiciones de cultivo que se mantuvieron durante

Tabla II. Formulación química del fertilizante para cítricos.

CONSTITUYENTE	PORCENTAJE
N derivado de NH_4PO_4 y NH_4SO_4	(9 %)
N derivado de la Urea	(1 %)
Nitrogeno Total (N)	10 %
Fosforo disponible derivado del NH_4PO_4 .	8 %
Potasio soluble	6 %
Azufre (S)	6 %
Calcio (Ca)	3 %
Fierro (Fe)	1 %
Cantidad para preparar 1000 L	140 g

NOTA.- La cantidad preparada equivale a 1 M/L de Nitrogeno y a 0.36 M/L de Fosforo.

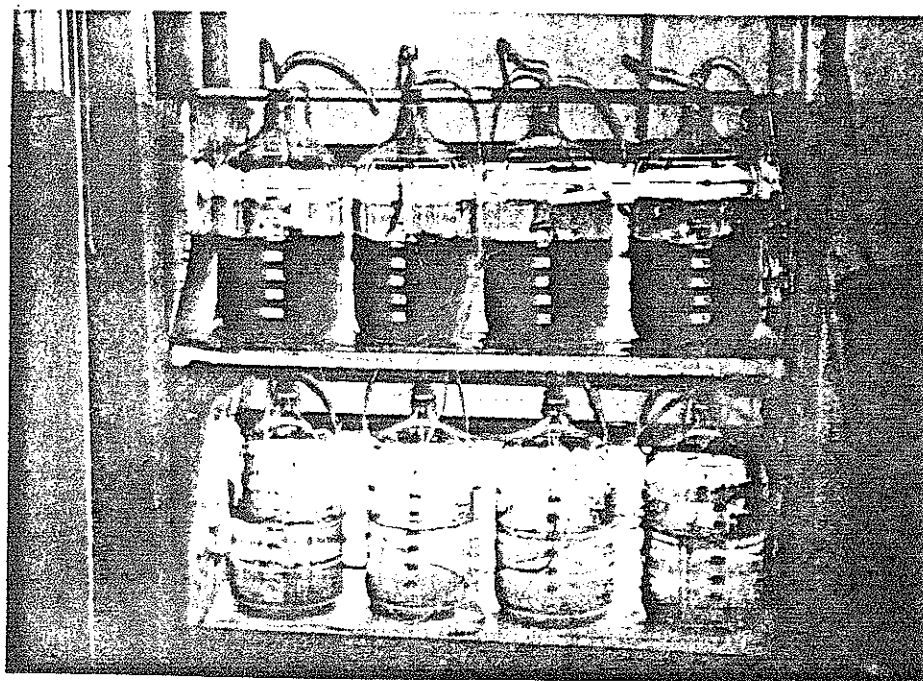


Figura 2. Sistema de cultivo semicontinuo de microalgas empleado para la experimentación.

Peso seco y peso seco libre de cenizas: según el método descrito en Sorokin (1973).

Proteínas: según el método de Lowry et al. (1951), modificado por Malara y Charra (1972a). Para la extracción, se siguió inicialmente el método descrito por Farber-Lorda (1986) y Mayzaud et al. (1985), pero los datos obtenidos señalaron la necesidad de aportar unas modificaciones a tal metodología, ya que se obtuvieron bajos porcentajes de extracción por la interferencia de los pigmentos y por la baja solubilización de las proteínas debida a la presencia de una pared celular que impedía la liberación de todo el contenido protéico celular (Raush, 1981). Debido a esto se determinó el óptimo de extracción para cada una de las cepas, variando la concentración del hidróxido de sodio (NaOH), que permite solubilizar y estabilizar las proteínas por un determinado tiempo, y la temperatura y el tiempo de extracción, que son importantes para destruir la pared celular.

En la Tabla III se presentan las condiciones óptimas de extracción de proteínas para las cuatro especies de microalgas. En el apéndice, de la Tabla XXXIII a XXXVI, se dan los datos obtenidos para cada temperatura, tiempo y concentración de NaOH experimentadas.

Tabla III. Condiciones óptimas para la extracción de proteínas de las cuatro cepas de microalgas.

CEPA	CONC. DE NaOH	TEMPERATURA	TIEMPO
<u>Chaetoceros</u> sp.	0.1 N	100 °C	10 min
<u>Phaeodactylum</u>			
<u>tricornutum</u>	0.1 N	100 °C	20 min
<u>Pavlova lutheri</u>	0.1 N	80 °C	10 min
<u>Tetraselmis</u> sp.	0.1 N	100 °C	10 min

Carbohidratos totales: Para la extracción se siguió la técnica descrita por Whyte (1987) y para la determinación el método de Dubois et al. (1956) descrito en Malara y Charra (1972b).

Lípidos: Fueron extraídos por el método descrito en Bligh y Dyer (1959) modificado por Chiaverini (1972). Para la determinación se siguió la técnica de Pandé et al. (1963).

Fibra cruda: Se determinó según el método descrito en Strickland y Parsons (1968).

II.5 Tratamiento estadístico de los datos

Para conocer si la concentración de cada uno de los cultivos se mantuvo estable durante el período experimental se determinó la significancia de la pendiente (prueba del coeficiente Beta) de la regresión entre el \log_2 de las unidades de fluorescencia y el tiempo (días), (Sokal y Rohlf, 1969).

El efecto del medio de cultivo y de las razones de dilución sobre el aumento de concentración (como unidades de fluorescencia arbitrarias) de las microalgas se determinó con un ANOVA de dos vías con un nivel de aceptación $\alpha = 0.05$.

Tabla IV. Costo del medio f (grado reactivo e industrial) y del medio alternativo (fertilizante con adición de otros nutrientes de grado industrial) en dolares por 1000 L de cultivo.

ESPECIE	MEDIO f (grado reactivo)	MEDIO f (grado industrial)	MEDIO ALTERNATIVO (fertilizante + grado industrial)
<u>Chaetoceros</u> sp.	4.40	1.68	0.29
<u>Tetraselmis</u> sp.	3.00	1.58	0.33
<u>Phaeodactylum</u>			
<u>tricornutum</u>	4.40	1.68	0.42
<u>Pavlova lutheri</u>	3.00	1.58	0.42

III. RESULTADOS

III.1 Cultivo semicontinuo de Chaetoceros sp.

En primera instancia se creció la microalga hasta alcanzar su biomasa máxima, y durante este lapso de tiempo se determinó la máxima tasa de crecimiento (μ max.) que resultó de 1.54 generaciones \times día⁻¹ para el medio control y de 2.5 generaciones \times día⁻¹ para el medio alternativo. Por ésto se decidió establecer en forma empírica una razón de dilución diaria máxima de 0.50, suficientemente cercana a μ max., que permite además mantener una concentración celular relativamente elevada. Decidida la dilución máxima (D max.) se preestablecieron dos diluciones diarias inferiores, de 0.33 y 0.25.

Los cultivos se mantuvieron estables por aproximadamente 20 días, con una μ promedio de 1.008, 0.70 y 0.53 generaciones \times día⁻¹ para el medio control y de 0.98, 0.68 y 0.47 generaciones \times día⁻¹ para el medio alternativo, para las razones de dilución de 0.50, 0.33 y 0.25 respectivamente; durante este periodo se tomaron entre cuatro y cinco muestras para la determinación de biomasa (No de células \times mL⁻¹) y las determinaciones bioquímicas (proteínas, carbohidratos, lípidos y fibra cruda). La constancia de la biomasa con respecto al tiempo se comprobó con una prueba Beta (Tabla V).

Tabla V. Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de Chaetoceros sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

VARIABLE		RELACION		
CULTIVO	DILUCION	F	G.L.	DECISION
C	0.50	0.255	12	ACEPTA
C	0.33	0.149	12	ACEPTA
C	0.25	0.260	12	ACEPTA
C	0.25	0.341	12	ACEPTA
A	0.50	-0.189	12	ACEPTA
A	0.50	-0.375	12	ACEPTA
A	0.33	0.066	12	ACEPTA
A	0.25	0.052	12	ACEPTA

En base a los resultados de esta prueba se concluye que la biomasa permaneció constante durante el periodo de estabilidad del cultivo, lo cual permite esperar una igual constancia para el resto de las variables indicadoras de biomasa.

En las figuras 3 y 4 se muestran las variaciones de biomasa del cultivo de Chaetoceros sp. en el medio control y en el alternativo a las tres razones de dilución por un lapso de 24 días.

Con un ANOVA de dos vías se encontró que existían diferencias significativas por medio y por razón de dilución (Tabla VI) y con una prueba de Student-Newman-Keuls se encontraron diferencias entre todas las razones de dilución dentro de cada medio, a excepción de las razones de 0.33 y 0.25 del medio control y entre las dos razones inferiores de los dos medios (Tabla VII). No se encontraron diferencias entre los duplicados (0.25-0.25 del medio control y 0.50-0.50 del alternativo).

Las biomazas promedio expresadas como número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ difieren significativamente entre razones de dilución sólo para el medio alternativo. Al comparar entre medios, la biomasa resultó mayor en el medio alternativo para las razones de 0.33 y 0.25 (Tabla VIII).

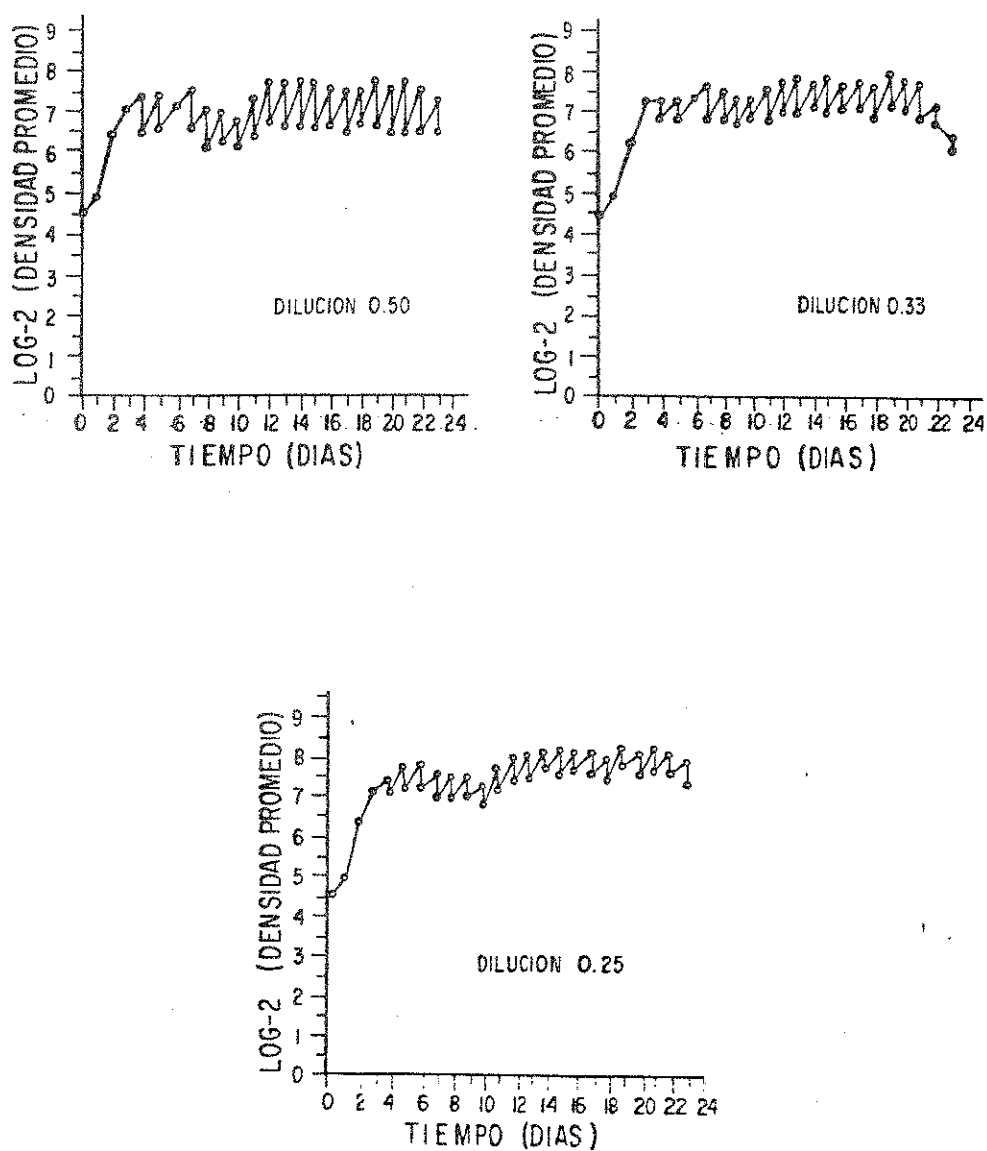


Figura 3. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Chaetoceros sp. en el medio control a las tres razones de dilución.

Tabla VI. Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en fase estable de Chaetoceros sp.

VARIABLE	VALOR DE F	SIGNIFICANCIA
DILUCION	23.509	* *
MEDIO	40.890	* * *

Tabla VII. Chaetoceros sp.: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL	ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> <div style="text-align: center;">0.50</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> * * </div> <div style="text-align: center;">Control</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 0.33 0.25 </div> </div>	0.50	0.50
	<u>7.47± 0.31</u>	<u>7.72± 0.30</u>
		0.50
		<u>7.69± 0.53</u>
	0.33	0.33
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> <div style="text-align: center;">0.50</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> * * </div> <div style="text-align: center;">Alternativo</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 0.33 0.25 </div> </div>	<u>7.71± 0.18</u>	* <u>8.36± 0.14</u>
	0.25	0.25
	<u>7.85± 0.24</u>	* <u>8.12± 0.55</u>
	0.25	
	<u>7.79± 0.29</u>	

NOTA.- Para el caso de los valores subrayados no existe diferencia significativa.

Tabla VIII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de Chaetoceros sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 Control 0.33 0.25 </div>		0.50		0.50
		4270 \pm 890		3930 \pm 480
		0.33		0.33
		4180 \pm 480	*	4710 \pm 250
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 Alternativo 0.33 0.25 *** </div>		0.25		0.25
		3690 \pm 570	***	5880 \pm 250
	A			
	<hr/>			
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 Control 0.33 0.25 * *** </div>		0.50		0.50
		31 \pm 5.5		31 \pm 4.2
		0.33		0.33
		30 \pm 3.9	*	33 \pm 1.8
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 Alternativo 0.33 0.25 * </div>		0.25		0.25
		61 \pm 4.0	*	42 \pm 10.1
	B			
	<hr/>			

Tabla IX. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de Chaetoceros sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
	0.50	0.50	0.50		0.50	0.50	0.50
	Control	359.0 \pm 100.0	467.6 \pm 100.0		Control	95.0 \pm 12.3 *	180.3 \pm 37.4
	0.33	0.33	0.33		0.33	0.33	0.33
	0.25	294.6 \pm 118.0 *	549.3 \pm 55.1		0.25	99.0 \pm 28.2	114.0 \pm 9.2
		0.25	0.25			0.25	0.25
		265.6 \pm 13.7	363.0 \pm 68.7			76.6 \pm 18.0	106.6 \pm 18.6
A				B			
	0.50	0.50	0.50		0.50	0.50	0.50
	Control	141.3 \pm 63.4	190.0 \pm 10.1		Control	186.6 \pm 32.3 *	244.0 \pm 23.3
	0.33	0.33	0.33		0.33	0.33	0.33
	0.25	174.0 \pm 34.9	198.6 \pm 3.7		0.25	195.3 \pm 40.8	179.3 \pm 41.3
		0.25	0.25			0.25	0.25
		101.0 \pm 35.1	158.6 \pm 36.0			288.3 \pm 70.9	234.0 \pm 141.0
C				D			
	0.50	0.50	0.50		0.50	0.50	0.50
	Alternativo	265.6 \pm 13.7	363.0 \pm 68.7		Alternativo	76.6 \pm 18.0	106.6 \pm 18.6
	0.33	0.33	0.33		0.33	0.33	0.33
	0.25	294.6 \pm 118.0 *	549.3 \pm 55.1		0.25	99.0 \pm 28.2	114.0 \pm 9.2
		0.25	0.25			0.25	0.25
		265.6 \pm 13.7	363.0 \pm 68.7			76.6 \pm 18.0	106.6 \pm 18.6
A				B			
	0.50	0.50	0.50		0.50	0.50	0.50
	Alternativo	141.3 \pm 63.4	190.0 \pm 10.1		Alternativo	186.6 \pm 32.3 *	244.0 \pm 23.3
	0.33	0.33	0.33		0.33	0.33	0.33
	0.25	174.0 \pm 34.9	198.6 \pm 3.7		0.25	195.3 \pm 40.8	179.3 \pm 41.3
		0.25	0.25			0.25	0.25
		101.0 \pm 35.1	158.6 \pm 36.0			288.3 \pm 70.9	234.0 \pm 141.0
C				D			

el medio alternativo resultó en una concentración de carbohidratos significativamente mayor que las otras dos; entre medios hubo diferencia unicamente en la razón de 0.50 con una mayor cantidad para el medio alternativo. Para los lípidos, el unico caso en el cual se encontró una diferencia fue en el medio control entre las razones de 0.33 y 0.25, con mayor cantidad para la primera. Por último se notó una tendencia general al aumento de la cantidad de cenizas en razón inversa con la dilución, y se encontró que existen diferencias significativas con respecto a las cenizas entre los cultivos mantenidos en el medio control con una razón de dilución de 0.50 y 0.25 (mayor en la segunda) y en el medio alternativo con 0.50 y 0.33 (mayor en la primera).

III.1.2 Producción de Chaetoceros sp.

La producción promedio diaria por unidad productiva (carboy) se presenta en la figura 6 como peso seco total libre de cenizas (materia orgánica), por medio de cultivo y para las tres razones de dilución. En lo que respecta al peso seco total no hubo diferencia significativa entre los medios; entre las razones de dilución hubo diferencias entre 0.50 y 0.33 para el medio control, y entre todas las diluciones del medio alternativo, con una cosecha mayor para la razón de 0.50 (medio control) y para las razones de 0.50 y 0.25 respectivamente (medio alternativo) (Tabla X). Como

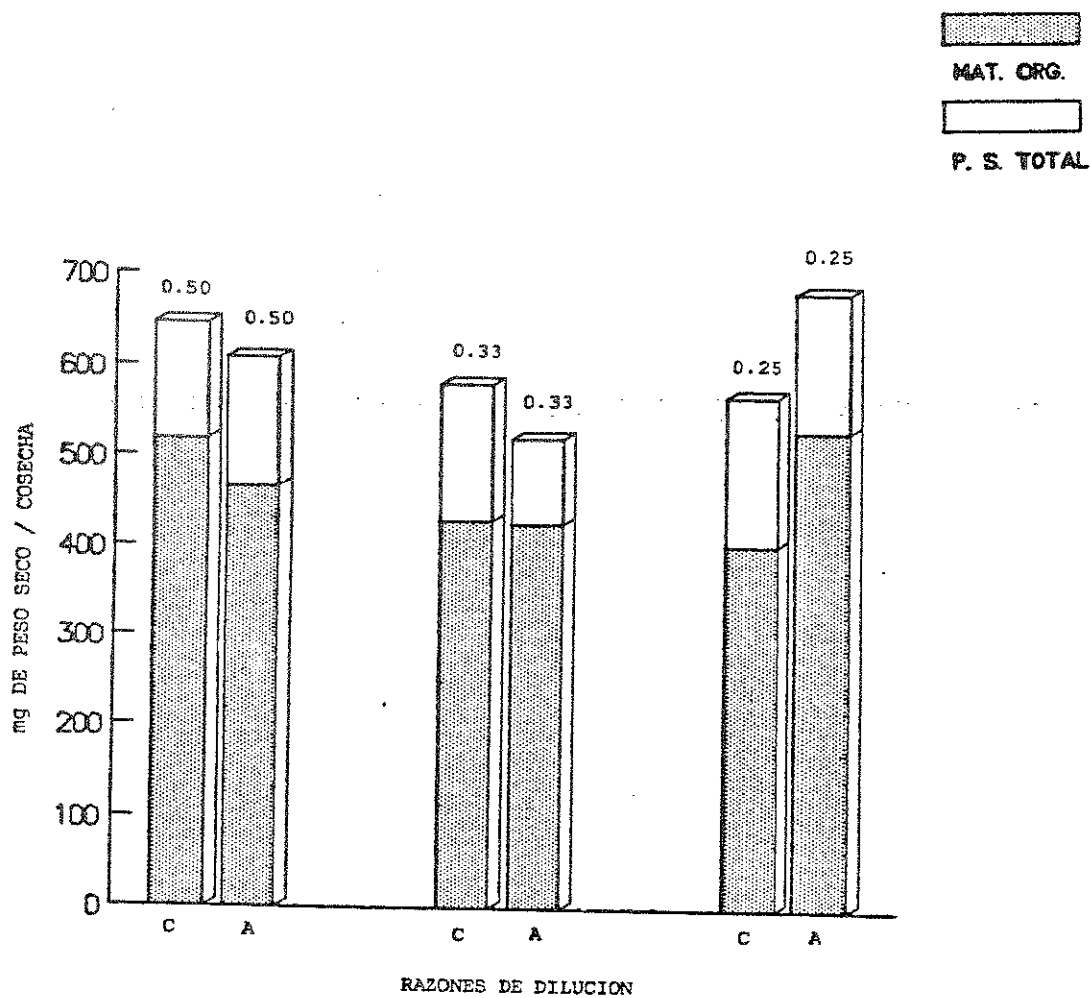


Figura 6. Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT. ORG.) por cosecha de unidad productiva de Chaetoceros sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

Tabla X. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de Chaetoceros sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO		
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 * Control 0.33 0.25 </div>		0.50	646.2 \pm	62.9	609.0 \pm	
		0.33			39.7	
		0.25	579.0 \pm	78.5	519.0 \pm	31.7
		0.25	563.7 \pm	123.0	679.0 \pm	101.0
A						
		CONTROL		ALTERNATIVO		
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.50 * Alternativo 0.33 0.25 * </div>		0.50	518.0 \pm	34.6 *	465.7 \pm	
		0.33			34.6	
		0.25	427.2 \pm	58.9	424.0 \pm	31.2
		0.25	400.2 \pm	92.6 *	525.5 \pm	31.9
B						

materia orgánica se comprobaron las siguientes diferencias: entre los medios, para las razones de 0.50 y 0.25 con valores más altos en el control en el primer caso y en el alternativo en el segundo; entre las razones de dilución, se obtuvo una producción mayor a la dilución de 0.50 en el caso del medio control, y de 0.25 para el medio alternativo (Tabla X).

El material orgánico, separado en proteínas, carbohidratos y lípidos y reportado como miligramos cosechados por medio de cultivo a las tres razones de dilución se presenta en la figura 7. Entre los medios, se determinó que hubo una mayor producción de proteínas a la dilución de 0.33 en el medio alternativo. Entre las razones de dilución sólo hubo una diferencia entre 0.33 y 0.25 en el medio alternativo, con una mayor cantidad para el primero. Por lo que se refiere a carbohidratos, entre los medios hubo diferencias para las razones de 0.50 y 0.25 (mayor en ambos casos para el medio alternativo) y entre las razones de dilución la producción fue más alta para la dilución 0.50 del control y 0.50 y 0.25 para el alternativo. Finalmente para lípidos hubo diferencia entre los medios a la razón de 0.25 (mayor en el medio alternativo), y entre las razones de dilución para 0.50 y 0.25 del control, siendo superior la razón de 0.50 (Tabla XI).

III.2 Cultivo semicontinuo de Tetraselmis sp.

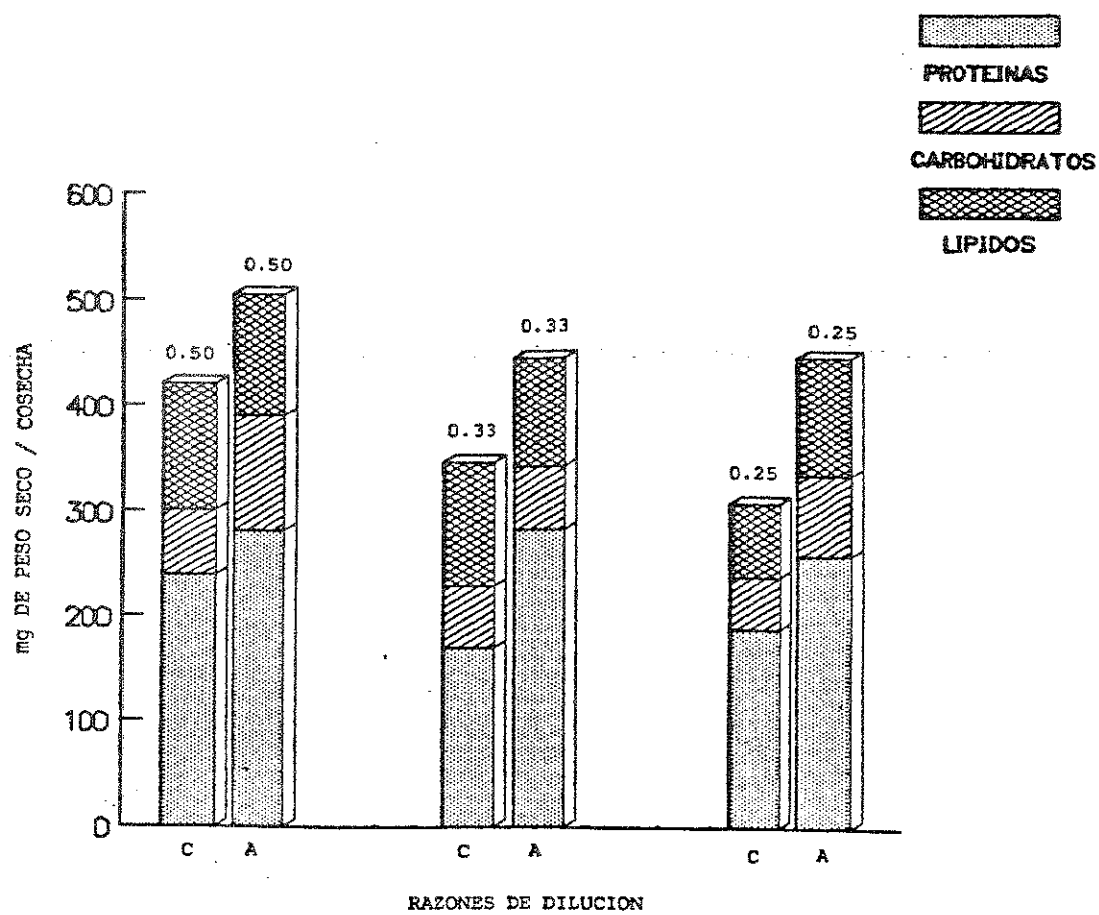


Figura 7. Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de *Chaetoceros* sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

Tabla XI. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de Chaetoceros sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

Control		ALTERNATIVO		Control		ALTERNATIVO	
0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
0.33	0.25	0.33	0.33	0.33	0.25	0.33	0.33
239.6 \pm 46.9	281.3 \pm 49.1	170.0 \pm 36.5	** 282.6 \pm 14.2	61.6 \pm 5.7	* 109.6 \pm 25.1	58.0 \pm 4.3	59.0 \pm 1.0
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
187.6 \pm 46.5	256.3 \pm 13.1	48.6 \pm 9.0		* 75.6 \pm 8.1			

A

B

Control		ALTERNATIVO	
0.40	0.40	0.40	0.40
0.30	0.25	0.30	0.30
157.0 \pm 26.3	155.0 \pm 26.0	151.7 \pm 28.9	183.2 \pm 64.3
0.25	0.25	0.25	0.25
158.5 \pm 26.5	147.7 \pm 31.1		

C

Antes de dar inicio al proceso de dilución regular, el cultivo se llevó a la máxima biomasa, y durante ese tiempo se determinó una μ max. de 2.04 generaciones por día para el medio control y de 1.60 generaciones por día para el medio alternativo. Por los mismos motivos que para la especie anterior, se decidió establecer una razón de dilución diaria máxima de 0.50, que resultó ser demasiado alta ya que la biomasa descendió progresivamente con el tiempo. Por este motivo se cambió a $0.40 \times \text{día}^{-1}$ y se fijaron las dos diluciones inferiores en 0.30 y $0.25 \times \text{día}^{-1}$.

El cultivo se mantuvo moderadamente estable por 20 días, con μ promedio de 0.77, 0.65 y 0.47 para el medio control y de 0.88, 0.67 y 0.43 para el medio alternativo, para las razones de dilución de 0.40, 0.30 y 0.25, respectivamente. Como en el caso anterior, la estabilidad relativa de biomasa con respecto al tiempo se verificó con una prueba del coeficiente Beta (Tabla XII).

En las figuras 8 y 9 se exhiben los cambios de biomasa del cultivo de Tetraselmis sp. en medio control y alternativo a las tres razones de dilución por un periodo de 20 días.

Utilizando una prueba de análisis de varianza de dos

Tabla XII. Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de Tetraselmis sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

VARIABLE		RELACION		
CULTIVO	DILUCION	F	G.L.	DECISION
C	0.40	0.203	9	ACEPTA
C	0.30	-0.053	9	ACEPTA
C	0.25	0.006	9	ACEPTA
C	0.25	0.021	9	ACEPTA
A	0.40	-0.040	9	ACEPTA
A	0.30	0.015	9	ACEPTA
A	0.25	-0.007	9	ACEPTA
A	0.25	-0.019	9	ACEPTA

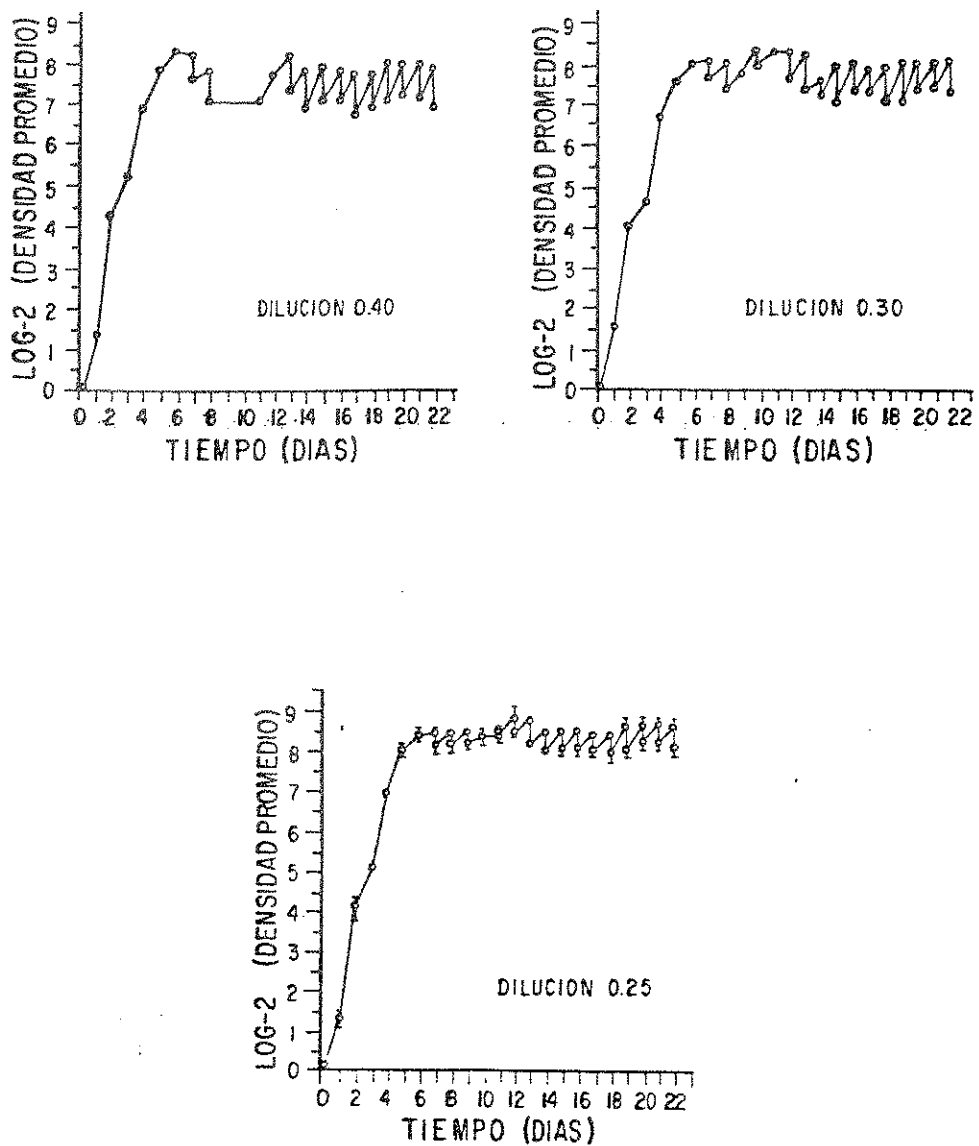


Figura 8. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de *Tetraselmis* sp. en el medio control a las tres razones de dilución.

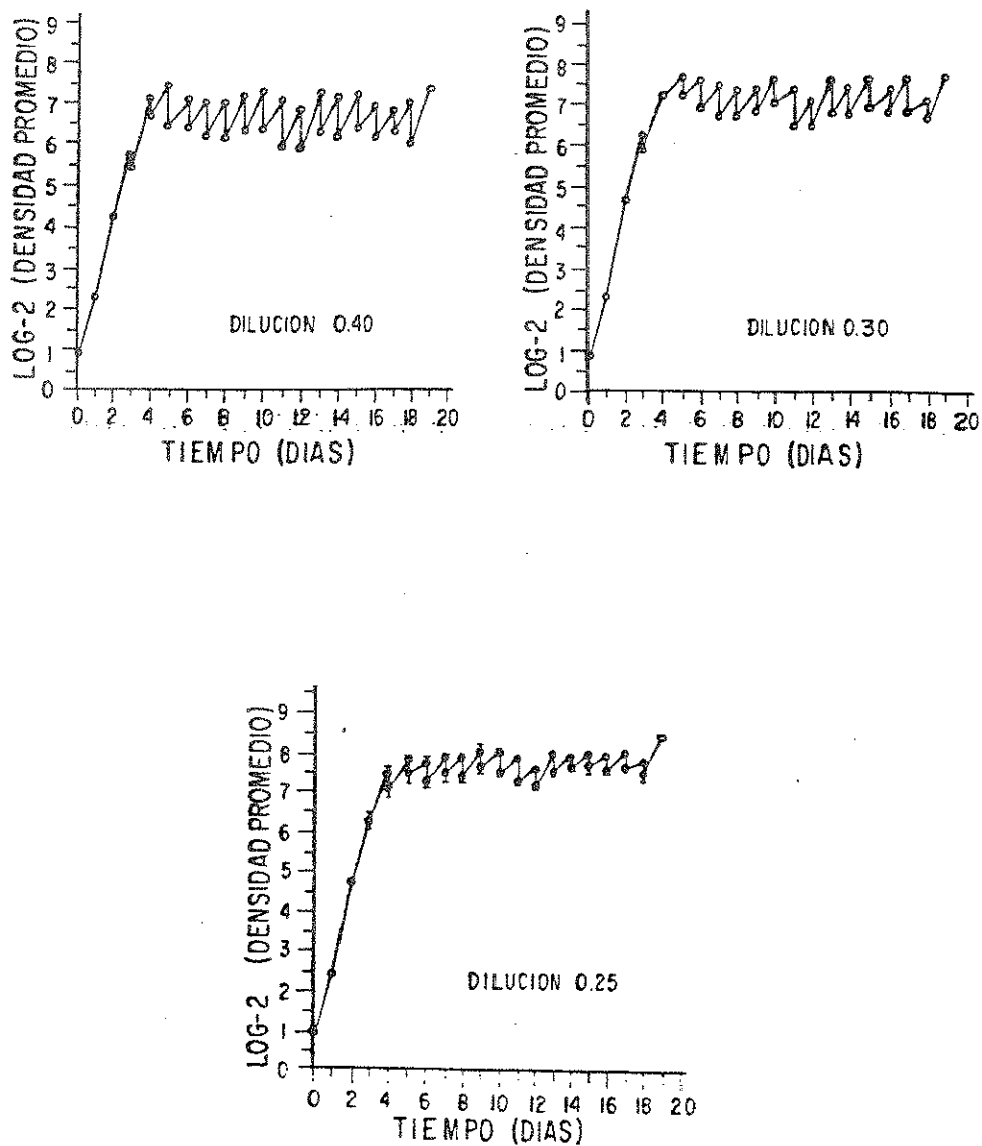


Figura 9. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Tetraselmis sp. en el medio alternativo a las tres razones de dilución.

vías se encontró que habían diferencias significativas al considerar el medio y la razón de dilución (Tabla XIII) y con una prueba de SNK se individuaron diferencias entre todas las razones de dilución incluyendo a las repeticiones. Al comparar entre los medios se detectaron diferencias en las tres razones de dilución (Tabla XIV).

Las biomásas promedio, indicadas como número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ difieren significativamente entre las razones de dilución. Al cotejar entre los dos medios, hubo diferencias en las razones de 0.30 y 0.25 (mayor en el medio control en ambos casos) (Tabla XV).

La biomasa celular promedio (μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células) tiende a disminuir de manera inversa con la razón de dilución y difiere significativamente entre todas las razones de dilución sólo en el medio control. Al comparar entre los medios la biomasa celular promedio resultó significativamente mayor en el medio alternativo para la razón de 0.40 (Tabla XV).

III.2.1 Composición proximal de las células

Las concentraciones relativas de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas se muestran en la figura 10 para los dos medios y las tres razones de dilución.

Tabla XIII. Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de Tetraselmis sp.

VARIABLE	VALOR DE F	SIGNIFICANCIA α
DILUCION	48.385	***
MEDIO	236.620	***

Tabla XIV. Tetraselmis sp.: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL		ALTERNATIVO
	0.40		0.40
	7.79± 0.29	*	7.11± 0.14
	0.30		0.30
	8.04± 0.21	*	7.56± 0.18
	0.25		0.25
	8.52± 0.16	*	7.67± 0.17
	0.25		0.25
	8.16± 0.16	*	7.52± 0.29

Tabla XV. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de Tetraselmis sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 ** *** Control 0.30 0.25 *** </div>	0.40	785 \pm 97		678 \pm 65
	0.30	10911 \pm 86	**	849 \pm 54
	0.25	1473 \pm 43	***	984 \pm 115
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 * ** Alternativo 0.30 0.25 * </div>	0.40			
	0.30			
	0.25			

A

		CONTROL		ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 ** *** Control 0.30 0.25 * </div>	0.40	276.7 \pm 12.7	*	231.7 \pm 24.6
	0.30	235.5 \pm 16.0		237.0 \pm 23.1
	0.25	217.2 \pm 10.1		231.2 \pm 38.8
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 Alternativo 0.30 0.25 </div>	0.40			
	0.30			
	0.25			

B

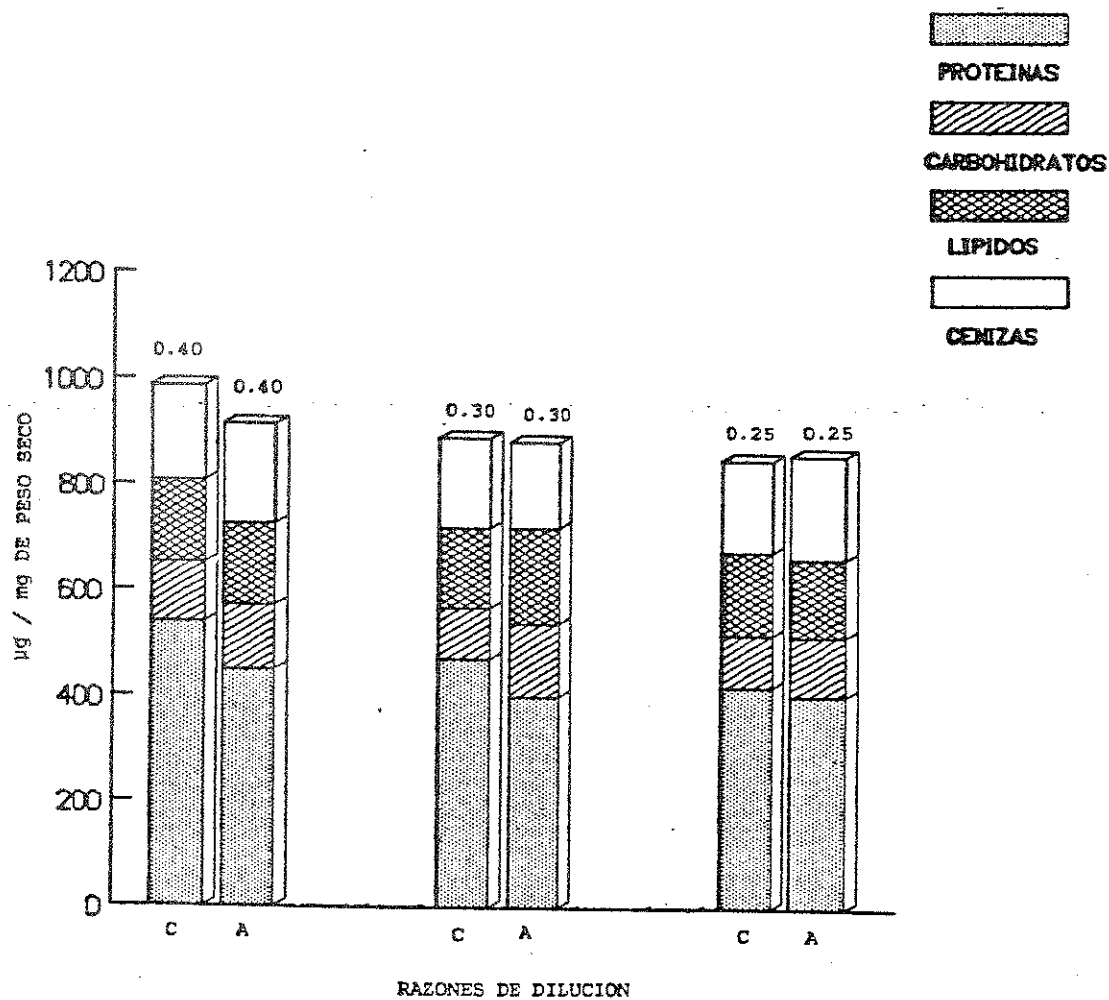


Figura 10. Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de Tetraselmis sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

Por lo que respecta al contenido de proteínas, no se encontraron diferencias entre los medios; entre las razones de dilución se comprobó una diferencia sólo entre las razones de 0.40 y 0.25 del medio control (mayor en la primera). En el caso de los carbohidratos, se encontró una diferencia entre los medios para la razón de 0.30 (mayor en el medio alternativo) y otra entre las razones de dilución del mismo medio alternativo, con un porcentaje mayor en la dilución de 0.30 que en 0.25. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en los contenidos de lípidos y de cenizas (Tabla XVI).

III.2.2 Producción de Tetraselmis sp.

La producción promedio diaria por unidad productiva se muestra en la figura 11 como miligramos de peso seco total y de materia orgánica cosechados por medio de cultivo y por cada razón de dilución. Se detectaron diferencias significativas entre medios, tanto en peso seco total, como en material orgánico, para todas las razones de dilución (mayores cosechas en el medio control). Al comparar entre las razones de dilución, no hubo diferencias en el peso seco total, pero se comprobaron las siguientes en el caso de la materia orgánica: en el medio control se obtuvo una producción mayor con la dilución de 0.25 que con la de 0.30,

Tabla XVI. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de tetraselmis sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
	0.40	0.40	0.40		0.40	0.40	0.40
	Control	538.7 \pm 69.7	448.5 \pm 90.7		113.5 \pm 14.8	122.7 \pm 10.9	
	0.30	0.30	0.30		0.30	0.30	
	0.25	471.0 \pm 71.0	400.2 \pm 37.2		96.0 \pm 13.3 *	136.0 \pm 19.0	
		0.25	0.25			0.25	0.25
		419.0 \pm 88.7	404.7 \pm 54.0			99.0 \pm 19.1	111.2 \pm 7.4
A				B			
		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
	0.50	0.50	0.50		0.40	0.40	0.40
	Control	120.3 \pm 25.2	115.6 \pm 12.1		178.2 \pm 17.5	189.7 \pm 80.1	
	0.33	0.33	0.33		0.30	0.30	
	0.25	117.6 \pm 47.5	102.6 \pm 7.0		171.0 \pm 30.7	161.7 \pm 21.9	
		0.25	0.25			0.25	0.25
		69.3 \pm 17.0 *	111.3 \pm 4.9			173.0 \pm 19.5	196.5 \pm 56.2
C				D			
	0.40	0.40	0.40		0.40	0.40	0.40
	Alternativo	538.7 \pm 69.7	448.5 \pm 90.7		113.5 \pm 14.8	122.7 \pm 10.9	
	0.30	0.30	0.30		0.30	0.30	
	0.25	471.0 \pm 71.0	400.2 \pm 37.2		96.0 \pm 13.3 *	136.0 \pm 19.0	
		0.25	0.25			0.25	0.25
		419.0 \pm 88.7	404.7 \pm 54.0			99.0 \pm 19.1	111.2 \pm 7.4
A				B			
		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
	0.50	0.50	0.50		0.40	0.40	0.40
	Control	120.3 \pm 25.2	115.6 \pm 12.1		178.2 \pm 17.5	189.7 \pm 80.1	
	0.33	0.33	0.33		0.30	0.30	
	0.25	117.6 \pm 47.5	102.6 \pm 7.0		171.0 \pm 30.7	161.7 \pm 21.9	
		0.25	0.25			0.25	0.25
		69.3 \pm 17.0 *	111.3 \pm 4.9			173.0 \pm 19.5	196.5 \pm 56.2
C				D			

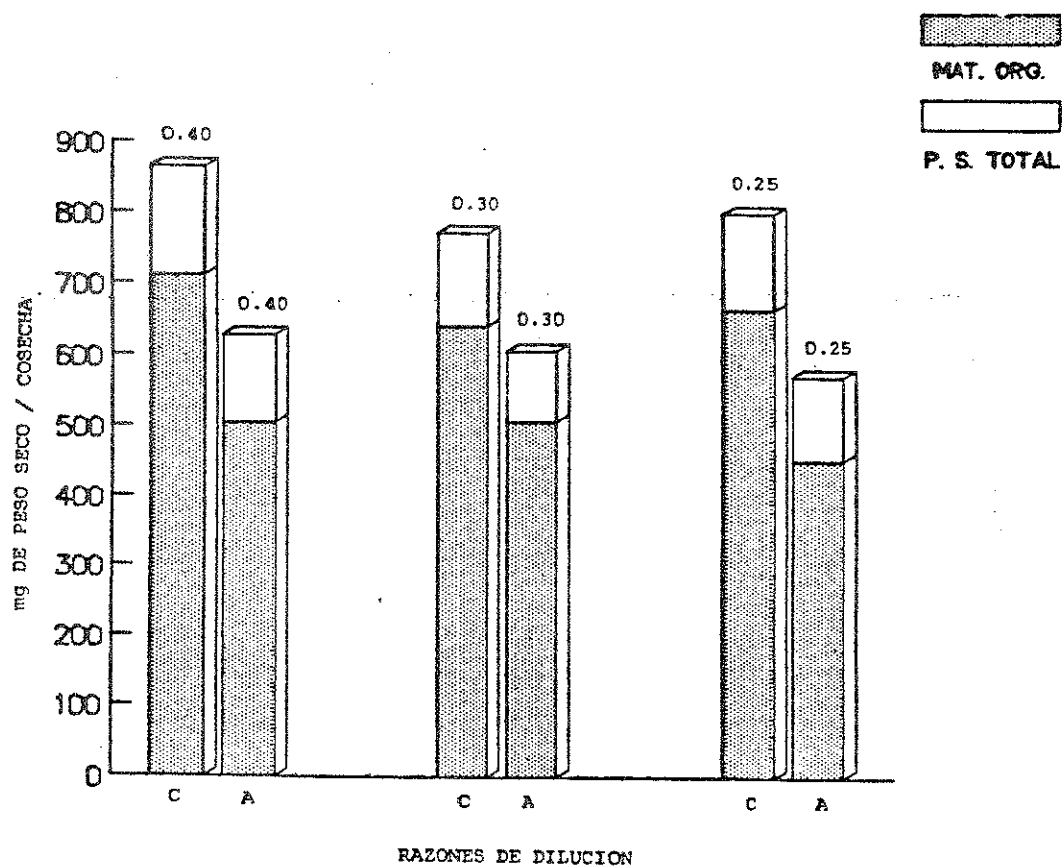


Figura 11. Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT. ORG.) por cosecha de unidad productiva de *Tetraselmis* sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

y en el medio alternativo la cosecha de materia orgánica fue mayor en las diluciones de 0.40 y 0.30, que en la de 0.25 (Tabla XVII).

El material orgánico cosechado, dividido en proteínas, carbohidratos y lípidos en los dos medios y a las tres razones de dilución se presenta en la figura 12. La cosecha de proteínas resultó mayor en el medio control, para todas las razones de dilución. Al comparar entre éstas, se obtuvieron mayores cosechas a la razón de 0.40 en ambos medios. Para los carbohidratos hubo diferencias entre medios a las razones de 0.40 y 0.25 (mayor en el medio control). Al comparar razones de dilución, la cosecha fue mayor a la razón de 0.40 en el medio control y a las dos diluciones superiores en el alternativo. Por último, en la cosecha de lípidos se encontraron diferencias entre los medios a las razones de 0.40 y 0.25 (mayor en el medio control), y entre las razones de 0.40 y 0.25 del medio alternativo, con más lípidos cosechados a la razón de 0.40 (Tabla XVIII).

III.3 Cultivo semicontinuo de Phaeodactylum tricornutum

Durante el período de crecimiento exponencial de los cultivos se determinó que la μ max. de esta microalga fue de 2.5 generaciones \times día⁻¹ para el medio control y de 2.06 generaciones \times día⁻¹ para el medio alternativo. En

Tabla XVII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de Tetraselmis sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.

	CONTROL		ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 Control 0.30 0.25 </div>	0.40		0.40
	864.0 \pm 82.9	**	626.0 \pm 90.2
	0.30		0.30
	768.7 \pm 24.5	***	602.2 \pm 41.5
	0.25		0.25
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 Alternativo 0.30 0.25 </div>	796.5 \pm 17.9	*	565.5 \pm 81.5

A

	CONTROL		ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 Control 0.30 0.25 *** </div>	0.40		0.40
	710.0 \pm 68.1	**	502.5 \pm 37.3
	0.30		0.30
	637.0 \pm 3.3	**	504.5 \pm 26.6
	0.25		0.25
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 Alternativo 0.30 0.25 * </div>	658.7 \pm 3.1	**	447.7 \pm 32.8

B

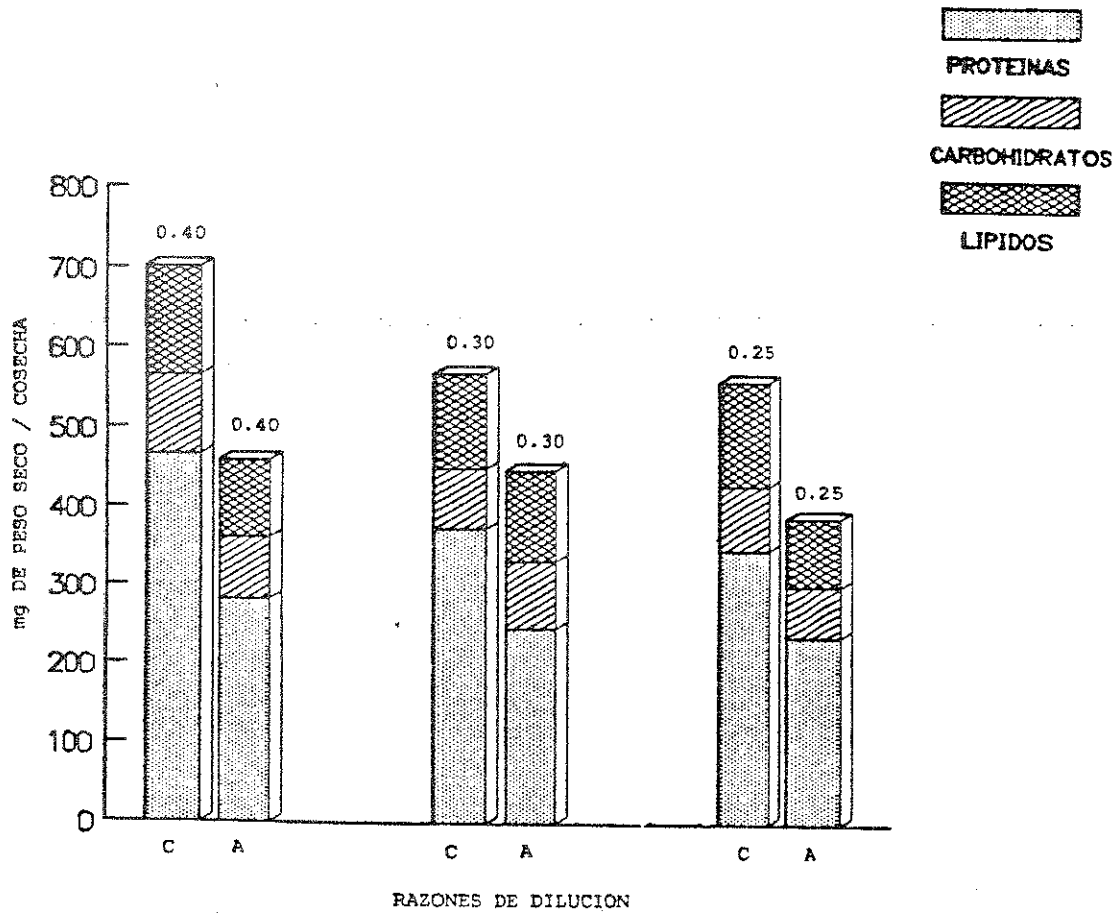
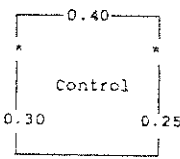
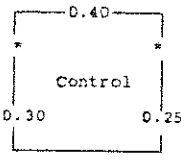

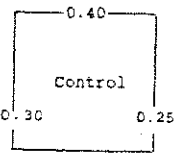
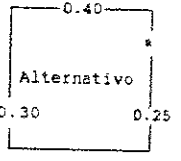


Figura 12. Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de Tetraselmis sp. en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

Tabla XVIII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de Tetraselmis sp. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO				CONTROL		ALTERNATIVO	
	0.40	0.40	0.40		0.40	0.40	0.40	0.40			
	466.2 \pm 71.4 *	282.2 \pm 15.4	98.5 \pm 14.9 *		78.5 \pm 11.1						
	0.30	0.30	0.30		0.30						
	371.5 \pm 48.8 *	244.0 \pm 12.6	75.7 \pm 9.1	84.7 \pm 15.3							
	0.25	0.25	0.25	0.25							
	344.2 \pm 58.5 *	234.0 \pm 6.4	80.5 \pm 12.1 *	64.0 \pm 5.6							
		A				B					

		CONTROL		ALTERNATIVO	
	0.40	0.40	0.40	0.40	
	136.2 \pm 25.7 *	98.0 \pm 6.0			
	0.30	0.30			
	118.2 \pm 17.5	115.0 \pm 47.6			
	0.25	0.25			
	130.7 \pm 17.0 **	86.5 \pm 9.5			
		C			

consecuencia se inició con una D_{max} de $0.75 \times \text{día}^{-1}$. Al experimentar esta dilución con el medio control se vió que la biomasa se recuperaba, pero la cosecha resultaba baja. Por este motivo se utilizó una dilución ligeramente inferior ($0.70 \times \text{día}^{-1}$) para el medio alternativo. En ambos casos, las razones inferiores fueron de 0.60 y $0.50 \times \text{día}^{-1}$.

Los cultivos se estabilizaron por un lapso aproximado de 10 días, con μ promedio de 1.95, 1.40 y 1.19 para el medio control y de 1.46, 1.13 y 1.06 para el medio alternativo para las razones de dilución antes mencionadas. Con la prueba de Beta se corroboró que la biomasa no varió con respecto al tiempo (Tabla XIX).

En las figuras 13 y 14 se muestra el desarrollo de los cultivos de Phaeodactylum tricornutum en ambos medios a las cuatro razones de dilución, por un lapso de 15 días.

Con un ANOVA de dos vías se comprobó la existencia de algunas diferencias significativas por medio y/o por razón de dilución (Tabla XX). Tales diferencias se individuaron utilizando la prueba de SNK (Tabla XXI), a través de la cual se demostró que no existen diferencias entre los medios, al comparar las mismas razones de dilución, y que se obtuvieron valores significativamente más altos a menores razones de dilución. Al comparar las repeticiones, no hubo diferencias.

Tabla XIX. Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de Phaeodactylum tricornutum en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

VARIABLE		RELACION		
CULTIVO	DILUCION	F	G.L.	DECISION
C	0.75	0.136	9	ACEPTA
C	0.60	0.175	9	ACEPTA
C	0.50	-0.384	9	ACEPTA
C	0.50	0.247	9	ACEPTA
A	0.70	-0.392	9	ACEPTA
A	0.60	-0.337	9	ACEPTA
A	0.60	1.139	9	ACEPTA
A	0.50	0.215	9	ACEPTA

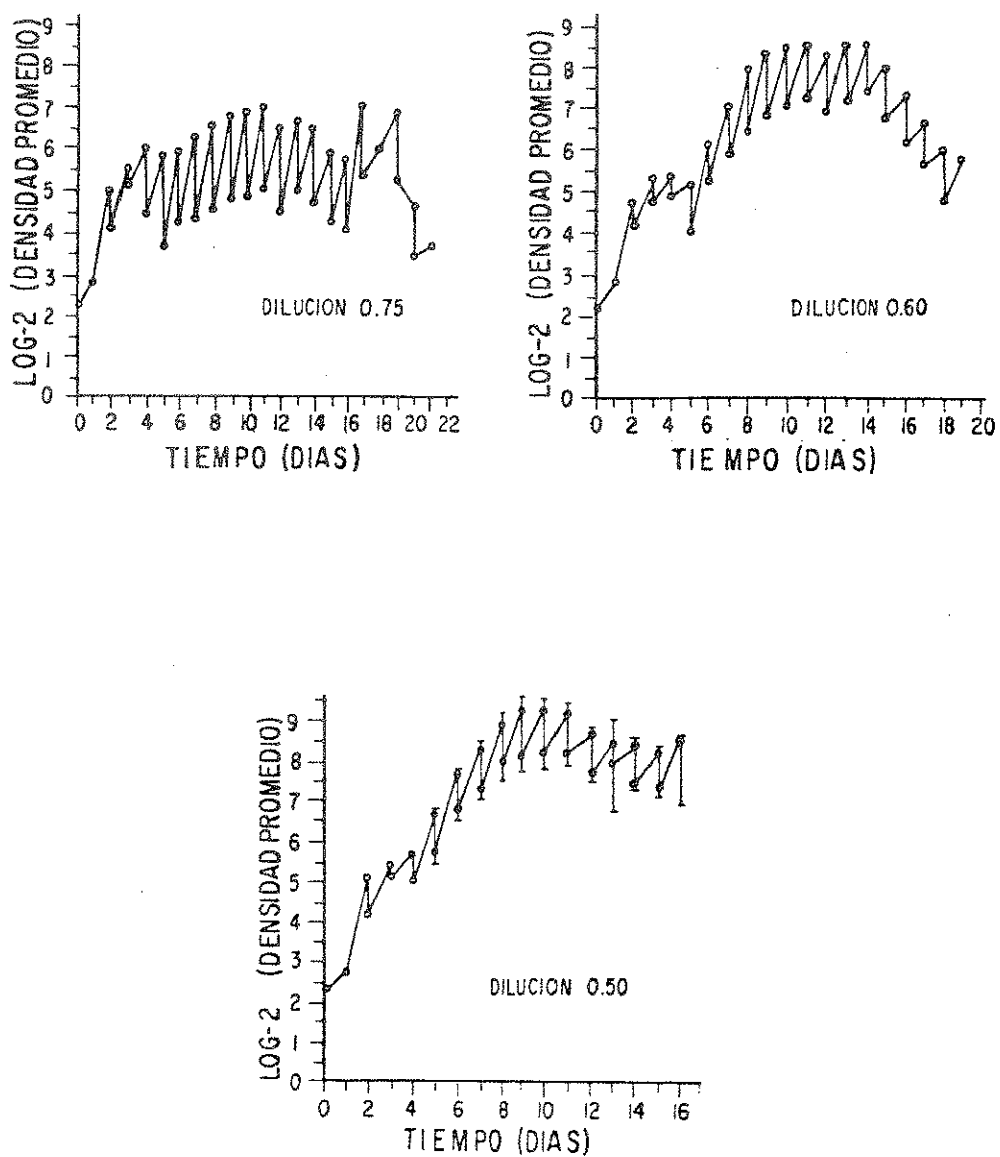


Figura 13. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Phaeodactylum tricornutum en el medio control a las tres razones de dilución.

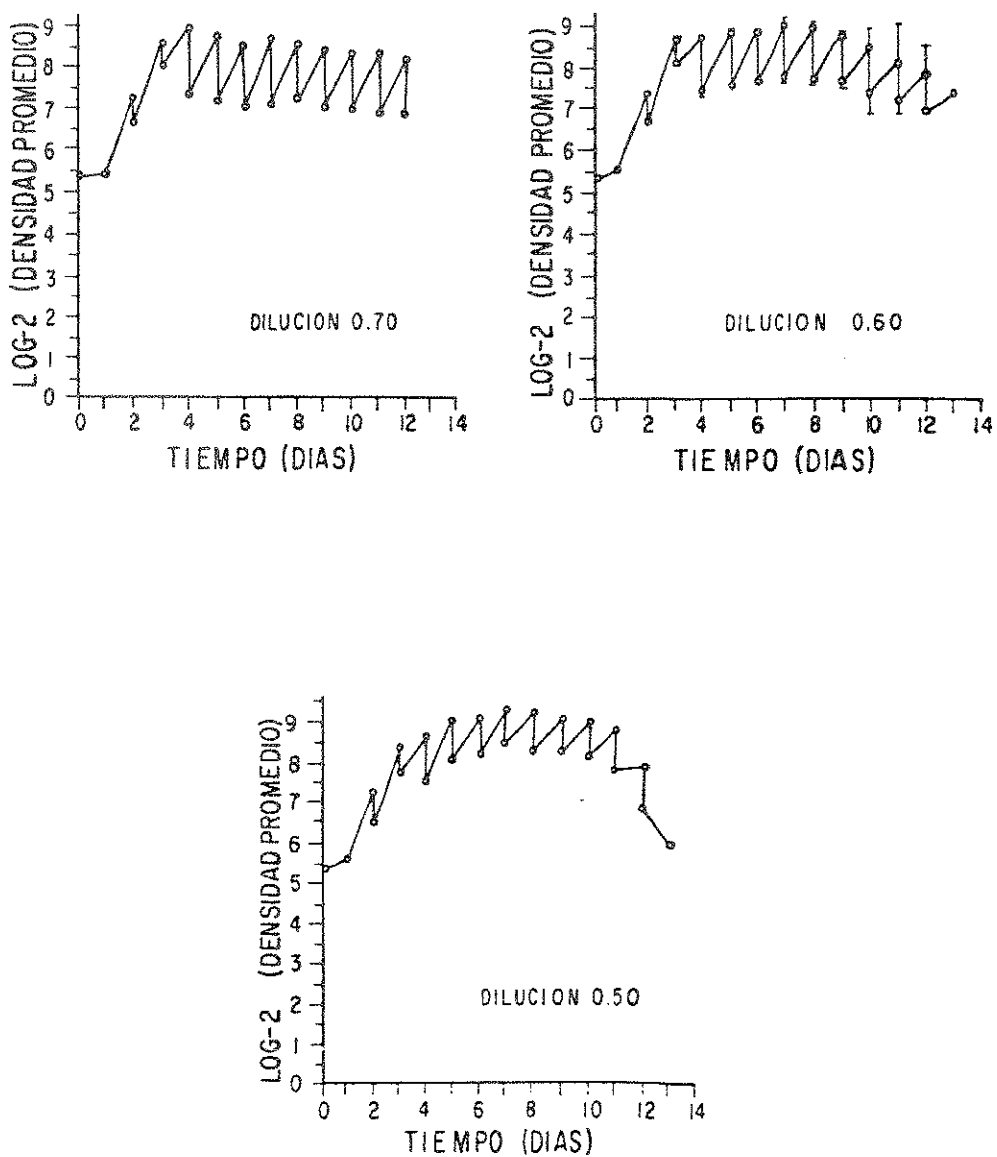


Figura 14. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Phaeodactylum tricornutum en el medio alternativo a las tres razones de dilución.

Tabla XX. Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de Phaeodactylum tricornutum.

VARIABLE	VALOR DE F	SIGNIFICANCIA
DILUCION	9.277	* * *
MEDIO	8.584	* *

Tabla XXI. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL	ALTERNATIVO
0.75	0.75	
* * *	6.84 ± 0.43	
Control		0.70
0.60		8.68 ± 0.23
0.50		0.60
*	0.60	0.60
	8.41 ± 0.70	8.79 ± 0.46
		0.60
		8.42 ± 0.99
	0.50	0.50
	9.01 ± 0.51	8.70 ± 0.65
	0.50	
	8.69 ± 0.98	

El número promedio de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ obtenido con los dos medios a las mismas razones de dilución no resultó diferente, aunque se detectó en ambos medios una tendencia al aumento en razón inversa con la tasa de dilución (Tabla XXII).

La biomasa celular promedio (μg peso seco $\times 10^{-6}$ células) no difiere entre medios ni entre razones de dilución (Tabla XXII).

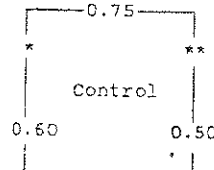
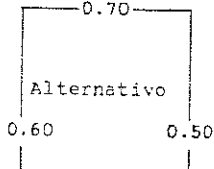
III.3.1 Composición proximal de las células

Las concentraciones relativas de los constituyentes celulares mayores: proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas se muestran en la figura 15. No se detectaron diferencias significativas para ninguno de estos, ni entre los medios, a las razones de dilución comparables (0.60 y 0.50), ni entre razones de dilución para el mismo medio (Tabla XXIII).

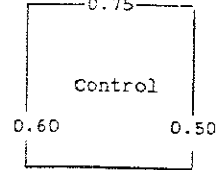
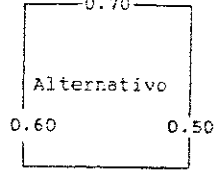
III.3.2 Producción de Phaeodactylum tricornutum

La producción promedio diaria por cada una de las unidades productivas, como miligramos de peso seco tanto total como de material orgánico, se visualiza en la figura

Tabla XXII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de Phaeodactylum tricornutum. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL	ALTERNATIVO
	0.75 2912 \pm 746	0.70 5185 \pm 1138
	0.60 6453 \pm 3011	0.60 5755 \pm 1342
	0.50 6863 \pm 1672	0.50 5789 \pm 1377

A

	CONTROL	ALTERNATIVO
	0.75 20.6 \pm 5.4	0.70 20.9 \pm 3.4
	0.60 18.1 \pm 7.0	0.60 19.2 \pm 2.4
	0.50 17.8 \pm 3.1	0.50 19.9 \pm 3.9

B

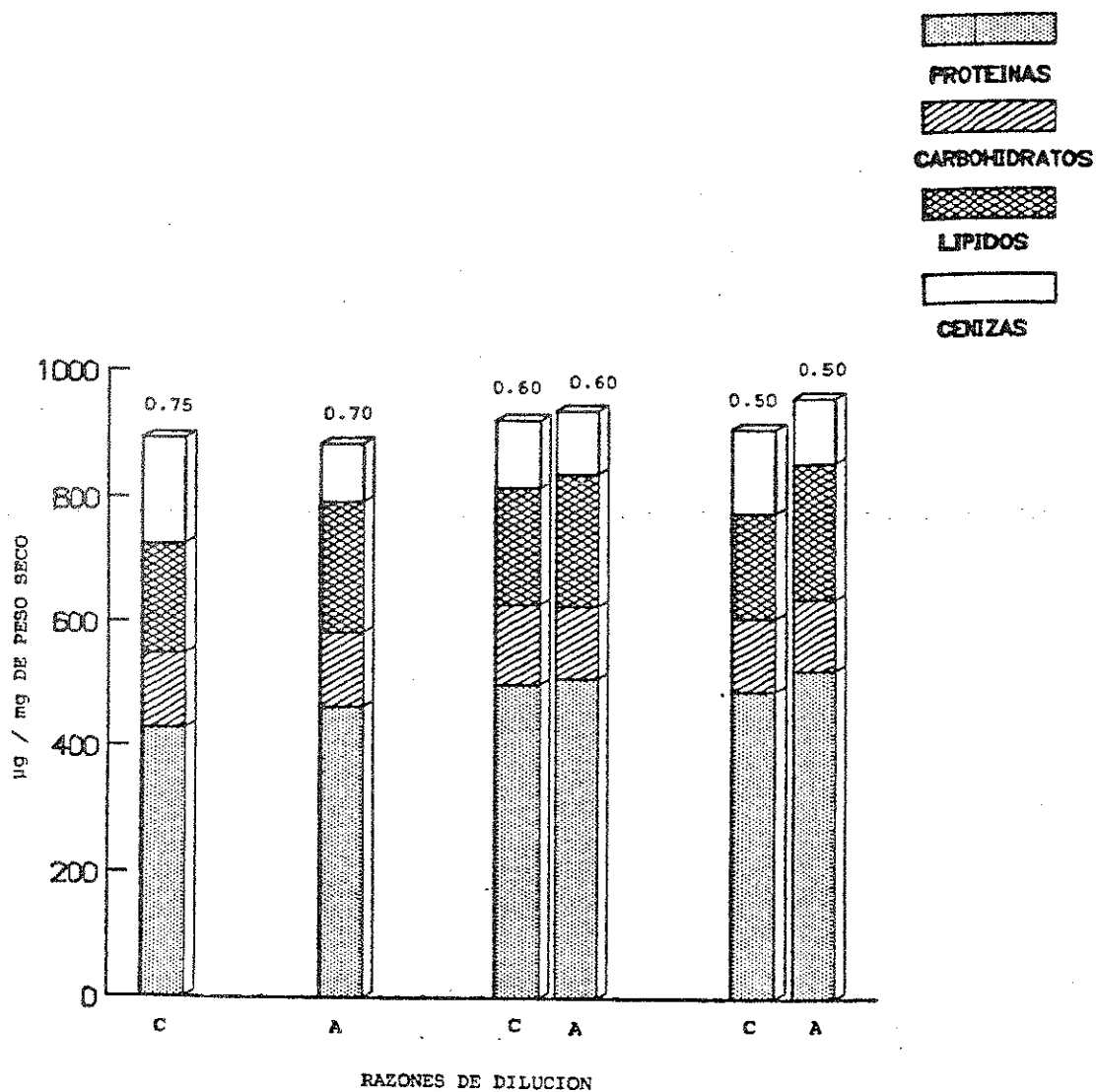


Figura 15. Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de *Phaeodactylum tricornutum* en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

Tabla XXIII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa como μg de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y cenizas (D) de Phaeodactylum tri-cornutum. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.75 Control 0.60 0.50 </div>	0.75	427.2 \pm 57.2		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.75 Control 0.60 0.50 </div>	0.75	121.7 \pm 6.1	
	0.60		0.70		0.60	0.60	
			461.5 \pm 46.5				121.5 \pm 12.1
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.70 Alternativo 0.60 0.50 </div>	0.60	498.2 \pm 103.0	508.5 \pm 36.8	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.70 Alternativo 0.60 0.50 </div>	0.60	130.5 \pm 21.1	117.0 \pm 9.1
	0.50	488.7 \pm 58.9	523.2 \pm 68.6		0.50	0.50	118.2 \pm 13.7
		A				B	
		CONTROL	ALTERNATIVO			CONTROL	ALTERNATIVO
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.75 Control 0.60 0.50 </div>	0.75	175.2 \pm 47.0		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.75 Control 0.60 0.50 </div>	0.75	168.0 \pm 72.6	
	0.60		0.70		0.60	0.60	
			208.2 \pm 60.6				92.2 \pm 8.1
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.70 Alternativo 0.60 0.50 </div>	0.60	184.7 \pm 49.6	210.5 \pm 33.4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.70 Alternativo 0.60 0.50 </div>	0.60	106.0 \pm 78.7	98.7 \pm 6.2
	0.50	167.7 \pm 45.4	215.0 \pm 13.3		0.50	0.50	133.0 \pm 50.5
		C				D	

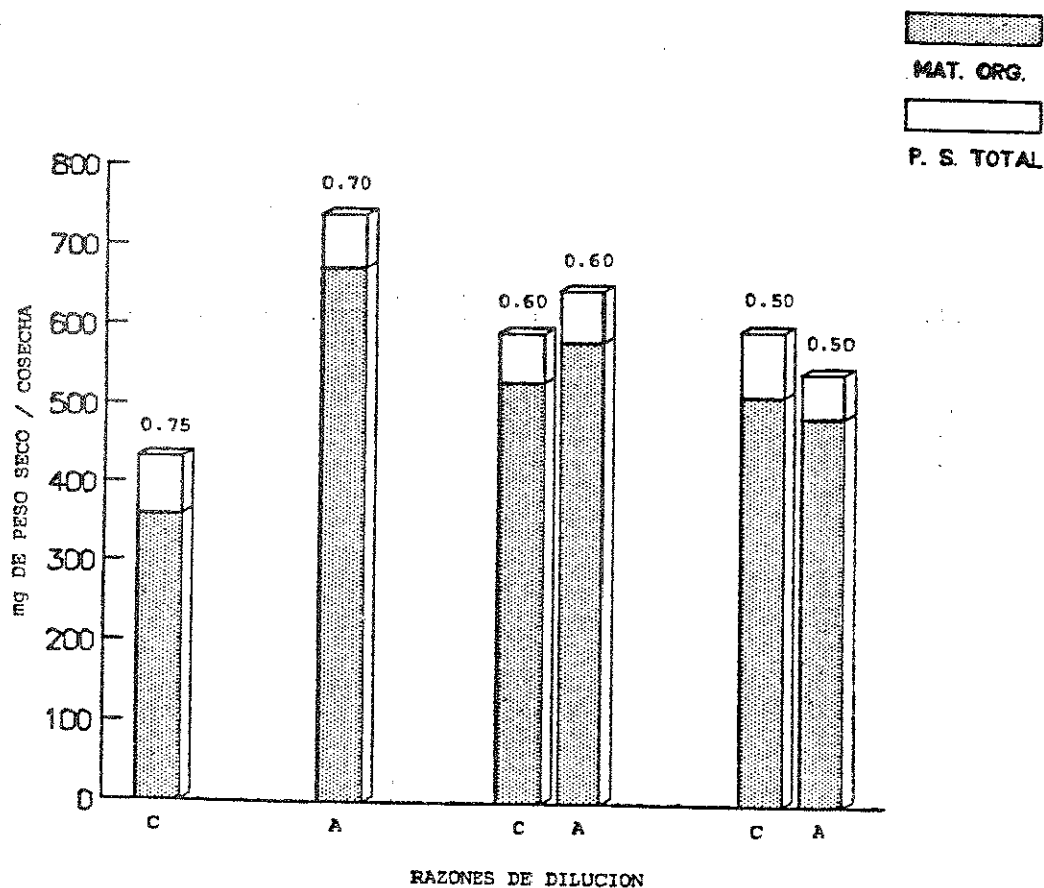


Figura 16. Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT. ORG.) por cosecha de unidad productiva de Phaeodactylum tricornutum en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

16. Para ninguno de los dos se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo comparando las mismas razones de dilución, pero en el medio control hubo diferencia en la producción total entre las razones de 0.75 y 0.50, con una mayor cosecha para esta última; en el medio alternativo se encontró también una tendencia al aumento, con diferencias significativas, en razón directa con la tasa de dilución (Tabla XXIV).

La producción de proteínas, carbohidratos y lípidos por medio de cultivo y a las cuatro razones de dilución se representa en la figura 17. Comparando entre los medios, no se encontraron diferencias significativas. Para las proteínas, se comprobó una mayor cosecha a la razón de 0.50 que a la de 0.75, en el caso del medio control. También se encontraron diferencias en la producción de carbohidratos a diferentes razones de dilución, sea para el medio alternativo (mayor para la razón de 0.70 que para las otras dos) que para el medio control (producción mínima para la dilución mayor). Para finalizar, no hubo diferencia en la producción de lípidos ni entre los medios ni entre las razones de dilución (Tabla XXV).

III.4 Cultivo semicontinuo de Pavlova lutheri

En los inicios del experimento se midió el crecimiento

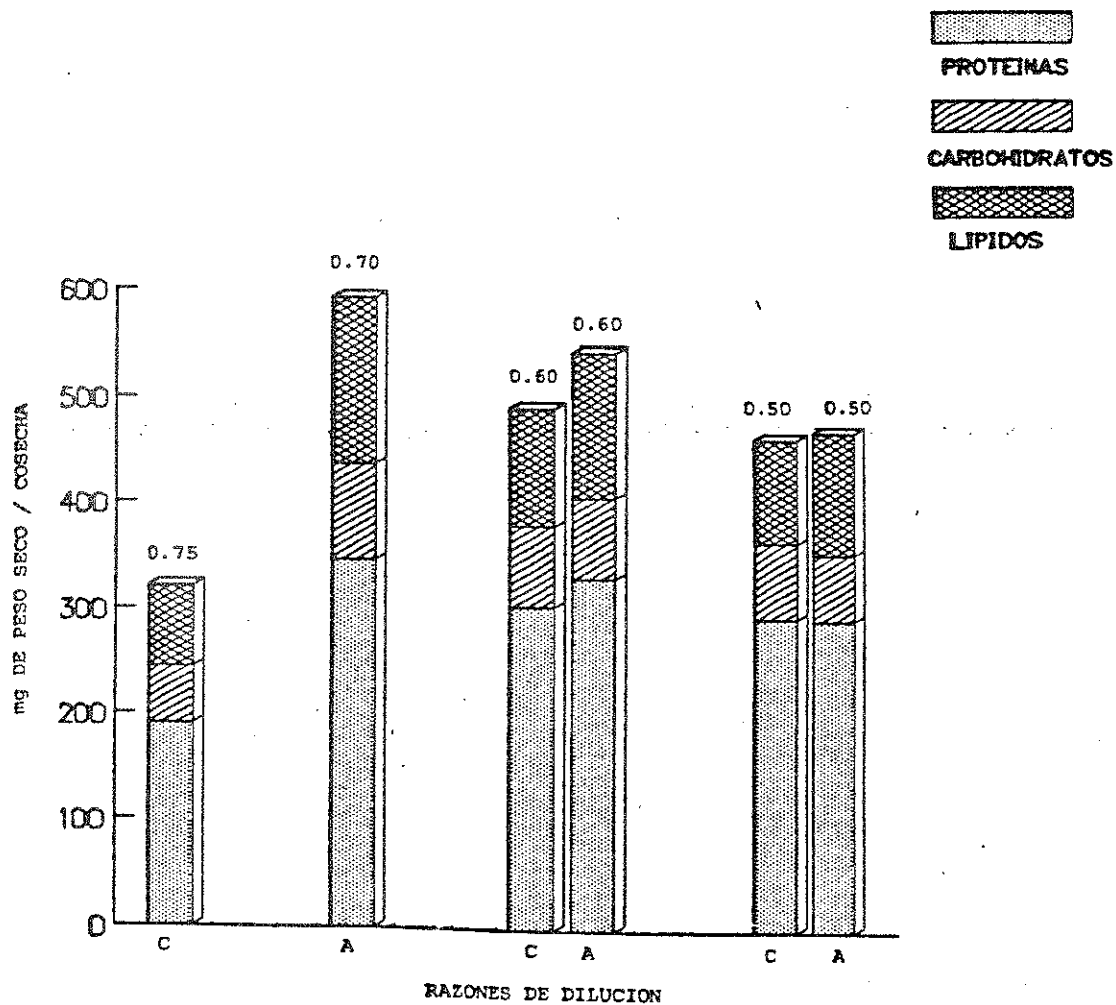
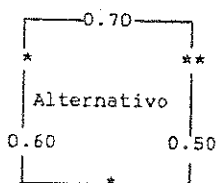
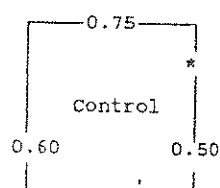


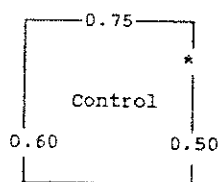
Figura 17. Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de *Phaeodactylum tricornutum* en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

Tabla XXIV. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa cosechada como mg de peso seco total (A) y mg de materia orgánica (B) de Phaeodactylum tricornutum. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.



CONTROL		ALTERNATIVO	
0.75		0.70	
432.5 \pm 31.9		740.0 \pm 65.5	
0.60		0.60	
590.7 \pm 140.0		644.5 \pm 64.7	
0.50		0.50	
594.2 \pm 98.7		543.5 \pm 58.9	

A



CONTROL		ALTERNATIVO	
0.75		0.70	
359.7 \pm 42.8		671.7 \pm 61.4	
0.60		0.60	
530.2 \pm 137.0		581.0 \pm 55.8	
0.50		0.50	
513.0 \pm 91.0		487.7 \pm 48.5	

B

Tabla XXV. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de Phaeodactylum tricornutum. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO				CONTROL		ALTERNATIVO		
	Control	0.75	190.0 \pm 29.4				Control	0.75	54.0 \pm 1.4			
		0.60		0.70	347.0 \pm 58.9			0.60		0.70		90.5 \pm 2.8
		0.50		0.60				0.60		0.60		77.0 \pm 14.8
	Alternativo	0.70	304.2 \pm 107.0	0.50	331.7 \pm 53.5		Alternativo	0.60	71.0 \pm 8.9	0.50	63.0 \pm 6.8	
		0.60	295.0 \pm 55.0	0.50	292.5 \pm 45.9			0.60		0.50		
		0.50						0.50				

A

B

		CONTROL		ALTERNATIVO	
	Control	0.75	77.7 \pm 20.4		
		0.60		0.70	155.5 \pm 44.1
		0.50		0.60	
	Alternativo	0.70	112.0 \pm 37.4	0.50	136.7 \pm 25.9
		0.60	99.2 \pm 30.4	0.50	116.7 \pm 5.2
		0.50			

C

de las microalgas hasta que se alcanzara la máxima biomasa, y se determinó que durante este tiempo la μ max. fue de 1.81 generaciones \times día⁻¹ para el medio control y de 1.63 generaciones \times día⁻¹ para el medio alternativo. Por esto, se experimentó una D max. diaria inicial de 0.50. A pesar de su μ max. relativamente alta en la fase inicial del experimento, en esta especie se denotó un crecimiento lento a las concentraciones deseadas, motivo por el cual la D max. tuvo que disminuirse a 0.40 para el medio control y a 0.30 para el medio alternativo; las subsecuentes diluciones fueron de 0.30 y 0.25 para el medio control y de 0.25 y 0.15 para el alternativo.

El cultivo se estabilizó por un lapso aproximado de 20 días, con una μ promedio de 0.85, 0.76 y 0.58 generaciones \times día⁻¹ para el medio control y de 0.77, 0.60 y 0.59 generaciones \times día⁻¹. Para el medio alternativo las razones de dilución no fueron suficientes para estabilizar los cultivos, los cuales tuvieron una tendencia a aumentar la biomasa hasta que drásticamente se vio limitada, lo cual provocó que se contaminara fácilmente. Con la prueba del coeficiente Beta se comprobó la estabilidad relativa de la biomasa con respecto al tiempo (Tabla XXVI).

En las figuras 18 y 19 se muestran los cambios de biomasa de los cultivos de Pavlova lutheri por un lapso de 24

Tabla XXVI. Prueba del coeficiente Beta para la fase estable del crecimiento de Pavlova lutheri en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

VARIABLE		RELACION		
CULTIVO	DILUCION	F	G.L.	DECISION
C	0.40	-0.172	9	ACEPTA
C	0.40	-0.650	9	ACEPTA
C	0.30	-0.010	9	ACEPTA
C	0.25	0.205	9	ACEPTA
A	0.30	0.295	9	ACEPTA
A	0.25	0.219	9	ACEPTA
A	0.25	0.162	9	ACEPTA
A	0.15	0.183	9	ACEPTA

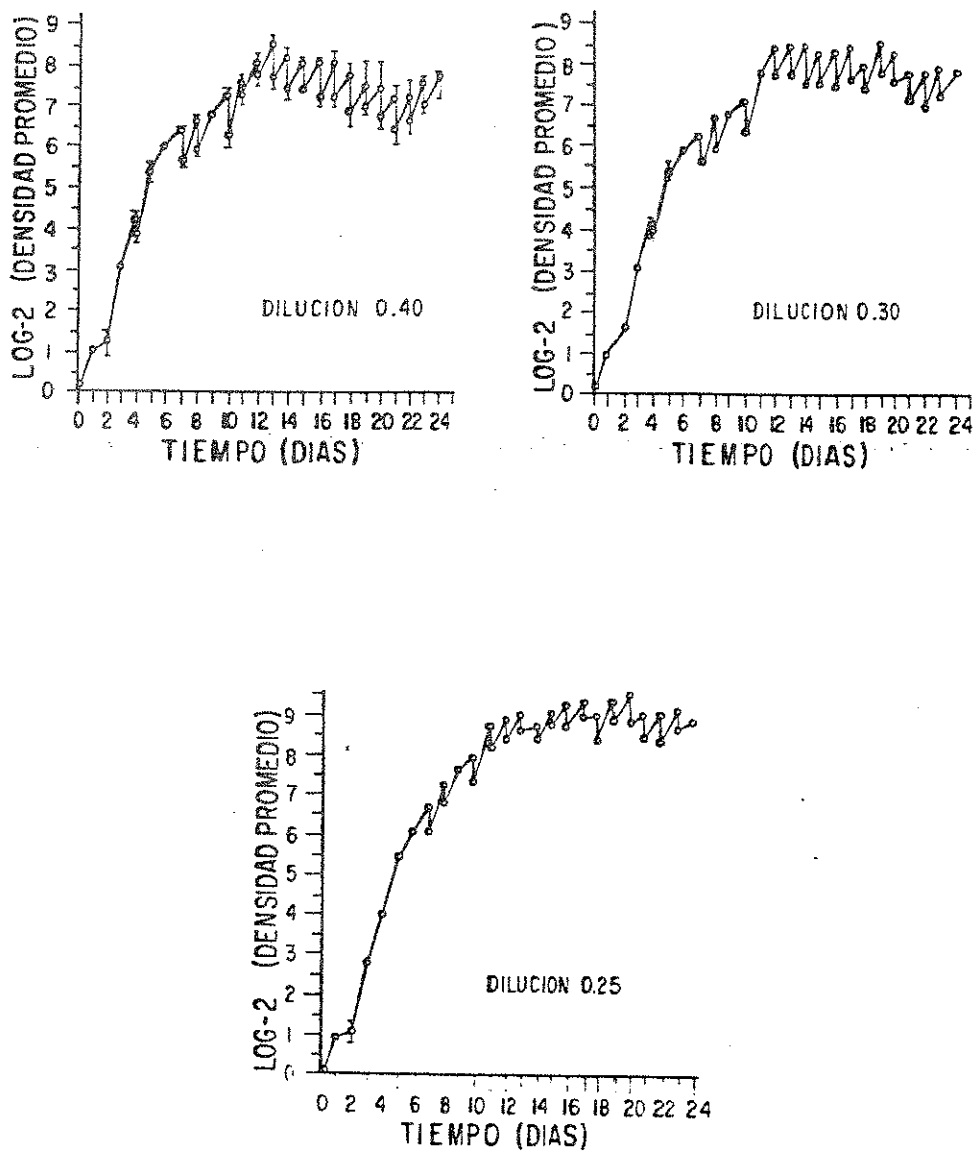


Figura 18. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Pavlova lutheri en el medio control a las tres razones de dilución.

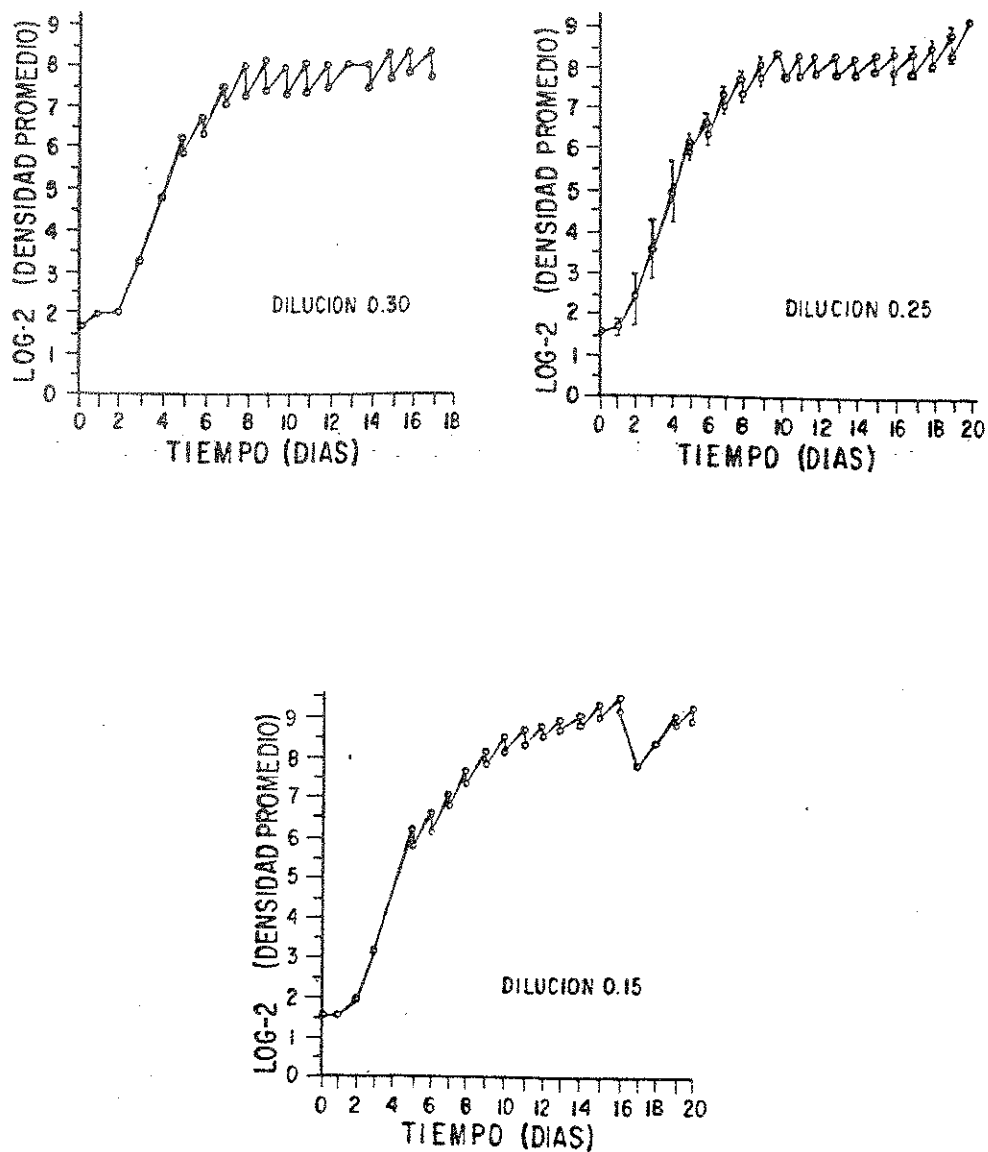


Figura 19. Producción de biomasa (en log 2 de unidades de fluorescencia) de Pavlova lutheri en el medio alternativo a las tres razones de dilución.

días en ambos medios, a las razones de dilución experimentales.

Con un ANOVA de dos vías se encontró que había diferencia significativa por medio y por razón de dilución (Tabla XXVII) y con una prueba de SNK se caracterizaron las diferencias entre razones de dilución (Tabla XXVIII). Hubo una tendencia a que la biomasa aumentara en razón inversa a la tasa de dilución en el medio control, con diferencias significativas entre todas las diluciones. En el medio alternativo, tal diferencia se pudo comprobar sólo entre las razones de 0.30 y 0.25. Entre los medios existe una diferencia significativa a la razón de 0.25 (mayor en el medio control). No existieron diferencias entre las repeticiones.

También se comprobaron diferencias significativas de la concentración celular entre los medios, a las razones de 0.30 y 0.25 (mayores en el medio control), y entre las razones de dilución con un mayor número de células por μL para las diluciones inferiores, en el medio control (Tabla XXIX).

La biomasa celular promedio (μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células) difiere significativamente entre los medios a la razón de 0.30 (mayor en el alternativo). No hubo diferencias entre razones de dilución (Tabla XXIX).

Tabla XXVII. Prueba de análisis de varianza de dos vías para los cultivos en la fase estable de Pavlova lutheri.

VARIABLE	VALOR DE F	SIGNIFICANCIA
		α
DILUCION	12.648	* * *
MEDIO	0.200	N.S.

Tabla XXVIII. Pavlova lutheri: Comparación de la biomasa (en unidades de fluorescencia) entre los medios y entre las razones de dilución (prueba de SNK). A la izquierda se da la significancia de la comparación entre las diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL	ALTERNATIVO
0.40	0.40	
Control	8.05 \pm 0.38	
0.30	0.40	
0.25	7.86 \pm 0.77	
	0.30	0.30
	8.46 \pm 0.27	8.12 \pm 0.25
	0.25	0.25
Alternativo	8.99 \pm 0.24	8.41 \pm 0.18
0.25		0.25
0.15		8.36 \pm 0.22
		0.15
		8.64 \pm 0.57

Tabla XXIX. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar de la biomasa en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ (A) y μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células (B) de Pavlova lutheri. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre los medios, para diluciones iguales.

	CONTROL		ALTERNATIVO
	0.40		
	7193 \pm 980		
	0.30		0.30
	8623 \pm 1213	*	6264 \pm 500
	0.25		0.25
	10578 \pm 1358	*	7150 \pm 2147
			0.15
			7344 \pm 1498

A

	CONTROL		ALTERNATIVO
	0.40		
	14.6 \pm 2.9		
	0.30		0.30
	11.3 \pm 1.8	*	16.0 \pm 2.2
	0.25		0.25
	13.1 \pm 1.0		15.6 \pm 2.4
			0.15
			17.7 \pm 3.5

B

III.4.1 Composición proximal de las células

Las concentraciones relativas de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas se presentan en la figura 20 para los dos medios y para las cuatro razones de dilución. Para las proteínas se hallaron diferencias significativas entre los medios, a la razón de 0.30 (mayor contenido en el medio alternativo), y entre las razones de dilución 0.30 y 0.25 del medio control (mayor para 0.25). En lo referente a carbohidratos se encontraron diferencias significativas a la razón de 0.25 entre los medios (mayor en el medio control); no se encontraron diferencias entre razones de dilución. Para lípidos, la única diferencia detectada fue entre los medios, para la razón de 0.30 (mayor para el medio control). Por último, se detectó una diferencia en el contenido de cenizas de las microalgas cultivadas en medios diferentes a las razones de dilución de 0.30 y 0.25 (en ambos casos mayor para el medio alternativo). No hubieron diferencias debidas a la razón de dilución (Tabla XXX).

III.4.2 Producción de Pavlova lutheri

La producción promedio diaria de cada unidad productiva expresada como miligramos de peso seco total y de materia orgánica se presenta en la figura 21. No se encontraron

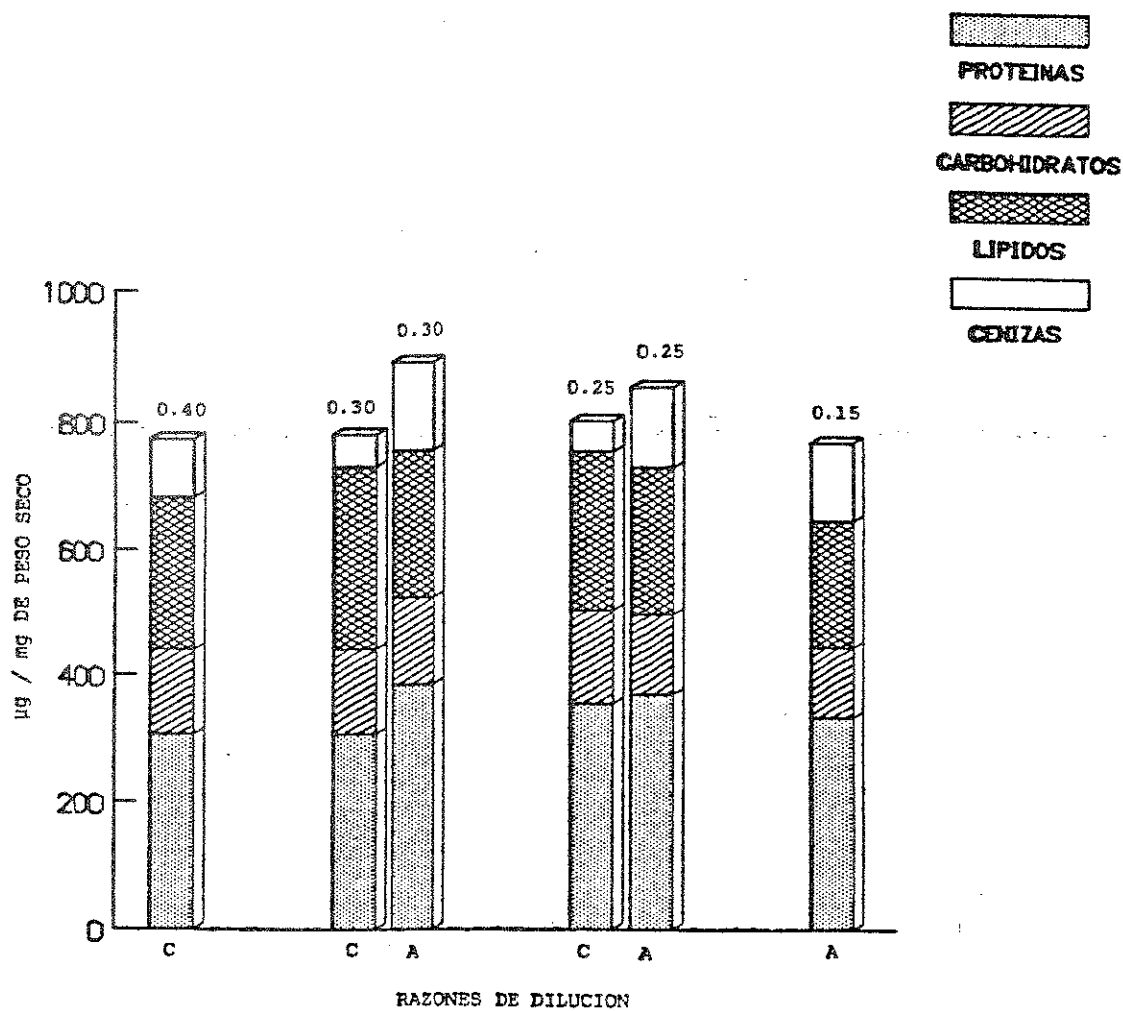


Figura 20. Biomasa promedio en μg de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas por mg de peso seco de Pavlova lutheri en el medio control (C) y alternativo (A) a las tres razones de dilución.

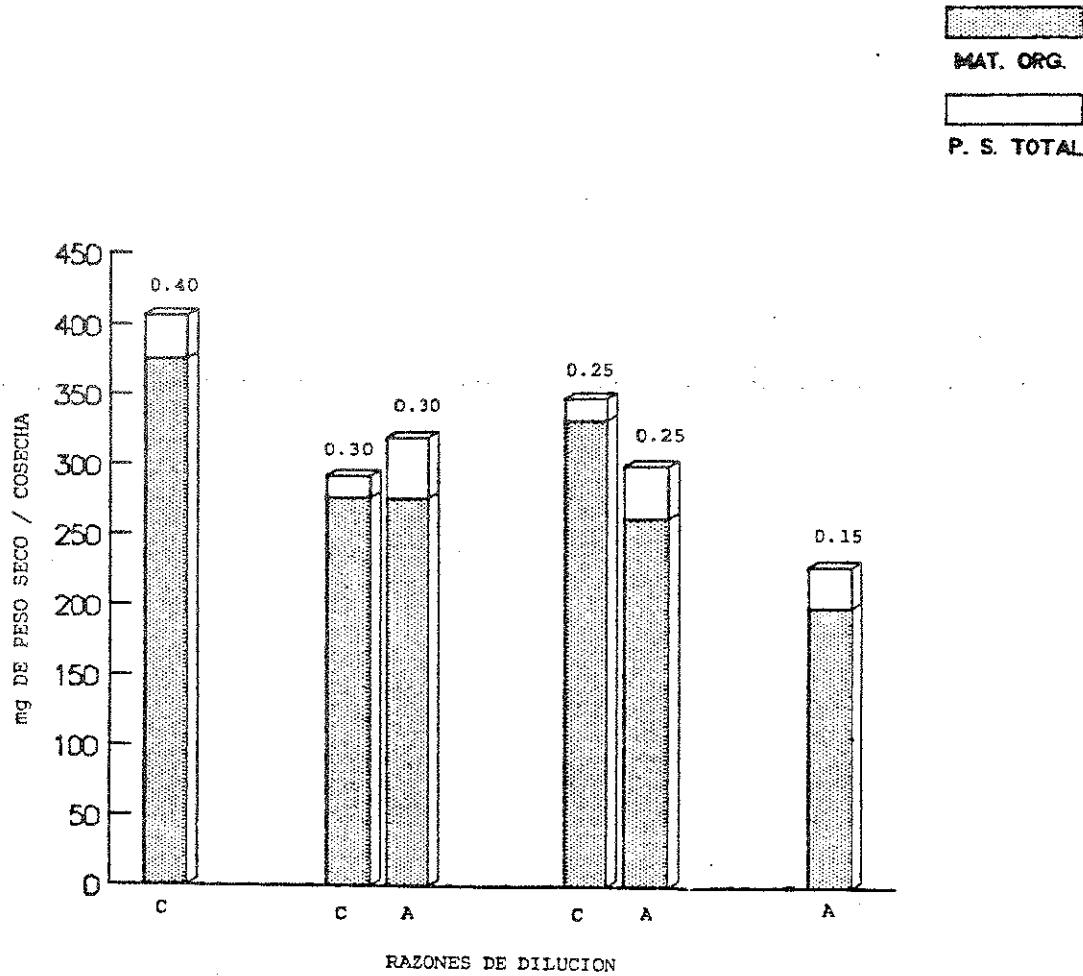


Figura 21. Biomasa promedio en mg de peso seco total (P.S. TOTAL) y de materia orgánica (MAT. ORG.) por cosecha de unidad productiva de Pavlova lutheri en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

diferencias significativas para ninguna de las dos medidas de biomasa entre medios a las razones comparables (0.30 y 0.25). Para el peso seco total, se encontró una diferencia significativa entre las razones de dilución de 0.40 y 0.30 en el medio control (mayor producción para 0.40). En este mismo medio, también se comprobó una cosecha de materia orgánica significativamente mayor a la razón de 0.40 que a la de 0.30, que resultó significativamente inferior a las dos extremas (Tabla XXXI).

La producción de material orgánico subdividida en proteínas, carbohidratos y lípidos se representa para todas las situaciones experimentales en la figura 22. Para las proteínas sólo se comprobó que en el medio control la dilución intermedia resultó en una cosecha significativamente menor que en las otras diluciones del mismo medio, y no se notaron diferencias entre medios para las dos diluciones comparables. Para los carbohidratos, hubo diferencias entre los medios a la razón de 0.25 (mayor para el control) y entre las razones de dilución en ambos medios: en el medio control, con una mayor producción para la razón de 0.40, y en el alternativo, en el cual se obtuvo una mayor producción a la razón de 0.30 que a 0.25. Por último, no hubo diferencia significativa en la producción de lípidos en medios diferentes, y se encontró únicamente una diferencia entre las diluciones 0.30 y 0.15 (mayor para 0.30) en el medio

alternativo (Tabla XXXII).

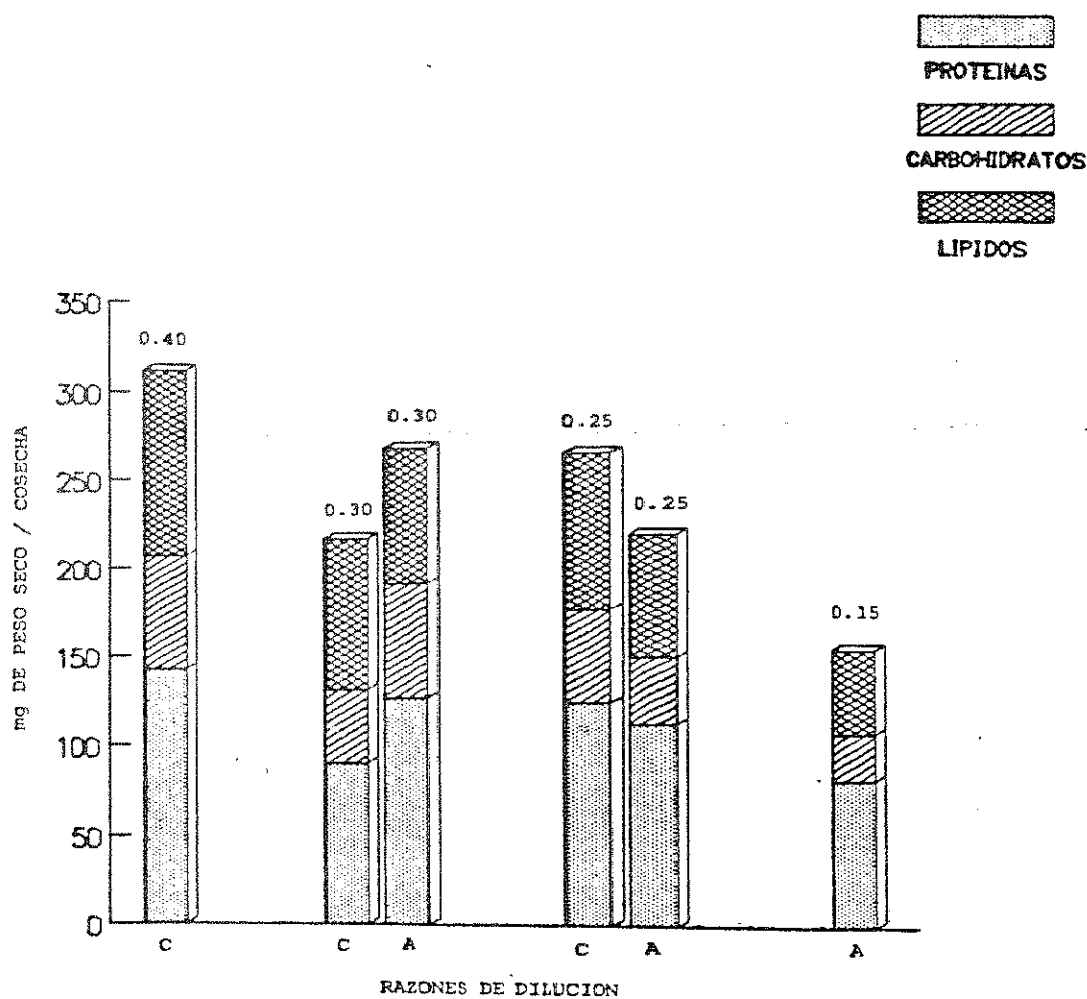


Figura 22. Biomasa promedio en mg de proteínas, carbohidratos y lípidos por cosecha de unidad productiva de *Pavlova lutheri* en el medio control (C) y alternativo (A) a las cuatro razones de dilución.

Tabla XXXII. Significancia de la prueba t de Student y valores promedio \pm desviación estándar para la cosecha por unidad productiva en mg de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de Pavlova lutheri. A la izquierda se da la significancia de la comparación entre diluciones para el mismo medio. A la derecha la significancia de la comparación entre medios, para diluciones iguales.

		CONTROL		ALTERNATIVO				CONTROL		ALTERNATIVO		
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 * Control 0.30 0.25 * </div>	0.40	142.2 \pm 31.1				<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 * Control 0.30 0.25 * </div>	0.40	64.5 \pm 11.0				
	0.30	0.30	90.5 \pm 22.4		0.30		0.30	0.30	40.7 \pm 10.3		0.30	64.5 \pm 11.0
	0.25	0.25	123.5 \pm 14.2		0.25		0.25	0.25	52.0 \pm 6.2 *		0.25	37.2 \pm 11.2
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.30 * Alternativo 0.25 0.15 * </div>	0.15	111.7 \pm 45.6		80.7 \pm 7.1		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.30 * Alternativo 0.25 0.15 * </div>	0.15	37.2 \pm 11.2		0.15		
	0.25	126.2 \pm 40.1					0.25	0.25	25.2 \pm 3.6		0.25	
	0.25	126.2 \pm 40.1					0.25	0.25				

A

B

		CONTROL		ALTERNATIVO		
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.40 * Control 0.30 0.25 * </div>	0.40	105.0 \pm 23.3				
	0.30	0.30	85.5 \pm 23.2		0.30	76.5 \pm 24.1
	0.25	0.25	88.2 \pm 14.6		0.25	69.0 \pm 23.1
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> 0.30 * Alternativo 0.25 0.15 * </div>	0.15	69.0 \pm 23.1		46.2 \pm 9.2		
	0.25	69.0 \pm 23.1				
	0.25	69.0 \pm 23.1				

C

IV. DISCUSION

IV.1 Chaetoceros sp.

Una vez que se obtuvo la máxima biomasa, los cultivos se mantuvieron relativamente estables. La baja en biomasa que se nota entre los días 7 y 9 en el medio control se debió al efecto de los antibióticos que se emplearon en este período para disminuir la alta carga bacteriana. En el caso del medio alternativo, se nota una tendencia de la biomasa a disminuir con el tiempo para la razón de 0.50; esto pudiera deberse a una limitación de los silicatos, dado que el medio alternativo contiene la mitad de silicio del medio control. Con esto se demostraría que en los cultivos semimasivos esta cepa necesita una cantidad de silicio por lo menos igual a la que contiene el medio f.

La mayor tasa de crecimiento que se logró con el medio alternativo pudiera ser debida a la presencia de impurezas (como metales traza y quelantes) en el fertilizante, a las cuales varios autores (Gonzalez y Maestrini, 1984) atribuyen una función positiva para el crecimiento de las microalgas, que coadyuvaría a la mayor concentración celular alcanzada en el medio alternativo. La relación inversa entre las biomásas celulares (μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células) y la razón de dilución se puede explicar por la forma de reproducción de

las diátomeas (Dawes, 1986; Darley, 1987), que provoca una continua disminución del tamaño, y es más evidente cuando la mayoría de las células se están reproduciendo con una velocidad cercana a la μ max. (fase de crecimiento exponencial). A esto se añade que a altas razones de dilución la incorporación relativa del silicio es menor, lo cual contribuye al mayor peso celular que se nota en las diluciones inferiores, y que es más evidente en el medio control, muy posiblemente debido a la mayor disponibilidad de silicatos en este medio.

IV.1.1 Composición proximal de las células

El porcentaje total de la fracción orgánica que se alcanzó a detectar con la metodología empleada fue entre el 90 y el 110 % en el medio alternativo y alrededor del 80 % en el medio control. Estas desviaciones podrían ser debidas a la presencia de carbohidratos complejos que contengan monosacáridos con características diferentes de la glucosa, o de proteínas con una composición en aminoácidos diferente de la mezcla utilizada como estándar. Estos compuestos repercuten de manera directa en las técnicas de determinación de carbohidratos y proteínas, ya que pueden causar una sobre- o subestimación de la cantidad de estos constituyentes, dado que las técnicas empleadas se basan en la detección de un determinado compuesto (un monosacárido y dos aminoácidos,

respectivamente). Discrepancias parecidas no son infrecuentes en la literatura (Parsons et al., 1961; Myklestad, 1974; Conover, 1975) y se notaron también en el transcurso de este trabajo, para las otras especies investigadas.

La tendencia a la disminución del porcentaje de proteínas en relación directa con la razón de dilución que se describe en la literatura (Myklestad, 1974; Conover, 1975) sólo se pudo comprobar estadísticamente entre las dos diluciones inferiores del medio alternativo. El máximo porcentaje protéico que se alcanzó fue del 54.9% (medio alternativo, dilución de 0.33) que, comparado con otras especies de Chaetoceros (Myklestad y Haug, 1972; Parsons et al., 1961; Rayment, 1980) es un porcentaje alto, pero que resulta corroborado por el valor obtenido en el mismo medio a la dilución superior (46.8%). Esta discrepancia con los datos de la literatura puede ser debida a reales diferencias específicas, o a las diferentes condiciones experimentales, o a diferentes metodologías, ya que en estos trabajos se emplean técnicas distintas y además no se intenta de optimizar, como se hizo en este trabajo, la extracción de las proteínas. Para los carbohidratos, el porcentaje promedio (11%) es comparable con los resultados obtenidos con otras especies de este género (Myklestad, 1974). En ambos medios la mínima cantidad de carbohidratos se detectó en la más baja

dilución. Muchas diatomeas, y Chaetoceros en especial, tienen la capacidad de liberar carbohidratos extracelularmente y por ende disminuir las reservas celulares (Myklestad y Haug, op. cit.; Myklestad, 1989) aunque no se puede excluir la posible presencia de polisacaridos de reserva no detectables con el método empleado. Para los lípidos no se manifestó ninguna tendencia; su porcentaje estuvo dentro del rango del 10.1% al 19.8%, algo superior a los datos de literatura (Parsons et al., op. cit.; Werner, 1977). El contenido de cenizas tuvo una tendencia a aumentar en razón inversa con la tasa de dilución lo cual, como anteriormente se mencionó, podría explicarse por una mayor incorporación de silicio cuando el crecimiento es más lento. Por otro lado, el mayor volumen celular podría conllevar un mayor espacio vacuolar y una consiguiente mayor cantidad de iones inorgánicos en las células. Los altos porcentajes de lípidos y cenizas que se encontraron en la dilución superior del medio alternativo podría ser una evidencia de limitación por algún factor que no se pudo detectar, aunque nos inclinamos a atribuirla a la baja concentración de silicatos.

IV.2 Tetraselmis sp.

Una vez alcanzada la biomasa máxima, el crecimiento de todos los cultivos fue moderadamente estable en los dos medios; los valores de fluorescencia, siempre

significativamente inferiores en el medio alternativo, podrían indicar alguna limitación en lo que se refiere a la síntesis de pigmentos fotosintéticos, aunque los datos de biomasa no resultan particularmente indicativos al respecto, ya que se notaron diferencias muy marcadas en la concentración de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ entre los medios y entre las razones de dilución, sin poder determinar alguna tendencia en particular. Para las biomasas celulares del medio control se evidenció una inclinación a disminuir en razón inversa a la tasa de dilución, muy posiblemente debido a la forma de reproducción, que es la de formar dos y hasta tres células hijas dentro de la célula madre, lo cual implica que, antes de la separación, se tengan tres o más paredes celulares (Butcher, 1959; Voltolina, Depto. Acuicultura, C.I.C.E.S.E., com. pers.) ocasionando un peso mayor en esta fase que es evidentemente tanto más frecuente cuanto más rápida es la tasa de crecimiento.

IV.2.1 Composición proximal de las células

El porcentaje total explicado fue entre el 85% y el 99% para el medio control y entre el 84% y el 94% para el medio alternativo.

La tendencia de las proteínas a disminuir en relación directa con la tasa de dilución, aunque comprobada

estadísticamente sólo para las dos diluciones extremas en el medio control debido a la alta variabilidad de los datos, concuerda con todos los resultados existentes en literatura sobre los cambios de la composición bioquímica según la edad del cultivo (Myklestad, 1974; Flaak y Epifanio, 1978; Enright et al., 1986). El máximo porcentaje de proteínas fue del 53.8%, comparable con varios datos bibliográficos relativos a otras clorofíceas (Kurmary et al., 1989; Taub, 1970). El mayor porcentaje de carbohidratos (13.6%) se encontró en el medio alternativo para la razón de dilución de 0.30, y resultó significativamente diferente del porcentaje medido para la dilución equivalente del medio control, lo cual pudiera ser un indicio de algún grado de limitación. El porcentaje promedio encontrado para el medio alternativo fue del 12.3%, que es parecido al de otras especies de Tetraselmis (Wikfors et al., 1984; Epifanio, 1979). En cuanto a lípidos se obtuvo un promedio del 15.9%, y no existieron diferencias entre los medios y entre las razones de dilución. Tampoco se notaron diferencias significativas en el contenido de cenizas, que se mantuvieron en general entre el 16.2% y el 19.7%.

IV.3 Phaeodactylum tricornutum

La mayor biomasa se obtuvo a las razones de dilución de 0.60 y 0.50 del medio control, y en todas las diluciones del

medio alternativo, aunque todos los cultivos tendieron a ser inestables. En particular, los cultivos en el medio control mostraron una rápida disminución de la biomasa después de haber alcanzado su máxima densidad, lo cual hace pensar que ese medio no es el más adecuado para esta especie. Sobre todo a la más alta dilución, se notó que las células no se dividían en forma regular formando, como es normal, unidades celulares aisladas, sino que iniciaban una nueva división sin que hubiera terminado la anterior. Esto daba como resultado la formación de cadenas de 10-20 células unidas lateralmente, que por su peso tendían a precipitar al fondo del carboy creando núcleos de contaminación y finalmente el término del cultivo. Esto, y la tendencia de esta especie a adherirse a las paredes del recipiente es el motivo más probable de la corta duración de la fase estable (aproximadamente 10 días) de estos cultivos.

Debido a la variabilidad interna dentro de cada razón de dilución la biomasa obtenida como número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ y como μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células no difiere significativamente ni entre los medios para las mismas razones de dilución, ni entre las razones de dilución del mismo medio. Esta variabilidad pudiera deberse a alguna limitación, que resultaría en las irregularidades en el crecimiento de esta especie antes mencionadas, y en su comportamiento semibentónico.

IV.3.1 Composición proximal de las células

El porcentaje explicado fue entre el 88% y el 92% para el medio control y entre el 88% y el 95% para el medio alternativo.

Para el caso de las proteínas, carbohidratos y lípidos no se detectó ninguna tendencia en particular, independientemente del medio o de la tasa de dilución empleados. El porcentaje promedio de proteínas fue del 50.4%, similar a los datos obtenidos por Ansell et al. (1964). Los carbohidratos y los lípidos fueron respectivamente el 12% y el 19.4%, que es menor para carbohidratos y mayor para lípidos de lo reportado en la literatura (Ansell et al., op. cit.; Parsons et al., op. cit.) posiblemente debido a las diferentes metodologías empleadas.

Los bajos porcentajes de cenizas (entre 9.2% y 26.8%), se deben a que ésta es una especie que tiene una estructura silicea muy delgada, que resulta de la falta de un frústulo propiamente dicho (Hendey, 1964). Los valores más altos se notaron en el medio control, aunque la alta variabilidad de los datos en este medio no permitió comprobar estadísticamente la existencia de diferencias significativas.

El menor contenido de cenizas en las diluciones superiores del medio alternativo y el alto valor promedio encontrado a la máxima tasa de dilución del medio control sugiere la posibilidad de algún problema con este último, posiblemente debido al exceso de silicio disponible. Además, esta tasa de dilución muy cerca de la μ max. fue probablemente la causa de la formación de cadenas grandes por no poder dividirse adecuadamente las células.

IV.4 Pavlova lutheri

El desarrollo de los cultivos de este flagelado no fue muy regular durante el experimento. En el caso del medio control, la tendencia fue de aumentar hasta llegar a un máximo, para después disminuir gradualmente. Para el medio alternativo, la tendencia general de aumentar lentamente con el tiempo llegando a una estabilidad relativa sólo se hizo evidente en el caso de las dos razones de dilución superiores. Una posible explicación en el caso del medio control es la elevada contaminación por bacterias y, al final del experimento, por Phaeodactylum tricornutum que entró en competencia con Pavlova lutheri. En el caso del medio alternativo, el crecimiento fue muy lento probablemente debido a deficiencias de nutrientes o de algún otro elemento no contenido en el fertilizante. Se sabe por ejemplo que esta microalga requiere de medios relativamente complejos.

no contenido en el fertilizante. Se sabe por ejemplo que esta microalga requiere de medios relativamente complejos. De hecho el medio alternativo que se usó contenía casi todos los elementos menores del medio control, con la única excepción de dos vitaminas (biotina y tiamina). A pesar de esto, la mayor biomasa como número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$ del medio control parece indicar alguna limitación en el medio alternativo, limitación que aparentemente se refleja en la mayor biomasa celular.

IV.4.1 Composición proximal de las células

El porcentaje de peso seco explicado fue entre el 77% y el 80% en el medio control y entre el 78% y el 95% para el medio alternativo.

En relación a proteínas no se observó una tendencia general. El máximo porcentaje de proteínas (38.4%) se encontró en el medio alternativo en la razón de 0.30. Este es un valor inferior al encontrado por Parsons et al. (1961) lo cual, junto con el alto contenido de lípidos, confirma la presencia de algún factor limitante en ambos medios. Para los carbohidratos la mayor proporción (14%) se encontró en el medio control, y en cuanto a los lípidos, se observaron porcentajes muy altos en ambos medios, con un promedio del 24.2% que, según los resultados de otro estudio con la misma

especie (Emdadi y Berland, 1989) indicaría que el cultivo estaba en la fase de crecimiento lento. Finalmente, las cenizas fueron mayores para el medio alternativo con valores cercanos al 12%, aproximadamente el doble de los valores obtenidos en el medio control, lo cual corrobora que el medio alternativo no fue el más adecuado para esta especie.

V. CONCLUSIONES.

V.1 Chaetoceros sp.

Esta es una especie de dimensiones pequeñas (6-8 micras) que tiene una alta tasa de crecimiento, llegando a duplicarse cada 9.6 horas en condiciones no limitantes. Esta alta tasa reproductiva hace de ésta una especie altamente competitiva, y por consiguiente poco susceptible a la contaminación por otras especies de microalgas.

Al hacer una comparación entre las mismas razones de dilución, el crecimiento, las biomاسas y el contenido de proteínas fueron mayores para el medio alternativo y no se evidenciaron diferencias para el resto de las fracciones bioquímicas. Al comparar entre las diluciones del mismo medio, el crecimiento y la concentración celular fueron mayores en la dilución de 0.25 del medio alternativo y la biomasa celular resultó mayor en la dilución de 0.25 del medio control. Las diferencias detectadas en la composición proximal no fueron consistentes dado que por las limitaciones metodológicas sólo se muestran tendencias.

La cosecha en miligramos de peso seco total y de materia orgánica por unidad productiva fue mayor en la dilución de 0.50 en el medio control, y a las dos diluciones extremas en

el medio alternativo para el peso seco total, mientras que para la materia orgánica la razón de dilución más productiva fue la de 0.25. Esta dilución es la que produce la mayor cantidad de proteínas y carbohidratos.

El costo de producción de 1 Kg de materia orgánica calculado para 8 unidades productivas y empleando una razón de dilución de 0.25 y medio alternativo es de \$ 1.38 dólares; para la razón de 0.50 con el medio control sería de \$ 42.00 dólares (f grado reactivo) y de \$16.20 dólares (f grado industrial). Dadas estas diferencias en calidad y costos, se concluye que la técnica de cultivo semi-continuo con medio simplificado y a una razón de dilución relativamente baja es la opción más viable para esta especie.

V.2 Tetraselmis sp.

Este flagelado de relativamente grandes dimensiones (10 a 12 micras) tiene una alta tasa de reproducción, ya que en condiciones óptimas se puede duplicar cada 12 horas. Tiene un comportamiento característico, que es el de asentarse en el recipiente a los inicios del cultivo por la pérdida de los flagelos al momento de la reproducción. Esto y su elevada actividad de secreción, causa adhesión a las paredes y al fondo del carboy, lo cual puede provocar limitación por carencia de luz y favorecer la contaminación por bacterias.

Por este motivo, además de la aereación el cultivo tiene que agitarse manualmente y de manera vigorosa (inclusive hasta dos veces al día) para evitar la excesiva adhesión a las paredes. A pesar de los riesgos antes mencionados, los cultivos se mantuvieron estables por 20 días, lapso que se considera aceptable para fines acuiculturales.

El crecimiento y la concentración celular fueron mayores en el medio control, y no hubo diferencias para la biomasa celular y la composición proximal. Al comparar entre las razones de dilución, hubo diferencias en el crecimiento y en la concentración y biomasa celular, con una tendencia favorable para la razón de 0.25 (con la excepción de la biomasa celular, que resultó mayor a la dilución de 0.40 en el medio control). En el caso de la composición proximal, las diferencias entre las razones de dilución no siguieron un patrón definido.

Las razones de 0.40 y 0.25 dieron la mayor producción de material orgánico en el medio control, y las de 0.40 y 0.30 en el alternativo. En ambos medios, la dilución que produce la mayor cosecha de las tres fracciones orgánicas es la de 0.40, siendo superior la producción del medio control.

El costo de producción de 1 Kg de materia orgánica con 8 unidades productivas mantenidas a la razón de 0.40 es de \$

2.63 dolares con el medio alternativo y de \$ 16.89 dolares si se utilizara el medio de grado reactivo y de \$ 8.89 dolares con el f de grado industrial. Para obtener la misma producción por unidad de tiempo con el medio alternativo, tendrían que emplearse cuatro unidades productivas más, lo cual implicaría un gasto adicional de aproximadamente \$ 4.00 dolares en luz y horas/hombre, que se compensaría debido al bajo costo del medio, si hubiera disponibilidad de espacio.

V.3 Phaeodactylum tricornutum

Esta diatomea es de pequeñas dimensiones (6-7 X 1.2-2 micras) y tiene una tasa de reproducción muy alta, ya que puede llegar a duplicarse cada 9.6 horas en condiciones de crecimiento óptimas. Esto permitió mantener la biomasa relativamente constante a una alta tasa de dilución (0.75), lo que evitó también problemas de contaminación por otras especies de microalgas. Como se mencionó anteriormente, con esta especie se tuvieron algunos problemas metodológicos debido a su alta tasa de reproducción, sobre todo cuando se mantuvo a una dilución elevada en medio f. El problema mayor era la formación, hacia el final de la fase de crecimiento exponencial, de filamentos multicelulares que precipitaban y adherían a las paredes de los recipientes, provocando un aumento de la carga bacteriana y disminuyendo la transparencia de las paredes del carboy; este problema

normalmente ocurría entre los días 4 a 6 desde el momento del inóculo.

Las únicas diferencias que se encontraron entre los cultivos son consecuencias de la menor biomasa producida con el medio control a la más alta dilución, para la cual la concentración celular fue significativamente inferior a cualquier otra situación experimental, sin que esto causara diferencias en biomasa celular o composición bioquímica.

Las mayores cosechas diarias de esta diatomea en miligramos de peso seco por unidad productiva se obtuvieron en el medio alternativo, a la razón de 0.70. En el medio control, la producción fue inferior, con valores más altos, por el motivo antes mencionado, a las diluciones de 0.60 y 0.50. Se notaron diferencias en el mismo sentido al comparar la producción de materia orgánica y las distintas fracciones bioquímicas.

El costo de la producción de 1 Kg de materia orgánica con 8 unidades productivas para la razón de 0.70 en el medio alternativo es de \$ 4.37 dolares. Para el medio control, el costo de la misma cantidad de materia orgánica es de \$ 15.86 dolares (f grado industrial) y de \$ 41.53 dolares (f grado reactivo). Estos datos, y la calidad del producto final, confirman que el medio alternativo es la mejor opción para un

sistema productivo.

V.4 Pavlova lutheri

Este flagelado es una especie muy pequeña (3 a 5 micras) con una tasa de crecimiento relativamente baja, ya que se duplicó cada 13.3 horas en las mejores condiciones y todavía más lentamente, posiblemente debido a deficiencia de nutrientes, en el caso del medio alternativo. Esto provocó que los cultivos fueran fácilmente contaminados por otras microalgas (Phaeodactylum tricornutum, Navicula sp., Chaetoceros sp.), o por microflagelados, hongos y bacterias. Su crecimiento puede ser también afectado por otros factores: en una ocasión por ejemplo, un aumento de temperatura (26 a 28 °C) causó la caída de todos los cultivos. Problemas de este tipo hacen de Pavlova lutheri una especie muy problemática para cultivarla en condiciones semicontroladas, como son los cultivos masivos.

La biomasa celular fue mayor para el medio alternativo y la concentración celular mayor para el medio control. En crecimiento y en composición bioquímica se encontraron diferencias sin una tendencia en particular, con la excepción del contenido de cenizas, que resultó mayor en el medio alternativo. Al comparar entre las razones de dilución en el mismo medio, hubo diferencias en el crecimiento y en la

concentración celular que fueron mayores a la razón de 0.25 para el medio control. En biomasa celular y composición bioquímica no se encontraron diferencias.

La cosecha diaria por unidad productiva fue mayor a la razón de 0.40, y en general se aprecia una tendencia a una mayor producción en el medio control que en el alternativo, a pesar de que la composición de los dos medios es muy similar. Desde el punto de vista de producción como alimento, este flagelado produce la mayor cantidad de materia orgánica en las razones de 0.40 y 0.25 en el medio control, y una cantidad similar en la razón de 0.25 con el medio alternativo. A pesar de esto, la mayor estabilidad de los cultivos mantenidos en el medio f, junto con la mayor proporción de los varios constituyentes celulares, aconsejan la utilización del medio completo, posiblemente con suplementos adicionales para acelerar el crecimiento de esta especie que es, de momento por lo menos, muy difícil de reemplazar como alimento sobre todo para organismos que requieren partículas de las dimensiones estipuladas para esta microalga.

En cuanto al costo de producción de 1 Kg de materia orgánica generado por 8 unidades productivas, esta es de \$ 4.57 dolares para la razón de 0.30 en el medio alternativo y de \$ 31.97 dolares (f grado reactivo) y de \$ 16.83 dolares (f

grado industrial), para la razón de 0.40 con el medio control.

Por los motivos antes mencionados, se estima que el uso del medio alternativo tendría que evitarse, a pesar de la notable diferencia de precios, sobre todo debido al hecho que esta especie es ampliamente utilizada para la alimentación de estadios larvarios, que requieren de una alimentación regular y de una calidad constante, que los resultados erráticos conseguidos con el medio alternativo podrían difícilmente garantizar.

V.5 Conclusiones generales

Una vez que se analizaron los resultados obtenidos con cada una de las especies se puede concluir de forma general lo siguiente:

1) Las especies que mejor crecieron en un sistema de cultivo semicontinuo fueron Chaetoceros sp. y Tetraselmis sp. A pesar de su alta velocidad reproductiva, o posiblemente a causa de ella, el cultivo de Phaeodactylum tricornutum puede presentar problemas debido a la necesidad de mantener una tasa de dilución considerablemente inferior a la velocidad máxima de crecimiento, lo cual resulta en un cultivo que se encuentra en una fase de crecimiento muy

cercana a la estacionaria; en cambio, en el cultivo de Pavlova lutheri el problema es que esta es una especie que crece muy lentamente en cultivos masivos, y por lo tanto es muy fácil que se contamine.

2) Por lo que se refiere al uso de medios simplificados y a su efecto sobre las microalgas, se concluye que estos resultan muy efectivos para Chaetoceros sp. y para Phaeodactylum tricornutum y, en menor medida, para Tetraselmis sp. Su uso no es aconsejable en el caso de Pavlova lutheri.

3) La producción de proteínas, carbohidratos y lípidos de cada una de las especies dió resultados muy similares, sin que se notara una clara dependencia del tipo de medio o de la tasa de dilución; esto es probablemente debido a que se trabajó en diferentes puntos de la fase de crecimiento lento, sin que fuera posible averiguar con certeza su posición en la curva de crecimiento específica.

4) El menor costo de horas/hombre y el costo inferior del fertilizante para cítricos empleado para la preparación del medio alternativo, hacen de éste una opción viable para los cultivos masivos de las microalgas que lo aceptan. La diferencia en costos de producción justifica seguir en esta línea de investigación, a través de la cual se pretende

diseñar medios especialmente adaptados a las necesidades de cada una de las especies que tengan algún interés desde el punto de vista comercial.

LITERATURA CITADA

- AQUACOP. 1983. Algal food cultures at the Centre Oceanologique du Pacifique. En: McVey, J.P. (ed.). Handbook of Mariculture. Vol 1 Crustacean Aquaculture. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida. 442 pp.
- Ansell, A.D., J. Coughlan, K.F. Linder y F.A. Lossmore. 1964. Studies on the mass culture of Phaeodactylum. IV. Production and nutrient utilization in outdoor mass culture. Limnol. Oceanogr. 9:334-342.
- Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. McLarney. 1986. Acuicultura. Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. A.G.T. Editor, S.A., México, D.F. 741 pp.
- Becker, C.W. 1986. Nutritional properties of microalgae potentials and constraints. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal Mass Cultures. CRC Press, Boca Raton Florida. 528 pp.
- Becker, C.W. 1988. Micro-algae for human and animal consumption. En: Borowitzka, M.A. y L.J. Borowitzka. (eds.). Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge. 476 pp.
- Blight, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Borowitzka, M.A. 1988. Fats, oils and hydrocarbons. En: Borowitzka, M.A. (ed.). Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, New York. 477 pp.
- Brand, L.E. y R.R.L. Guillard. 1981. The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. J. exp. mar. Biol. Ecol. 50:119-132.
- Butcher, R.W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part. I: Introduction and chlorophyceae. Fish. Invest. Lond. Ser. IV. 74 pp.
- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris. Station Zoologique Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail No. 12. 12 pp.

- Chu, F.L.E., K.L. Webb, D. Hepworth y M. Roberts. 1982. The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of Crassostrea virginica. J. Shellfish. Res. 2:29-34.
- Claus, C., F. Benijts, G. Vanderputte y W. Gardner. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of Artemia salina (L.) reared on two different algal foods. J. exp. mar. Biol. Ecol. 36:171-183.
- Conover, S.A.M. 1975. Nitrogen utilization during spring blooms of marine phytoplankton in Bedford Basin, Nova Scotia, Canada. Mar. Biol. 32:247-261.
- Darley, W.M. 1987. Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico. Ed. Limusa, México, D.F. 236 pp.
- Dawes, C.J. 1986. Botánica marina. Ed. Limusa, México, D.F. 673 pp.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. 10th European Symposium on Mariculture Biology, Ostend, Belgium, sept. 17-23. 1:71-93.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28:350-356.
- Emdadi, D. y B. Berland. 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of Nannochloropsis salina and Pavlova lutheri. Marine Chemistry. 26:215-225.
- Enright, C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie y J.D. Castell. 1986. Growth of juvenile Ostrea edulis L. fed Chaetoceros gracilis Schutt of varied chemical composition. J. exp. mar. Biol. Ecol. 96:15-26.
- Eppley, R.W. 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. Fishery Bulletin. 70:1063-1085.
- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster Crassostrea virginica (Gmelin) and the hard clam Mercenaria mercenaria (L.). Aquaculture 18:1-12.
- Fabregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas y M. Veiga. 1984. Growth of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture. 42:207-215.
- Farber-Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et

- biochimiques du krill antarctique Euphasia superba et Thysanoessa macrura recolte au cours de la campagne Fibex. Tesis de Doctorado de la Universidad de Aix-Marseille 11. 214 pp.
- Flaak, A.R. y C.E. Epifanio. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster Crassostrea virginica. Mar. Biol. 15:157-163.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press. 269 pp.
- Fox, J.M. 1983. Intensive algal culture techniques. En: McVey, J.P. (ed.). Handbook of mariculture. Vol 1. Crustacean aquaculture. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida. 441 pp.
- Gallager, S.M. y R. Mann. 1982. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankton Thalassiosira pseudonana (3H) on its food value to the bivalve Tapes japonica. Aquaculture 26:95-105.
- Geldenhuis, D.J., R.D. Walmsley y D.F. Toerien. 1988. Quality of algal material produced on a fertilizer-tap water medium in outdoor plastic-enclosed systems. Aquaculture. 68:157-164.
- Glover, H.E., M.D. Keller y R.R.L. Guillard. 1987. Light quality and oceanic ultraphytoplankton. Nature (Lond.) 319:342-343.
- Gonzalez-Rodriguez, E. y S.Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture. 42:245-256.
- Guillard, R.L.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana and Detonula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Suenster, W.C. 1968. Introducción a la inferencia estadística. Libros McGraw-Hill, Mex., D.F. 357 pp.
- Harrison, P.J., H.L. Conway, R.W. Holmes y C.O. Davies. 1977. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of Chaetoceros debilis, Skeletonema costatum, and Thalassiosira gravida. Mar. Biol. 43:19-31.
- Hendey, N.I. 1966. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part V: Bacillariophyceae (Diatoms). Fish. Invest. Lond. Ser. IV. 317 pp.

- Humphrey, G.F. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 40:63-70.
- Jones, D.A., T.H. Campbell, J.G. Munford y P.A. Gabbott. 1975. Studies on the design and acceptability of microencapsulated diets for marine particle feeders. I. Crustacea. 10th. European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, sept. 17-23. 1:229-239.
- Jorgensen, E.G. 1968. The adaptation of plankton algae. II. Aspects of the temperature adaptation of Skeletonema costatum. *Physiologia Plantarum.* 21:423-427.
- Kowallik, W. 1970. Light effects on carbohydrate and protein metabolism in algae. En: Halldal, P. (ed.). *Photobiology of Microorganisms.* Wiley-Interscience, London and New York. 479 pp.
- Kurmaly, K., D.A. Jones, A.B. Yule y J. East. 1989. Comparative analysis of the growth and survival of Penaeus monodon (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture.* 81:27-45.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquaculture.* 65:243-249.
- Laing, I. y E. Jones. 1988. A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae. *Aquaculture.* 7:89-96.
- Laing, I. y P.F. Millican. 1986. Relative growth and growth efficiency of Ostrea edulis L. spat fed various algal diets. *Aquaculture.* 39:135-153.
- Laing, I., S.D. Utting y R.W.S. Kiloda. 1987. Interactive effect of diet and temperature on the growth of juvenile clams. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 13:23-38.
- Langdon, C.J., D.M. Levine y D.A. Jones. 1985. Microparticulate feeds for marine suspension feeders. J. Microencapsulation. 2:1-11.
- Langowska, I. y Z. Zawadzki. 1979. Effect of the kind of illumination on growth of Scenedesmus obliquus (sc. 449). *Polskie Archiwum Hydrobiologii.* 26:257-266.
- Langton, R.W. y G.U. McKay. 1976. Growth of Crassostrea gigas (Thunberg) spat under different feeding regimes in a hatchery. *Aquaculture.* 7:225-233.

- Lechuga, C.H. y J. Gostan. 1986. Essai de la méthode de dilution semi-continue pour des études sur la croissance du phytoplancton en culture. An. Inst. Cien. Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 13:159-166.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972a. Dosage des protéines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 5. 11 pp.
- Malara, G. y R. Charra. 1972b. Dosage des glucides particulaires de phytoplancton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Marmelstein, A.D. 1970. The effect of light intensity on the organic composition of marine phytoplankton diatoms. Tesis de Doctorado, Oregon State University. 51 pp.
- Mayzaud, P., J. Farber-Lorda y M.C. Corre. 1985. Aspects of the nutritional metabolism of two antarctic euphausiids: Euphausia superba and Thysanoessa macrura. En: Siegfried, W.R., P.R. Condy and R.M. Laws. (eds.) Antarctic nutrient cycles and food webs. Proc. 4th SCAR Symp. Antarctic Biol., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- McClusky, D.S. y A.J. Berry. 1978. Physiology and behavior of marine organisms. Pergamon Press. Oxford and New York, 388 pp.
- Millamena, O.M., R.F. Bombeo, N.A. Jumalon y K.L. Simpson. 1988. Effects of various diets on the nutritional value of Artemia sp. as food for the prawn Penaeus monodon. Mar. Biol. 98:217-221.
- Moal, J.J.F. Samain y J.R. LeCoz. 1978. C/N et controle de la physiologie des cultures de phytoplancton. En: McClusky, D.S. y A.J. Berry. (eds.). Physiology and behavior of marine organisms. Pergamon Press. Oxford and New York, 388 pp.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continue; théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur. 79:390-410.
- Morris, I. y H.E. Glover. 1974. Questions on the mechanism of temperature adaptation in marine phytoplankton. Mar. Biol. 24:147-154.

- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. exp. mar. Biol. Ecol. 15:261-274.
- Myklestad, S. 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt and Skeletonema costatum (Grev.) Cleve. J. exp. mar. Biol. Ecol. 29:161-179.
- Myklestad, S. 1989. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom Chaetoceros affinis. J. Plank. Res. 11:763-773.
- Myklestad, S. y A. Haug. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. exp. mar. Biol. Ecol. 9:125-136.
- Myklestad, S., A. Haug y B. Larsen. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. J. exp. mar. Biol. Ecol. 15:261-274.
- Parande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. Analyt. Biochem. 6:415-423.
- Parsons, T.R., K. Stephens y D.H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada. 18:1001-1016.
- Pillsbury, K.S. 1985. The relative food value and biochemical composition of five phytoplankton diets for queen conch, Strombus gigas (Linne) larvae. J. exp. mar. Biol. Ecol. 90:221-231.
- Ruder, G.D., Ch.J. Langdon y D.E. Conklin. 1983. Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Oct. 27-29, 1981. Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Louisiana State University. 444 pp.
- Smith, P.R. 1971. Changes in the fatty acid composition of Coscinodiscus excentricus with culture age and salinity.

- Mar. Biol. 11:118-124.
- Pugh, P.R. 1975. Variation in the biochemical composition of the diatom Coscinodiscus excentricus with culture age and salinity. Mar. Biol. 33:195-205.
- Raush, T. 1981. The estimation of microalgal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. Hydrobiologia. 78:237-251 pp.
- Raymont, J.E.G. 1980. Plankton and Productivity in the Ocean. Pergamon Press, Oxford and New York. 489 pp.
- Rhee, Y. 1978. Effect of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr. 23:10-22.
- Richardson, K., J. Beardall y J.A. Raven. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. New Phytol. 93:157-191.
- Richmond, A. 1986. CRC handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Rodríguez-Marin, M.F. y J.F. Reprieto-García. 1985. El cultivo del camarón azul Penaeus stylirostris Stimpson. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, México. 126 pp.
- Sakshaug, E. y O. Holm-Hansen. 1977. Chemical composition of Skeletonema costatum (Grev.) Cleve and Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green as a function of nitrate, phosphate and iron-limited growth. J. exp. mar. Biol. Ecol. 29:1-34.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1969. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J.R. (ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press. Cambridge. 394 pp.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1968. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Board. Can. 167:1-310.
- Sullivan, F.B. 1970. Algal culture as a source of feed. En: Avault, J.W. y E. Bourdreaux. (eds.). Proceedings of the

- First Annual Workshop World Mariculture Society. 177 pp.
- Ukeles, R. 1973. Continuous culture -a method for the production of unicellular algal foods. En: Stein, J.R. (ed.). Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 448 pp.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. Aquacultural Engineering. 4:175-190.
- Voltolina, D. 1987. Mass microalgal cultures and water treatment using ozone. Final Report-contract CA910-6-06224A. Pacific Trident Mariculture Ltd. Victoria, B.C., Canada. 43 pp.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal Mass Culture. C.R.C. Press, Inc., Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Voskresenskaya, N.P. 1972. Blue-light and carbon metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 23:219-234.
- Vallen, D.G. y G.H. Geen. 1971. Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA, and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. Mar. Biol. 10:44-51.
- Verner, D. (ed.). 1977. The biology of diatoms. Botanical monographs. vol. 13. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles. 283 pp.
- Wright, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture. 60:231-241.
- Wijkfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. Aquaculture. 59:1-14.
- Wijkfors, G.H., J.W. Twarong y R. Ukeles. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, Crassostrea virginica. Biol. Bull. 167:251-263.
- Wright, R.T. 1984. Operational manual. Instituto Acuicola del Estado de Sonora, Bahía Kino, Sonora. Huatabampo, Sonora. México. 31 pp.

APENDICE

Tabla XXXIII. Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de Chaetoceros sp. a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción.

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)	microgramos de proteína extraídos			
		CONC. DE NaOH			
		0.05N	0.1N	0.5N	1.0N
70	10	--	146.6	66.1	0.0
80	10	--	186.3	101.3	22.6
80	20	--	183.6	--	--
80	30	--	189.0	--	--
90	10	--	196.3	90.5	--
90	30	--	180.9	95.0	--
100	10	--	<u>210.7</u>	--	--
100	20	--	205.3	--	--
100	30	--	208.0	--	--

Tabla XXXIV. Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de Tetraselmis sp. a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)	microgramos de proteína extraída			
		CONC. DE NaOH			
		0.05N	0.1N	0.5N	1.0N
70	10	194.3	180.2	--	--
80	10	195.4	222.5	117.3	57.6
90	10	194.3	224.7	--	--
90	20	--	232.3	123.8	--
90	30	--	233.4	--	--
100	20	--	<u>*243.1</u>	--	--

* Como este fue el valor mas alto y no se alcanzo a experimentar a los otros dos tiempos de extracción, se hizo otro experimento con una muestra diferente a los tres tiempos, y se encontró que el valor mas alto fue a los 100°C por 10 minutos con $167.2 \mu\text{g}$, contra 154.2 y $155.2 \mu\text{g}$ a los 20 y 30 minutos de extracción.

Tabla XXXV. Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de Phaeodactylum tricornutum a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción.

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)	microgramos de proteína extraída			
		CONC. DE NaOH			
		0.05N	0.1N	0.5N	1.0N
70	10	--	91.9	--	--
80	10	99.8	112.9	65.5	9.5
90	10	--	119.4	--	--
90	20	141.8	--	--	--
100	10	--	129.5	--	--
100	20	--	<u>171.1</u>	--	--
100	30	--	167.9	--	--

Tabla XXXVI. Cantidad de proteína extraída en μg de peso seco de Pavlova lutheri a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando diferentes temperaturas y tiempos de extracción

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)	microgramos de proteína extraída			
		CONC. DE NaOH			
		0.05N	0.1N	0.5N	1.0N
70	10	43.5	71.0	--	--
70	20	--	--	49.3	--
80	10	62.9	<u>93.4</u>	57.2	34.1
80	20	--	84.7	--	--
80	30	--	88.3	--	--
90	10	76.7	87.6	--	--
90	30	86.1	--	--	--

Tabla XXXVII. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células x μL^{-1} . C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	8	0.870	N.S.	0.05	0.08
0.50C 0.25C	8	0.320	N.S.	0.05	0.32
0.33C 0.25C	8	0.232	N.S.	0.05	0.42
0.50A 0.33A	8	0.029	*	0.05	0.91
0.50A 0.25A	8	0.0004	***	0.05	1.00
0.33A 0.25A	8	0.0006	***	0.05	1.00
0.50C 0.50A	8	0.533	N.S.	0.05	0.18
0.33C 0.33A	8	0.08	*	0.10	0.71
0.25C 0.25A	8	0.0004	***	0.05	1.00

NOTA.- Cuando en esta y en las tablas siguientes la potencia del método sea dada por una alfa de 0.10, el valor es subestimada, ya que se utilizaron las líneas de alfa 0.05 por no contarse con las de 0.10.

Tabla XXXVIII. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	8	0.100	*	0.10	0.66
0.50C 0.25C	8	0.0001	***	0.05	1.00
0.33C 0.25C	8	0.0001	***	0.05	1.00
0.50A 0.33A	8	0.456	N.S.	0.05	0.11
0.50A 0.25A	8	0.094	*	0.10	0.65
0.33A 0.25A	8	0.175	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	8	0.950	N.S.	0.05	0.06
0.33C 0.33A	8	0.081	*	0.10	0.72
0.25C 0.25A	8	0.0175	*	0.05	--

NOTA.- Cuando no aparece valor de potencia en esta y en las tablas siguientes, se debe a la falta de homogeneidad de las varianzas.

Tabla XXXIX. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.511	N.S.	0.05	0.05
0.50C 0.25C	6	0.252	N.S.	0.05	--
0.33C 0.25C	6	0.713	N.S.	0.05	--
0.50A 0.33A	6	0.284	N.S.	0.05	0.38
0.50A 0.25A	6	0.210	N.S.	0.05	0.52
0.33A 0.25A	6	0.022	*	0.05	0.98
0.50C 0.50A	6	0.255	N.S.	0.05	0.44
0.33C 0.33A	6	0.027	*	0.05	0.97
0.25C 0.25A	6	0.138	N.S.	0.05	--

Tabla XL. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.832	N.S.	0.05	0.09
0.50C 0.25C	6	0.219	N.S.	0.05	0.50
0.33C 0.25C	6	0.312	N.S.	0.05	0.38
0.50A 0.33A	6	0.097	*	0.10	--
0.50A 0.25A	6	0.038	*	0.05	0.94
0.33A 0.25A	6	0.573	N.S.	0.05	0.18
0.50C 0.50A	6	0.020	*	0.05	0.98
0.33C 0.33A	6	0.473	N.S.	0.05	--
0.25C 0.25A	6	0.115	N.S.	0.05	0.72

Tabla XLI. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.478	N.S.	0.05	0.21
0.50C 0.25C	6	0.390	N.S.	0.05	0.30
0.33C 0.25C	6	0.063	*	0.10	0.85
0.50A 0.33A	6	0.238	N.S.	0.05	0.46
0.50A 0.25A	6	0.284	N.S.	0.05	--
0.33A 0.25A	6	0.196	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	6	0.320	N.S.	0.05	--
0.33C 0.33A	6	0.347	N.S.	0.05	--
0.25C 0.25A	6	0.118	N.S.	0.05	0.70

Tabla XLII. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.787	N.S.	0.05	0.12
0.50C 0.25C	6	0.086	*	0.10	0.78
0.33C 0.25C	6	0.120	N.S.	0.05	0.68
0.50A 0.33A	6	0.077	*	0.10	0.81
0.50A 0.25A	6	0.915	N.S.	0.05	--
0.33A 0.25A	6	0.586	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	6	0.067	*	0.10	0.84
0.33C 0.33A	6	0.658	N.S.	0.05	0.15
0.25C 0.25A	6	0.584	N.S.	0.05	0.18

Tabla XLIII. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	8	0.045	*	0.05	0.85
0.50C 0.25C	8	0.277	N.S.	0.05	0.36
0.33C 0.25C	8	0.562	N.S.	0.05	0.17
0.50A 0.33A	8	0.012	*	0.05	0.98
0.50A 0.25A	8	0.288	N.S.	0.05	--
0.33A 0.25A	8	0.057	*	0.10	--
0.50C 0.50A	8	0.355	N.S.	0.05	0.29
0.33C 0.33A	8	1.000	N.S.	0.05	0.00
0.25C 0.25A	8	0.198	N.S.	0.05	0.46

Tabla XLIV. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	8	0.037	*	0.05	0.87
0.50C 0.25C	8	0.097	*	0.10	--
0.33C 0.25C	8	0.643	N.S.	0.05	0.13
0.50A 0.33A	8	0.125	N.S.	0.05	0.60
0.50A 0.25A	8	0.044	*	0.05	0.85
0.33A 0.25A	8	0.004	**	0.05	1.00
0.50C 0.50A	8	0.076	*	0.10	0.74
0.33C 0.33A	8	0.937	N.S.	0.05	0.06
0.25C 0.25A	8	0.083	*	0.10	--

Tabla XLV. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBALILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.112	N.S.	0.05	0.72
0.50C 0.25C	6	0.244	N.S.	0.05	0.48
0.33C 0.25C	6	0.632	N.S.	0.05	0.16
0.50A 0.33A	6	0.968	N.S.	0.05	--
0.50A 0.25A	6	0.484	N.S.	0.05	--
0.33A 0.25A	6	0.098	N.S.	0.10	--
0.50C 0.50A	6	0.348	N.S.	0.05	0.34
0.33C 0.33A	6	0.008	**	0.05	1.00
0.25C 0.25A	6	0.133	N.S.	0.05	--

Tabla XLVI. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.430	N.S.	0.05	0.26
0.50C 0.25C	6	0.103	*	0.10	0.74
0.33C 0.25C	6	0.182	N.S.	0.05	0.56
0.50A 0.33A	6	0.073	*	0.10	--
0.50A 0.25A	6	0.156	N.S.	0.05	--
0.33A 0.25A	6	0.071	*	0.10	--
0.50C 0.50A	6	0.084	*	0.10	--
0.33C 0.33A	6	0.736	N.S.	0.05	--
0.25C 0.25A	6	0.018	*	0.05	0.99

Tabla XLVII. Chaetoceros sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.50C 0.33C	6	0.936	N.S.	0.05	0.07
0.50C 0.25C	6	0.044	*	0.05	0.92
0.33C 0.25C	6	0.173	N.S.	0.05	0.59
0.50A 0.33A	6	0.182	N.S.	0.05	0.58
0.50A 0.25A	6	0.595	N.S.	0.05	0.18
0.33A 0.25A	6	0.157	N.S.	0.05	0.60
0.50C 0.50A	6	0.787	N.S.	0.05	0.10
0.33C 0.33A	6	0.643	N.S.	0.05	--
0.25C 0.25A	6	0.056	*	0.10	--

Tabla XLVIII. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células x μL^{-1} . C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.003	**	0.05	1.00
0.40C 0.25C	8	0.0001	***	0.05	1.00
0.30C 0.25C	8	0.0002	***	0.05	1.00
0.40A 0.30A	8	0.014	*	0.05	0.97
0.40A 0.25A	8	0.005	**	0.05	1.00
0.30A 0.25A	8	0.077	*	0.10	0.74
0.40C 0.40A	8	0.146	N.S.	0.05	0.58
0.30C 0.30A	8	0.003	**	0.05	1.00
0.25C 0.25A	8	0.0002	***	0.05	1.00

Tabla XLIX. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.006	**	0.05	0.99
0.40C 0.25C	8	0.0003	***	0.05	1.00
0.30C 0.25C	8	0.102	*	0.10	0.64
0.40A 0.30A	8	0.765	N.S.	0.05	0.10
0.40A 0.25A	8	0.983	N.S.	0.05	0.05
0.30A 0.25A	8	0.807	N.S.	0.05	0.05
0.40C 0.40A	8	0.017	*	0.05	0.96
0.30C 0.30A	8	0.918	N.S.	0.05	0.07
0.25C 0.25A	8	0.535	N.S.	0.05	--

Tabla L. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.222	N.S.	0.05	0.40
0.40C 0.25C	8	0.078	*	0.10	0.72
0.30C 0.25C	8	0.395	N.S.	0.05	0.24
0.40A 0.30A	8	0.362	N.S.	0.05	0.28
0.40A 0.25A	8	0.438	N.S.	0.05	0.20
0.30A 0.25A	8	0.895	N.S.	0.05	0.06
0.40C 0.40A	8	0.165	N.S.	0.05	0.50
0.30C 0.30A	8	0.127	N.S.	0.05	0.60
0.25C 0.25A	8	0.793	N.S.	0.05	0.09

Tabla LI. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.129	N.S.	0.05	0.60
0.40C 0.25C	8	0.275	N.S.	0.05	0.09
0.30C 0.25C	8	0.805	N.S.	0.05	0.07
0.40A 0.30A	8	0.271	N.S.	0.05	0.36
0.40A 0.25A	8	0.131	N.S.	0.05	0.60
0.30A 0.25A	8	0.093	*	0.10	--
0.40C 0.40A	8	0.353	N.S.	0.05	0.28
0.30C 0.30A	8	0.013	*	0.05	0.97
0.25C 0.25A	8	0.276	N.S.	0.05	0.36

Tabla LII. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.797	N.S.	0.05	0.09
0.40C 0.25C	8	0.938	N.S.	0.05	0.06
0.30C 0.25C	8	0.742	N.S.	0.05	0.12
0.40A 0.30A	8	0.446	N.S.	0.05	0.22
0.40A 0.25A	8	0.732	N.S.	0.05	0.11
0.30A 0.25A	8	0.358	N.S.	0.05	0.28
0.40C 0.40A	8	0.917	N.S.	0.05	0.06
0.30C 0.30A	8	0.406	N.S.	0.05	0.24
0.25C 0.25A	8	0.617	N.S.	0.05	0.17

Tabla LIII. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.696	N.S.	0.05	0.13
0.40C 0.25C	8	0.702	N.S.	0.05	0.13
0.30C 0.25C	8	0.916	N.S.	0.05	0.06
0.40A 0.30A	8	0.548	N.S.	0.05	--
0.40A 0.25A	8	0.894	N.S.	0.05	0.06
0.30A 0.25A	8	0.332	N.S.	0.05	--
0.40C 0.40A	8	0.705	N.S.	0.05	--
0.30C 0.30A	8	0.641	N.S.	0.05	0.15
0.25C 0.25A	8	0.487	N.S.	0.05	--

Tabla LIV. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.114	N.S.	0.05	--
0.40C 0.25C	8	0.209	N.S.	0.05	--
0.30C 0.25C	8	0.117	N.S.	0.05	0.68
0.40A 0.30A	8	0.649	N.S.	0.05	0.13
0.40A 0.25A	8	0.357	N.S.	0.05	0.30
0.30A 0.25A	8	0.452	N.S.	0.05	0.20
0.40C 0.40A	8	0.008	**	0.05	0.99
0.30C 0.30A	8	0.0005	***	0.05	1.00
0.25C 0.25A	8	0.011	*	0.05	--

Tabla LV. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.121	N.S.	0.05	--
0.40C 0.25C	8	0.229	N.S.	0.05	--
0.30C 0.25C	8	0.0001	***	0.05	1.00
0.40A 0.30A	8	0.933	N.S.	0.05	0.05
0.40A 0.25A	8	0.069	*	0.10	0.74
0.30A 0.25A	8	0.036	*	0.05	0.87
0.40C 0.40A	8	0.001	**	0.05	1.00
0.30C 0.30A	8	0.002	**	0.05	--
0.25C 0.25A	8	0.001	**	0.05	--

Tabla LVI. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.071	*	0.10	0.74
0.40C 0.25C	8	0.038	*	0.05	0.86
0.30C 0.25C	8	0.501	N.S.	0.05	0.22
0.40A 0.30A	8	0.008	**	0.05	0.99
0.40A 0.25A	8	0.001	**	0.05	1.00
0.30A 0.25A	8	0.207	N.S.	0.05	0.44
0.40C 0.40A	8	0.015	*	0.05	--
0.30C 0.30A	8	0.014	*	0.05	--
0.25C 0.25A	8	0.033	*	0.05	--

Tabla LVII. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.040	*	0.05	0.85
0.40C 0.25C	8	0.109	*	0.10	0.62
0.30C 0.25C	8	0.552	N.S.	0.05	0.19
0.40A 0.30A	8	0.553	N.S.	0.05	0.20
0.40A 0.25A	8	0.058	*	0.10	0.79
0.30A 0.25A	8	0.084	*	0.10	--
0.40C 0.40A	8	0.074	*	0.10	0.74
0.30C 0.30A	8	0.350	N.S.	0.05	0.28
0.25C 0.25A	8	0.047	*	0.05	0.84

Tabla LVIII. Tetraselmis sp.: Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.291	N.S.	0.05	0.34
0.40C 0.25C	8	0.733	N.S.	0.05	0.12
0.30C 0.25C	8	0.346	N.S.	0.05	0.30
0.40A 0.30A	8	0.529	N.S.	0.05	--
0.40A 0.25A	8	0.088	*	0.10	0.70
0.30A 0.25A	8	0.325	N.S.	0.05	--
0.40C 0.40A	8	0.062	*	0.10	--
0.30C 0.30A	8	0.906	N.S.	0.05	--
0.25C 0.25A	8	0.004	**	0.05	1.00

Tabla LIX. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células $\times \mu\text{L}^{-1}$. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.106	*	0.10	--
0.75C 0.50C	8	0.005	**	0.05	0.99
0.60C 0.50C	8	0.935	N.S.	0.05	0.08
0.70A 0.60A	8	0.540	N.S.	0.05	0.18
0.70A 0.50A	8	0.524	N.S.	0.05	0.18
0.60A 0.50A	8	0.973	N.S.	0.05	0.05
0.60C 0.60A	8	0.686	N.S.	0.05	0.12
0.50C 0.50A	8	0.359	N.S.	0.05	0.30

Tabla LX . Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.598	N.S.	0.05	0.14
0.75C 0.50C	8	0.409	N.S.	0.05	0.22
0.60C 0.50C	8	0.935	N.S.	0.05	0.06
0.70A 0.60A	8	0.454	N.S.	0.05	0.20
0.70A 0.50A	8	0.734	N.S.	0.05	0.11
0.60A 0.50A	8	0.748	N.S.	0.05	0.11
0.60C 0.60A	8	0.801	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	8	0.430	N.S.	0.05	0.22

Tabla LXI. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.273	N.S.	0.05	0.34
0.75C 0.50C	8	0.184	N.S.	0.05	0.48
0.60C 0.50C	8	0.877	N.S.	0.05	0.07
0.70A 0.60A	8	0.164	N.S.	0.05	0.50
0.70A 0.50A	8	0.186	N.S.	0.05	0.48
0.60A 0.50A	8	0.717	N.S.	0.05	0.10
0.60C 0.60A	8	0.863	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	8	0.474	N.S.	0.05	0.19

Tabla LXII. Phaeodactylum tricornutum. Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.483	N.S.	0.05	--
0.75C 0.50C	8	0.656	N.S.	0.05	0.12
0.60C 0.50C	8	0.366	N.S.	0.05	0.28
0.70A 0.60A	8	0.574	N.S.	0.05	0.24
0.70A 0.50A	8	0.437	N.S.	0.05	--
0.60A 0.50A	8	0.813	N.S.	0.05	0.08
0.60C 0.60A	8	0.284	N.S.	0.05	0.34
0.50C 0.50A	8	0.750	N.S.	0.05	--

Tabla LXIII. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.790	N.S.	0.05	0.09
0.75C 0.50C	8	0.826	N.S.	0.05	0.08
0.60C 0.50C	8	0.631	N.S.	0.05	0.13
0.70A 0.60A	8	0.950	N.S.	0.05	0.05
0.70A 0.50A	8	0.841	N.S.	0.05	--
0.60A 0.50A	8	0.810	N.S.	0.05	0.09
0.60C 0.60A	8	0.422	N.S.	0.05	0.22
0.50C 0.50A	8	0.139	N.S.	0.05	--

Tabla LXIV . Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.290	N.S.	0.05	0.32
0.75C 0.50C	8	0.458	N.S.	0.05	0.20
0.60C 0.50C	8	0.584	N.S.	0.05	0.15
0.70A 0.60A	8	0.250	N.S.	0.05	0.38
0.70A 0.50A	8	0.547	N.S.	0.05	--
0.60A 0.50A	8	0.851	N.S.	0.05	--
0.60C 0.60A	8	0.866	N.S.	0.05	--
0.50C 0.50A	8	0.310	N.S.	0.05	0.31

Tabla LXV . Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.114	N.S.	0.05	--
0.75C 0.50C	8	0.052	*	0.10	--
0.60C 0.50C	8	0.968	N.S.	0.05	0.05
0.70A 0.60A	8	0.083	*	0.10	0.70
0.70A 0.50A	8	0.004	**	0.05	0.99
0.60A 0.50A	8	0.060	*	0.10	0.78
0.60C 0.60A	8	0.511	N.S.	0.05	0.10
0.50C 0.50A	8	0.411	N.S.	0.05	0.22

Tabla LXVI. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.098	*	0.10	--
0.75C 0.50C	8	0.022	*	0.05	0.94
0.60C 0.50C	8	0.840	N.S.	0.05	0.07
0.70A 0.60A	8	0.071	*	0.10	0.74
0.70A 0.50A	8	0.003	**	0.05	1.00
0.60A 0.50A	8	0.045	*	0.05	0.85
0.60C 0.60A	8	0.518	N.S.	0.05	0.18
0.50C 0.50A	8	0.641	N.S.	0.05	0.13

Tabla LXVII. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.131	N.S.	0.05	--
0.75C 0.50C	8	0.015	*	0.05	0.97
0.60C 0.50C	8	0.892	N.S.	0.05	0.07
0.70A 0.60A	8	0.714	N.S.	0.05	0.10
0.70A 0.50A	8	0.194	N.S.	0.05	0.44
0.60A 0.50A	8	0.308	N.S.	0.05	0.32
0.60C 0.60C	8	0.661	N.S.	0.05	0.13
0.50C 0.50A	8	0.946	N.S.	0.05	0.05

Tabla LXVIII. Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.053	*	0.10	--
0.75C 0.50C	8	0.033	*	0.05	--
0.60C 0.50C	8	0.514	N.S.	0.05	0.19
0.70A 0.60A	8	0.091	*	0.10	--
0.70A 0.50A	8	0.0003	***	0.05	1.00
0.60A 0.50A	8	0.068	*	0.10	0.74
0.60C 0.60A	8	1.000	N.S.	0.05	0.00
0.50C 0.50A	8	0.206	N.S.	0.05	0.46

Tabla LXIX . Phaeodactylum tricornutum: Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.75C 0.60C	8	0.159	N.S.	0.05	0.52
0.75C 0.50C	8	0.284	N.S.	0.05	0.46
0.60C 0.50C	8	0.615	N.S.	0.05	0.13
0.70A 0.60A	8	0.491	N.S.	0.05	0.19
0.70A 0.50A	8	0.179	N.S.	0.05	--
0.60C 0.60A	8	0.227	N.S.	0.05	0.30
0.50C 0.50A	8	0.338	N.S.	0.05	--

Tabla LXX . Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en número de células x μL^{-1} . C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.116	N.S.	0.05	0.62
0.40C 0.25C	8	0.006	**	0.05	0.99
0.30C 0.25C	8	0.075	*	0.10	0.74
0.30A 0.25A	8	0.480	N.S.	0.05	--
0.30A 0.15A	8	0.264	N.S.	0.05	--
0.25A 0.15A	8	0.887	N.S.	0.05	0.07
0.30C 0.30A	8	0.011	*	0.05	0.98
0.25C 0.25A	8	0.035	*	0.05	0.87

Tabla LXXI. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de valores de biomasa, en μg de peso seco $\times 10^{-6}$ células. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.110	N.S.	0.05	0.62
0.40C 0.25C	8	0.400	N.S.	0.05	0.15
0.30C 0.25C	8	0.134	N.S.	0.05	0.58
0.30A 0.25A	8	0.817	N.S.	0.05	0.08
0.30A 0.15A	8	0.468	N.S.	0.05	0.19
0.25A 0.15A	8	0.386	N.S.	0.05	0.26
0.30C 0.30A	8	0.016	*	0.05	0.96
0.25C 0.25A	8	0.113	N.S.	0.05	0.62

Tabla LXXII. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de proteínas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.966	N.S.	0.05	0.05
0.40C 0.25C	8	0.133	N.S.	0.05	0.60
0.30C 0.25C	8	0.070	*	0.10	0.74
0.30A 0.25A	8	0.555	N.S.	0.05	0.18
0.30A 0.15A	8	0.197	N.S.	0.05	0.44
0.25A 0.15A	8	0.301	N.S.	0.05	0.32
0.30C 0.30A	8	0.017	*	0.05	0.96
0.25C 0.25A	8	0.524	N.S.	0.05	0.19

Tabla LXXIII. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de carbohidratos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.923	N.S.	0.05	0.06
0.40C 0.25C	8	0.325	N.S.	0.05	0.30
0.30C 0.25C	8	0.175	N.S.	0.05	0.50
0.30A 0.25A	8	0.325	N.S.	0.05	0.30
0.30A 0.15A	8	0.175	N.S.	0.05	0.50
0.25A 0.15A	8	0.445	N.S.	0.05	0.20
0.30C 0.30A	8	0.837	N.S.	0.05	0.08
0.25C 0.25A	8	0.072	*	0.10	0.74

Tabla LXXIV . Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de lípidos $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C:cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.305	N.S.	0.05	0.34
0.40C 0.25C	8	0.816	N.S.	0.05	0.08
0.30C 0.25C	8	0.355	N.S.	0.05	0.28
0.30A 0.25A	8	0.966	N.S.	0.05	0.05
0.30A 0.15A	8	0.270	N.S.	0.05	0.36
0.25A 0.15A	8	0.416	N.S.	0.05	0.24
0.30C 0.30A	8	0.100	*	0.10	0.64
0.25C 0.25A	8	0.663	N.S.	0.05	0.11

Tabla LXXV . Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de concentraciones de biomasa en μg de cenizas $\times \text{mg}^{-1}$ de peso seco. C:cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.249	N.S.	0.05	0.38
0.40C 0.25C	8	0.182	N.S.	0.05	0.48
0.30C 0.25C	8	0.972	N.S.	0.05	0.05
0.30A 0.25A	8	0.592	N.S.	0.05	0.15
0.30A 0.15A	8	0.692	N.S.	0.05	0.11
0.25A 0.15A	8	0.919	N.S.	0.05	--
0.30C 0.30A	8	0.024	*	0.05	0.92
0.25C 0.25A	8	0.021	*	0.05	--

Tabla LXXVI. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de mg de peso seco total por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.037	*	0.05	0.88
0.40C 0.25C	8	0.196	N.S.	0.05	0.42
0.30C 0.25C	8	0.131	N.S.	0.05	0.60
0.30A 0.25A	8	0.795	N.S.	0.05	0.09
0.30A 0.15A	8	0.124	N.S.	0.05	0.60
0.25A 0.15A	8	0.363	N.S.	0.05	0.28
0.30C 0.30A	8	0.131	N.S.	0.05	0.60
0.25C 0.25A	8	0.530	N.S.	0.05	--

Tabla LXXVII. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de mg de materia orgánica por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.038	*	0.05	0.86
0.40C 0.25C	8	0.292	N.S.	0.05	0.34
0.30C 0.25C	8	0.091	*	0.10	0.66
0.30A 0.25A	8	0.825	N.S.	0.05	0.08
0.30A 0.15A	8	0.116	N.S.	0.05	0.62
0.25A 0.15A	8	0.356	N.S.	0.05	0.28
0.30C 0.30A	8	0.990	N.S.	0.05	0.05
0.25C 0.25A	8	0.325	N.S.	0.05	--

Tabla LXXVIII. Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de mg de proteínas por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.035	*	0.05	0.88
0.40C 0.25C	8	0.314	N.S.	0.05	0.32
0.30C 0.25C	8	0.047	*	0.05	0.88
0.30A 0.25A	8	0.649	N.S.	0.05	0.14
0.30A 0.15A	8	0.111	N.S.	0.05	--
0.25A 0.15A	8	0.271	N.S.	0.05	--
0.30C 0.30A	8	0.170	N.S.	0.05	0.50
0.25C 0.25A	8	0.656	N.S.	0.05	--

Tabla LXXIX . Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de mg de carbohidratos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.019	*	0.05	0.95
0.40C 0.25C	8	0.096	*	0.10	0.68
0.30C 0.25C	8	0.111	N.S.	0.05	0.62
0.30A 0.25A	8	0.386	N.S.	0.05	0.24
0.30A 0.15A	8	0.060	*	0.10	--
0.25A 0.15A	8	0.135	N.S.	0.05	--
0.30C 0.30A	8	0.607	N.S.	0.05	0.13
0.25C 0.25A	8	0.060	*	0.10	0.78

Tabla LXXX . Pavlova lutheri: Comparación de medias (t de Student) de mg de lípidos por cosecha de unidad productiva. C: cultivos en el medio control; A: cultivos en el medio alternativo.

RAZONES DIL.	DATOS	PROBABILIDAD	DECISION	α	POTENCIA
0.40C 0.30C	8	0.281	N.S.	0.05	0.44
0.40C 0.25C	8	0.269	N.S.	0.05	0.46
0.30C 0.25C	8	0.847	N.S.	0.05	0.07
0.30A 0.25A	8	0.669	N.S.	0.05	0.11
0.30A 0.15A	8	0.100	*	0.10	--
0.25A 0.15A	8	0.117	N.S.	0.05	0.62
0.30C 0.30A	8	0.610	N.S.	0.05	0.15
0.25C 0.25A	8	0.208	N.S.	0.05	0.44