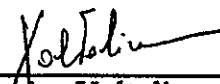


RESUMEN de la tesis de María del Pilar Sánchez Saavedra presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS en OCEANOLOGIA** con opción en **ECOLOGIA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Abril de 1994.

EFFECTO DE LA LUZ AZUL SOBRE EL CRECIMIENTO, LA COMPOSICION BIOQUIMICA Y EL VALOR ALIMENTICIO DE *Chaetoceros* sp. (BACILLARIOPHYCEAE).

Resumen aprobado por:

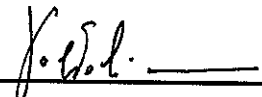

Dr. Domenico Voltolina
Director de Tesis

Se mantuvieron cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. en condiciones óptimas de producción de biomasa que, con base en experimentos con diferentes porcentajes de dilución diaria, de concentración de nutrientes y con diferentes cantidades de tres tipos de luz, resultaron ser: dilución diaria del 50%, medio f y $565 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ para la luz azul y luz azul mezclada con luz ambiental del laboratorio, y de $498 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ para luz blanca. Bajo estas condiciones experimentales, se encontró que para los dos tipos de luz azul se obtiene una concentración de células relativamente menor, y que éstas tienen un mayor contenido proteínico comparativamente con lo obtenido en luz blanca. Respecto a los componentes bioquímicos, la ruta del carbono resultó ser siempre diferente: en luz azul mezclada, la concentración de los carbohidratos permaneció muy baja y el aumento de proteínas fue a expensas de los lípidos. Con luz azul pura se evaluó el mismo efecto para las proteínas, pero una fracción importante del carbono fue almacenada como carbohidratos. Las diferencias en la cantidad de los constituyentes celulares para los dos tipos de luz son aparentemente causada por la pequeña contribución de la luz ambiental ($6.5 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$), y son posiblemente debidas al contenido energético ligeramente diferente (149 W m^{-2} comparado a 147 W m^{-2} para luz azul y mezclada, respectivamente).


Los perfiles de aminoácidos corresponden cualitativamente a la mayoría de los datos de literatura sobre la composición de proteínas unicelulares, con algunas diferencias según el tipo de luz. En particular el contenido de metionina fue superior en la luz azul mezclada. El porcentaje de ácidos grasos insaturados resultó ligeramente superior en la luz azul; los porcentajes de ácido esteárico y oléico fueron cerca de un orden de magnitud mayores en la luz azul, mientras que los ácidos linoléico y linolénico tuvieron concentraciones relativas más altas en la luz blanca y la luz azul mezclada.

Las microalgas producidas con los dos tipos de luz azul resultaron más eficientes como dietas para *Artemia franciscana* que las obtenidas en la luz blanca, por lo que se refiere a la velocidad de crecimiento, al tiempo necesario para alcanzar las distintas etapas de vida, a la sobrevivencia y a la composición proximal de los organismos.


TESIS DEFENDIDA POR: **MARIA DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA**
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:




DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA.- Director del Comité



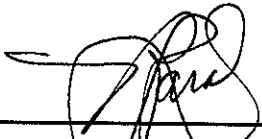
DR. LUIS FERNANDO BÜCKLE RAMIREZ.- Miembro del Comité



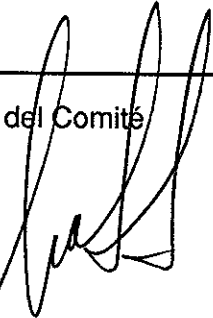
DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ.- Miembro del Comité



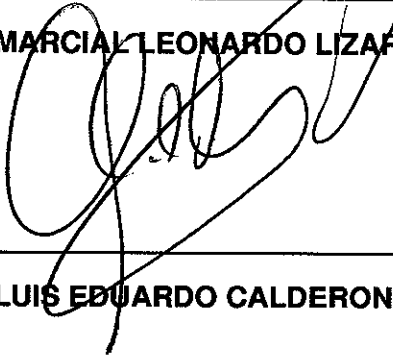
DR. MARIO MARTINEZ GARCIA.- Miembro del Comité



DR. RUBEN LARA LARA.- Miembro del Comité



DR. MARCIAL LEONARDO LIZARRAGA PARTIDA.- Jefe Depto. Ecología



DR. LUIS EDUARDO CALDERON AGUILERA.- Director de Estudios de Posgrado

13 DE JUNIO DE 1994



**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA**

**DIVISION DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

**EFFECTO DE LA LUZ AZUL SOBRE EL CRECIMIENTO, LA COMPOSICION
BIOQUIMICA Y EL VALOR ALIMENTICIO DE *Chaetoceros* sp.
(BACILLARIOPHYCEAE).**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para
obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS.**

Presenta:

MARIA DEL PILAR SANCHEZ SAAVEDRA

Ensenada, Baja California, Junio de 1994.

DEDICATORIA

A Teresa por ser mi
continua compañera durante
todo este tiempo, por tu
paciencia, colaboración e
inquietud por aprender.

A Ana Luisa porque con
tu sonrisa me diste ánimos de
seguir cuando me sentí
cansada.

A Guillermo por tu continuo
amor y paciencia que me tuviste.

A mi madre por
enseñarme a ser fuerte en las
buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis Dr. Domenico Voltolina, por su amistad, apoyo, asesoramiento, por sus continuas enseñanzas brindadas durante la realización de este trabajo y por ser un modelo a seguir en la investigación.

A los miembros de mi Comité de Tesis: Dra. Czesia Nalewajko, Dr. Jorge de la Rosa Velez, Dr. Rubén Lara Lara, Dr. Mario Martínez García y Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, por sus valiosas sugerencias durante el transcurso del trabajo.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por sus continuas enseñanzas brindadas a través de estos años de amistad.

Al Dr. Alejandro Chagoya Guzmán por ser un maestro que marcó una gran huella en mi vida.

A la Dra. Czesia Nalewajko, por su actitud amistosa y colaboradora, por haber organizado para mi y mis compañeras un curso de técnicas fisiológicas y bioquímicas en su laboratorio. Por la ayuda en la determinación de los espectros de emisión y la cantidad de energía proveída por las lámparas.

Al M. en C. David Salazar del Departamento de Optica del C.I.C.E.S.E., por su ayuda en la determinación de los espectros de emisión.

A la Dra. Silvia Ibarra Obando y a la Oc. Miriam Poumian, por permitirme utilizar el liofilizador y por su actitud colaboradora.

A la Dra. Diana Tentori Santacruz, por su ayuda en la interpretación de los espectros de emisión y por permitir el uso de los instrumentos de medición de los espectros de luz.

Al Dr. Helmut Maske por sus valiosas sugerencias y recomendaciones brindadas a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera y a la Ing. Margarita Jauregui por su ayuda en los trámites escolares.

Al Dibujante Jose María Dominguez Olachea, por su valiosa ayuda en la elaboración de las figuras de este trabajo.

A la Biól. Pesq. Patricia Soto Saenz y al M. en C. Arnulfo Hernandez por introducirme en el "mundo de las microcomputadoras".

A los Técnicos Biól. Norberto Flores Acevedo y Francisco Valenzuela Buriel, por su ayuda en el mantenimiento y reparación del equipo de laboratorio.

A Oc. Eduardo Roberto Morales Guerrero, por sus asesorías en el manejo del procesador de textos en la escritura de esta tesis.

A la M. en C. María de Lourdes Trujillo Valle por facilitarme cepas de las especies de microalgas que necesité durante la fase experimental de mi trabajo.

A mi Técnico particular Cand. M. en C. Guillermo Díaz de Cossio Batani, por su continuo apoyo profesional para la digitalización de los espectros de absorción y elaboración de algunas figuras, moral y económico brindados en el transcurso del trabajo, y también por colaborar en los quehaceres domésticos.

A Karla Margarita López Cubillas, por su valiosa ayuda durante la escritura del trabajo y también por colaborar en el laboratorio cuando así fue necesario.

A María Elena Corona por su actitud colaboradora y ayuda en las cuestiones de ortografía y problemas del procesador de textos.

A la M. en C. Beatriz Cordero Esquivel, al M. en C. Benjamín Barón Sevilla y a la M. en C. Carmen Guadalupe Paniagua Chavez porque juntos colaboramos en la elaboración de algunas de las curvas de calibración utilizadas para las determinaciones bioquímicas.

A Amparo y Lew Riley por su continuo apoyo incondicional tanto moral y económicamente.

A todo el personal de la guardería del C.I.C.E.S.E.: Ana López Vacaro, María Jesus Ramírez Valenzuela, Guadalupe Galicia Rivera, Guadalupe Lomas Villalpando (Q.P.D.), Eulalia Guadalupe Aguirre Lomas, Angelina Del Rio Arce, Sara María de Lourdes Vargas Aburto, Margarita García Rocha y Blanca Leon Zumaya, por haber realizado el papel de "mamás" para mis hijas mientras que trabaje en esta tesis, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible que me dedicara a mis estudios.

Al Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E., por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios superiores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico de una beca crédito obtenida durante mis estudios de post-grado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por apoyarme para asistir a cursos fuera del país y por otorgarme una beca de manutención.

A quienes nunca me abandonaron: Maruchan, Campbell's, Huggies, Beach Nuts, Gerber y ese fiel abrelatas que todavía no se cansó.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
	I.1 OBJETIVOS	8
	I.1.a. OBJETIVO GENERAL	8
	I.1.b. OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
II.	MATERIALES Y METODOS	9
	II.1. MICROALGAS	9
	II.2. CARACTERISTICAS DE LAS LAMPARAS	9
	II.3. EFECTO DEL TIPO DE ILUMINACION	10
	II.3.a. SATURACION DE LUZ EN FRASCOS ERLLENMEYER: SELECCION DE UNA ESPECIE	12
	II.4. CULTIVOS SEMI-CONTINUOS	14
	II.4.a. PORCENTAJE DE DILUCION	14
	II.4.b. SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA	15
	II.4.c. CONCENTRACION DE NUTRIENTES	16
	II.5. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS Y PERFILES DE AMINOACIDOS Y DE ACIDOS GRASOS PARA <i>Chaetoceros</i> sp.	16
	II.6. BIOENSAYO DE ALIMENTACION	18
III.	RESULTADOS	20
	III.1. SATURACION DE LUZ EN FRASCOS ERLLENMEYER: SELECCION DE UNA ESPECIE	20
	III.1.a. <i>Chaetoceros</i> sp.	20
	III.1.b. <i>S. costatum</i>	23

III.1.c.	<i>T. pseudonana</i>	25
III.1.d.	SELECCION DE UNA ESPECIE	27
III.2.	CULTIVOS SEMICONTINUOS DE <i>Chaetoceros</i> sp.	27
III.2.a.	PORCENTAJE DE DILUCION	27
III.2.b.	SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA	33
III.2.c.	CONCENTRACION DE NUTRIENTES	38
III.3.	COMPOSICION DE <i>Chaetoceros</i> sp.	41
III.3.a.	PIGMENTOS	41
III.3.b.	COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS	45
III.4.	BIOENSAYO DE ALIMENTACION	49
III.4.a.	VARIACIONES EN LA COMPOSICION PROXIMAL DE <i>Chaetoceros</i> sp. POR EFECTO DEL CAMBIO DE IRRADIANCIA Y DEL TIPO DE LUZ	49
III.4.b.	CRECIMIENTO DE <i>Artemia</i>	54
III.4.c.	COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS DE <i>Artemia</i>	61
IV.	DISCUSION	65
IV.1.	CULTIVOS EN FRASCOS ERLLENMEYER	65
IV.2.	CULTIVOS SEMICONTINUOS	66
IV.2.a.	PORCENTAJE DE DILUCION	66
IV.2.b.	SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA	67

IV.2.c	CONCENTRACION DE NUTRIENTES	68
IV.3.	COMPOSICION DE <i>Chaetoceros</i> sp.	69
IV.3.a.	PIGMENTOS	69
IV.3.b.	COMPOSICION PROXIMAL	71
IV.3.c.	COMPOSICION BIOQUIMICA	74
IV.3.d.	CONSIDERACIONES PRACTICAS	75
IV.4.	BIOENSAYO DE ALIMENTACION	76
IV.4.a	VARIACIONES EN LA COMPOSICION PROXIMAL DE <i>Chaetoceros</i> sp. POR EFECTO DEL CAMBIO DE IRRADIANCIA Y DEL TIPO DE LUZ	76
IV.4.b	CRECIMIENTO DE <i>Artemia</i>	76
IV.4.c	COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS DE <i>Artemia</i>	78
V.	CONCLUSIONES	80
VI.	LITERATURA CITADA	81

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Rutas principales del carbono para el fitoplancton. Abreviaciones: PCRC: Ciclo fotosintético de la reducción del carbono. PGA: 3-fosfoglicerato. PEP: Fosfoenolpiruvato. OAA: Oxaloacetato. A Co A: Acetil coenzima A (Modificada de Raven y Beardall, 1981).	4
2	Espectro de emisión (en unidades relativas) de las tres fuentes de luz. A: luz blanca; B: (—) luz azul; (----) luz azul mezclada; (—) luz ambiental; nm: nanómetros.	11
3	Espectros de absorción en vivo (V) y con extracción (E) para <i>Chaetoceros</i> sp. mantenido en cultivos semicontinuos con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	42
4	Porcentaje de cambio de cada uno de los constituyentes celulares evaluados al efectuar un cambio de irradiancia y del tipo de iluminación. A: número de células ml^{-1} , B: proteínas, C: lípidos y D: carbohidratos. Luz azul en cuadros, luz azul mezclada en asterisco y luz blanca en triángulos.	55
5	Curvas de crecimiento para <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado con luz azul (A), azul mezclada (B) y blanca (C).	60

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Valores promedio de la irradiancia medida en la parte central de la base de los frascos Erlenmeyer mantenidos con diferente número de lámparas de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB) expresados como $q\text{ s}^{-1}\text{ cm}^{-2}$, $\text{mols s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ y W m^{-2} .	12
II	Valores promedios de la irradiancia medida en la parte central de la base de los garrafrones empleados para los cultivos semicontinuos y mantenidos con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	15
III	Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estandar durante la fase de crecimiento exponencial de <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	20
IV	Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial para los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp., en diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.	21
V	Valores promedios (en paréntesis: desviación estándar) del número de células ($\text{cél } 10^3\text{ ml}^{-1}$) estimado al final de la fase de crecimiento exponencial, para las tres especies de microalgas mantenidas en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), luz azul mezclada (LM) y luz blanca (LB). Letras iguales indican falta de diferencias significativas entre los valores obtenidos en el gradiente de cada tipo de luz (prueba "t" de diferencias de medias; $\alpha=0.05$).	22
VI	Valores promedios (en paréntesis : desviación estándar) de la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial (μ) de las tres especies de microalgas mantenidas en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB) y resultados de la prueba "t" de diferencia de medias ($\alpha=0.05$). Las letras iguales indican falta de diferencia al nivel de significancia indicado.	23
VII	Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial de <i>S. costatum</i> cultivada en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	23

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
VIII	Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial para <i>S. costatum</i> , cultivada bajo diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.	24
IX	Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial de <i>T. pseudonana</i> cultivada en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	25
X	Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial para los cultivos de <i>T. pseudonana</i> , en diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.	26
XI	Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente, para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. con una dilución diaria de 40 % (A) y de 75 % (B) en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$.	28
XII	Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente durante dos ensayos de cultivo semicontinuo (A y B) de <i>Chaetoceros</i> sp. con una dilución diaria de 50 % en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$ o 0.1 (+).	30
XIII	Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente en los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. con una dilución diaria del 60% en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$.	31

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XIV	Valores promedios y desviación estándar (D.E.) del número de células para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos con los diferentes porcentajes de dilución ensayados para los tres tipos de luz. A y B, primer y segundo ensayo con una dilución de 50 % cada 24 horas. C, dilución de 50 % cada 12 horas.	32
XV	Análisis de varianza de una vía entre los valores de densidad óptica medidos durante la fase de estabilidad de los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos con una dilución del 50% por día y expuestos a luz azul, azul mezclada y blanca. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.	33
XVI	Resumen de las pruebas de significancia de la pendiente de la regresión ($b=0$) entre los valores de densidad óptica medida diariamente y la edad del cultivo (en días), para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos con distintos tipos de luz e irradiancias.	34
XVII	Valores promedios y desviación estándar del número de células ($\text{cél} \cdot 10^6 \text{ml}^{-1}$), para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos bajo diferentes condiciones de cultivo y tres tipos de luz: luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	35
XVIII	Análisis de varianza de dos vías para el número de células, microgramos del peso orgánico seco y peso de las cenizas por millón de células para los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos en un gradiente de irradiancia de luz azul, azul mezclada y blanca.	36
XIX	Valores promedios y desviación estándar del número de células, del peso seco y del peso de las cenizas (en μg por millón de células) para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp., mantenidos con una dilución del 50% por día en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.	37
XX	Valores promedios (en paréntesis: desviación estándar) del número de células ($\text{cél} \cdot 10^6 \text{ml}^{-1}$) y porcentaje de proteínas (en % del peso seco total) para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos en dos diferentes concentraciones de nutrientes y con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	39

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XXI	Valores promedios del peso seco por carboy (mg por carboy) porcentaje de proteínas y contenido de nitrógeno proteico (mg N proteico por carboy) para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp., mantenidos con una dilución del 50% por día en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.	40
XXII	Valores promedios y desviación estándar del contenido de clorofilas (a, b y c), y de carotenoides (expresados en $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco), para los cultivos semicontinuos mantenidos en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.	43
XXIII	Análisis de varianza de dos vías para el contenido de clorofilas (a, b y c) y carotenoides estimados para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp., mantenidos en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.	44
XXIV	Valores promedios y desviación estándar (en porcentaje del peso seco total) de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas para los cultivos semicontinuos de <i>Chaetoceros</i> sp., mantenidos a una dilución del 50% por día y en un gradiente de irradiancia de tres tipos de luz.	46
XXV	Análisis de varianza de dos vías ($\alpha=0.05$) para las fracciones bioquímicas de <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado en un gradiente de irradiancia de luz azul, azul mezclada y blanca.	47
XXVI	Contenido de aminoácidos (en % de aminoácidos totales) de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenido en cultivo semicontinuo con porcentaje de dilución diaria de 50 %. LA y LM: $565 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz azul y azul mezclada, respectivamente. LB: $498 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz blanca.	48
XXVII	Contenido de ácidos grasos (en % de ácidos grasos totales) de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenido en cultivo semicontinuo con un porcentaje de dilución diaria de 50 %. LA y LM: $565 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz azul y azul mezclada, respectivamente. LB: $498 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz blanca.	50

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XXVIII	Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz azul o expuestos a $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de luz blanca.	51
XXIX	Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz azul mezclada, o expuestos a $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de luz blanca.	52
XXX	Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz blanca, o expuestos a $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de luz blanca.	53
XXXI	Valores de nivel de significancia del análisis de varianza de una vía realizada por cada día con las tres repeticiones de cada tratamiento, con los datos de longitud de <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. mantenido en tres tipos de luz.	56
XXXII	Valores promedios (X), desviación estándar (DE) y comparación a posteriori vía "LSD" ($\alpha=0.05$), de los valores de talla promedio (en μm) para los diferentes estadios de <i>Artemia franciscana</i> , alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	57
XXXIII	Análisis de varianza de una vía ($\alpha=0.05$) con los valores de la talla promedio (μm) de los diferentes estadios de <i>Artemia franciscana</i> , alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado con diferentes tipos de luz.	58

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XXXIV	Caracterización por estadio de vida y porcentaje de sobrevivencia (%S) para <i>Artemia franciscana</i> , alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). N: Nauplio, M: Metanauplio, J: Juvenil, A: Adulto, FP: Formación de parejas.	59
XXXV	Valores de peso seco promedio (en mg) de cien individuos de <i>A. franciscana</i> (A) y su composición proximal (B), alimentados con <i>Chaetoceros</i> sp., proveniente de los cultivos semicontinuos expuestos a luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).	61
XXXVI	Contenido de aminoácidos (en % de aminoácidos totales) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp., proveniente de cultivos semicontinuos expuestos a luz azul, luz azul mezclada y luz blanca.	63
XXXVII	Contenido de ácidos grasos (expresados en porcentajes del total) de <i>A. franciscana</i> alimentada con <i>Chaetoceros</i> sp., proveniente de cultivos semicontinuos expuestos a luz azul, azul mezclada y luz blanca.	64

EFFECTO DE LA LUZ AZUL SOBRE EL CRECIMIENTO, LA COMPOSICION BIOQUIMICA Y EL VALOR ALIMENTICIO DE *Chaetoceros* sp. (BACILLARIOPHYCEAE).

I. INTRODUCCION

La radiación electromagnética emitida por el sol se describe cualitativamente por su composición espectral (calidad de luz), o sea por las varias longitudes de onda que la componen. La luz visible es una pequeña fracción de ese espectro, y los organismos fotosintéticos pueden usar solamente las longitudes de onda que activan su sistema de captación, constituido por un conjunto de estructuras y pigmentos fotosintéticos (Margalef, 1967; Lips y Avissar, 1986). La radiación fotosintéticamente disponible, comúnmente abreviada como PAR, comprende la banda de 400 a 700 nm (nanómetros) y representa el 50 % de la radiación que llega a la superficie de la tierra (Kirk, 1983).

Se ha dado mucha atención al efecto de la luz sobre el fitoplancton marino: se estudió la relación entre la intensidad de luz y la razón de fotosíntesis (Steemann-Nielsen, 1975; Yentsch, 1980; Platt *et al.*, 1980), el efecto de los diferentes ciclos de disponibilidad de la luz (Brand y Guillard, 1981), los mecanismos de adaptación a la luz y a la sombra (Falkowski y Owens, 1980; Richardson *et al.*, 1983) y la respuesta a los estímulos luminosos en el metabolismo celular de las microalgas (Prézelin, 1981).

En cambio, la calidad de luz y sus efectos sobre la composición bioquímica de las microalgas es un tema relativamente poco estudiado. Los trabajos realizados en este campo se han encaminado principalmente a evaluar los cambios en los pigmentos fotosintéticos y las alteraciones morfológicas en las estructuras fotosintéticas (Hauschild *et al.*, 1962 a y b; Pirson y Kowallik, 1960 y 1964; Jeffrey y Veski, 1977; Veski y Jeffrey, 1977; Faust *et al.*, 1982).

Durante los últimos treinta años se han reportado diferencias en el contenido de carbohidratos y proteínas de plantas superiores y algas expuestas a la luz de diferentes longitudes de onda. Aunque los resultados tienen que aceptarse con algunas reservas, ya que muchos de estos experimentos tomaron en consideración la calidad, pero no la intensidad de la luz (Kowallik, 1987), con varios de estos ensayos se demostró que la luz roja, verde y azul podrían tener efectos muy diferentes sobre los organismos (Humphrey, 1983).

Entre los primeros trabajos publicados en esta línea de investigación, los de Voskresenskaya en 1952 y 1953 (citados por Senger, 1987) mencionan que las variaciones en la composición espectral de

la luz pueden modificar varios procesos fisiológicos de organismos fotosintéticos y no fotosintéticos. A partir de estas experiencias muchos autores enfocaron su atención al efecto específico de la luz azul (Senger, 1980; 1984; 1987).

Las algas marinas tienen diversos tipos de respuestas a la luz azul. Dring (1987) refiere una breve y completa descripción de los principales tipos de respuesta (s):

- 1) Respuestas de fotoorientación: En este grupo se incluyen reacciones de fototropismo, fototactismo, inducción a la polaridad y desplazamiento de cromatóforos.
- 2) Respuestas metabólicas: Cambios en el metabolismo de proteínas y carbohidratos, de actividad enzimática o en el contenido (cuali y cuantitativo) de pigmentos.
- 3) Respuestas de desarrollo: Variaciones en el desarrollo vegetativo o en el desarrollo reproductivo.
- 4) Respuestas de fotoperiodicidad: Cuando la magnitud del cambio está determinada por el tiempo de exposición.

Los trabajos recientes con algas unicelulares confirman que cuando se generan variaciones en la longitud de onda se pueden alterar los siguientes procesos:

- 1) Síntesis de proteínas, DNA, RNA y pigmentos (Wallen y Geen, 1971 a y b; Faust *et al.*, 1982; Humphrey, 1983; Thompson *et al.*, 1990; Turpin, 1991; Kamiya *et al.*, 1991; López-Figueroa, 1991).
- 2) Fotosíntesis y crecimiento (Wallen y Geen, 1971 a; Holdsworth, 1985; Dring, 1982 y 1986; Olaizola y Duerr, 1990; Hauschild *et al.*, 1991; Ojala, 1993).
- 3) Productos extracelulares (Wallen y Geen, 1971 a; Birmingham, 1979).
- 4) Actividad enzimática (Ruyters, 1980; Duke *et al.*, 1986).

Los trabajos realizados sobre el efecto fisiológico de la luz azul mencionan que ésta juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo celular del carbono. Se sabe que la luz azul, comparada con la luz verde o roja, incrementa la síntesis de ácidos tricarbóxicos, independientemente de la fotosíntesis. La luz azul también produce un incremento en la carboxilación, atribuyéndose este fenómeno a una mayor producción de enzimas (carboxilasas) para la utilización del fosfoenol piruvato (PEP). Como un resultado de la carboxilación del PEP, se forma piruvato y se incrementa también la producción de la piruvato kinasa, formándose el oxaloacetato (OAA) por una reducción parcial del malato y otra porción es convertida a aspartato. El oxaloacetato sirve también como reserva para la

continua regeneración de las reacciones del ciclo de Krebs, permitiendo la síntesis de glutamato (Fig. 1). Por medio de isótopos marcados se ha podido determinar que por efecto de la luz azul se produce una mayor cantidad de alanina. Con este mecanismo aumenta el aspartato como precursor de proteínas; la predominancia de esta ruta sobre la de síntesis de azúcares, tiene como consecuencia un mayor gasto energético para poder formar carbohidratos de reserva (Kowallik, 1970; Voskresenskaya, 1972; Raven, 1974; Kamiya y Miyachi, 1975; Ruyters, 1980).

Cuando la irradiancia es suficiente para la activación del ciclo de Calvin (Fig. 1), la incorporación de aminoácidos es estable pero, debido al proceso ya descrito, es mayor en presencia de luz azul que en luz roja. Si la cantidad de luz no es suficiente para la fotosíntesis, a diferencia de la luz roja, la luz azul tiene el efecto de activar (acelerar) el proceso de utilización de los carbohidratos de reserva (Ogasawara y Miyachi, 1970; Voskresenskaya, 1972).

Todas las reacciones metabólicas son catalizadas por enzimas, que son consideradas como los reguladores más probables de los cambios metabólicos producidos por el efecto de la calidad de la luz, por lo que tienen que tener un papel muy importante en la secuencia de la percepción de la luz, transducción y respuestas metabólicas (Ruyters, 1984 y 1987; Kulandaivelu y Sorojini, 1980). La magnitud y la naturaleza del tipo de cambio producido en este proceso está en función de los cofactores y efectores intermedios. Una prueba indirecta más del efecto de la luz azul sobre la actividad de varias enzimas es, que la luz azul también cambia la permeabilidad de las membranas, y que su principal efecto es el de incrementar o facilitar el paso de iones y/o metabolitos intracelularmente, que son procesos regulados enzimáticamente (Syrett, 1981; Widell y Larson, 1984).

En cultivos sincronizados de *Chlorella* en presencia de luz roja y luz azul se demostró que tenían la misma producción neta en biomasa estimada como peso seco, pero con luz azul se obtuvo un mayor contenido de proteínas y de RNA (ácido ribonucleico), mientras que las células cultivadas con luz roja concentraron una mayor cantidad de carbohidratos (Pirson y Kowallik, 1964). En este experimento, el efecto de la diferencia espectral resultó ser independiente de la fuente de nitrógeno utilizada (nitrato, amonía y urea) lo cual indicaría que para esta alga la luz no afecta los procesos de utilización de fuentes nitrogenadas.

Por otro lado, diversos autores han encontrado que para otras algas verdes el metabolismo del nitrógeno es dependiente de la luz por que aumenta la actividad de las enzimas nitrato y nitrato

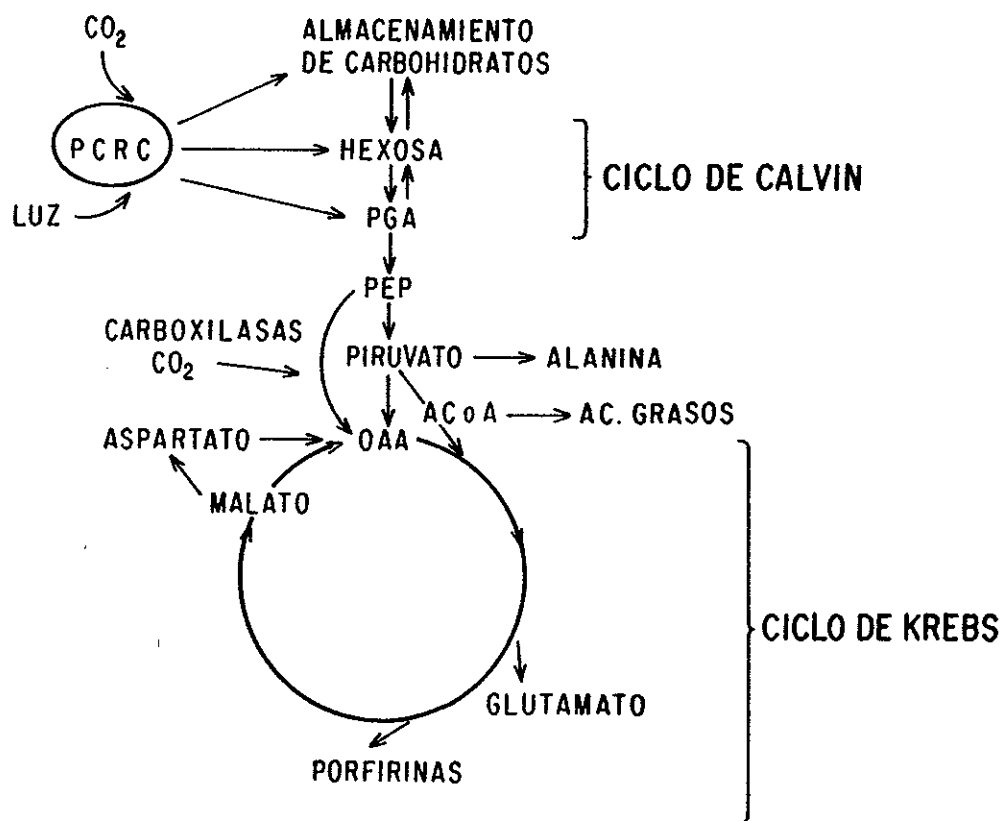


Figura 1. Rutas principales del carbono para el fitoplancton. Abreviaciones: PCRC: Ciclo fotosintético de la reducción del carbono. PGA: 3-fosfoglicerato. PEP: Fosfoenolpiruvato. OAA: Oxaloacetato. A Co A: Acetil coenzima A (Modificada de Raven y Beardall, 1981).

reductasa (Aparicio *et al.*, 1976; Schopfer, 1977; Azuara y Aparicio, 1983). Sin embargo, acerca del efecto de la luz monocromática en el metabolismo del nitrógeno no existen datos conclusivos (López-Figueroa y Rüdinger, 1991).

También se ha investigado el efecto combinado de la calidad y de la intensidad de la luz en relación al metabolismo celular. Glover *et al.* (1987), al estudiar diversos clones de fitoplancton, encontraron que la eficiencia de la fotosíntesis es mayor para las células más pequeñas y que el ultraplancton fotosintetiza y crece más rápidamente en luz azul y azul-violeta. Rivkin (1989) reporta que la irradiancia y la composición espectral tienen un efecto significativo en la composición química de *Thalassiosira rotula* Meunier y de *Dunaliella tertiolecta* Butcher y encontró que en ambas especies la síntesis de proteínas, clorofila y polisacáridos fueron mayores para altas irradiancias de luz azul y roja, comparativamente a la luz blanca.

Este tipo de estudios son importantes no solamente para un mejor conocimiento de los procesos biosintéticos sino que también para conocer las diferentes respuestas adaptativas de los organismos. Entre otros enfoques este tipo de investigaciones puede aplicarse en el área de la acuicultura. Muchos de los trabajos efectuados con luz azul se realizaron en sistemas de cultivo estáticos (batch) de volumen limitado, con bajas concentraciones celulares y con menores irradiancias, en tanto que los sistemas de producción para la acuicultura generalmente se mantienen con la técnica de cultivo semicontinuo, con altas concentraciones celulares y mayores irradiancias.

Una utilización práctica de los estudios del efecto de la calidad de luz en esta área podrían ayudar a mejorar la composición bioquímica y la velocidad de crecimiento de ciertas especies de microalgas, mejorando las expectativas de alimentación de larvas y adultos de especies filtroalimentadoras de interés en la acuicultura.

Para la diatomea *Thalassiosira pseudonana* Hasle y Heimdal, Flaak y Epifanio (1978) ensayaron el efecto de tres tipos de iluminación: Agro-lite (con picos de emisión entre 430-450 nm y 550-720 nm), luz azul (430-450 nm) y luz blanca (430-450 nm y 550-620 nm), y compararon las velocidades de crecimiento, el contenido proteínico y el valor alimenticio de esta microalga proporcionada a ostras adultas. Encontraron que esta microalga tiene una velocidad de crecimiento similar en los cultivos mantenidos en luz blanca y azul y que el crecimiento es inferior en agro-lite. El contenido de proteínas varió según el patrón esperado: una alta cantidad durante la fase de crecimiento exponencial, comparativamente a la fase estacionaria, con valores mayores para luz azul y menores en agro-lite y

luz blanca respectivamente. Los resultados del experimento de alimentación indicaron que el valor nutricional de la microalga está directamente relacionado con la proporción de C/N para cada condición experimental. En las microalgas cultivadas con luz blanca y cosechadas durante la fase de crecimiento estacionario, se detectó una mayor relación C/N y dieron un mayor crecimiento tanto en la concha como en el tejido de las ostras y una mayor producción de glicógeno después de 10 semanas de experimentación. Se observó también que la calidad de la luz y la fase del cultivo modifican el tamaño de las células y que las ostras adultas alimentadas con las microalgas cultivadas con luz azul obtenían un tamaño inferior a las que fueron alimentadas con los otros cultivos. Es importante resaltar que en la literatura científica solo este trabajo explora la posibilidad de obtener alimento vivo de diferentes calidades para el cultivo de filtroalimentadores, manteniendo una misma microalga bajo diferentes condiciones de luz, y es probable que este resultado negativo sea el motivo de que no se haya seguido con este tipo de estudios. Sin embargo, debido a las diferentes respuestas de las microalgas a los cambios en la calidad de luz, aún dentro del mismo grupo taxonómico, y a las diferentes exigencias dietéticas de los organismos cultivados, no se puede descartar la posibilidad de utilizar el efecto de la calidad de luz para mejorar el valor nutricional de las microalgas, por lo menos para algunos organismos o para algunos de sus estadios de desarrollo.

Por lo mencionado con anterioridad se plantea como objetivo de este trabajo, la selección de una microalga cuyas características de crecimiento en cultivo estático respondan al patrón general de respuesta esperado en luz azul, para estudiar el efecto de este tipo de luz sobre la composición y la calidad dietética de la biomasa producida en condiciones de cultivo compatibles con los fines de producción a nivel comercial.

Dentro del área de la acuicultura la producción de zooplancton es un renglón muy importante para la alimentación de los organismos cultivados. Entre los varios organismos zooplanctónicos, el crustáceo anostraco (subclase Branchiopoda) *Artemia* spp. ha sido ampliamente utilizado en la acuicultura para la alimentación de los estadios larvales y adultos de peces y crustáceos de alto valor económico, que por sus hábitos alimenticios requieren de alimento vivo y con un alto valor nutritivo (Sorgeloos y Persoone, 1975; Venhaecke y Sorgeloos, 1983). También se ha utilizado en laboratorio para alimentar organismos muy diversos como foraminíferos, celenterados, platelmintos, poliquetos, cnidarios, insectos y quetognatos (Léger *et al.*, 1986).

Con este panorama de utilización, es obvio que este organismo debe ser cultivado en forma tal que mantenga o mejore su calidad dietética y por ésto es importante alimentarlo adecuadamente. Se

han enlistado varias especies de microalgas con distinto valor dietético que han sido suministradas a los diferentes estadios de vida de *Artemia*, por lo que se han evaluado diferentes respuestas en el crecimiento de este organismo (Sick, 1976; Watanabe *et al.*, 1978; Castro y Gallardo, 1980; Sorgeloos, 1985).

En consecuencia en este trabajo se decidió utilizar este organismo en un bioensayo de alimentación, al que se le suministró una especie de microalga con distinta composición bioquímica obtenida al mantener los cultivos en exposición a diferentes calidades de luz; la respuesta se evaluó con el crecimiento de las distintas etapas de desarrollo de *Artemia* y averiguando la calidad de la biomasa producida.

I.1 OBJETIVOS

I.1.a. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la luz azul, en comparación con la luz blanca, sobre la composición proximal y bioquímica y el valor dietético de una especie de diatomea utilizada comúnmente en la acuicultura y cultivada con una técnica que permita obtener una producción de biomasa adecuada para fines prácticos.

I.1.b. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Seleccionar de entre algunas especies de microalgas de interés en la acuicultura (*Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* Cleve y *Thalassiosira pseudonana* Hasle y Heimdal (3H)), una cuyo comportamiento responda a un patrón de respuesta esperado al exponerla a la luz azul, y que resulte de la evaluación del efecto de la calidad de luz sobre la velocidad de crecimiento de cultivos estáticos de cada especie, mantenidos en gradientes de cada tipo de luz, con el fin de averiguar que la respuesta no haya sido afectada por la irradiancia disponible.

Determinar el porcentaje de dilución adecuada para obtener una alta producción de biomasa con cultivos semicontinuos de la especie de microalga seleccionada.

Estimar el punto de irradiancia en donde un aumento en la cantidad de luz, no resulte en un incremento de producción de biomasa para los cultivos semicontinuos mantenidos con el porcentaje de dilución previamente determinada.

Determinar el efecto de los diferentes tipos de luz y de las irradiancias para producir el máximo posible de biomasa, y evaluar la composición bioquímica de la microalga seleccionada.

Medir el efecto de estos cambios sobre el valor alimenticio de las microalgas cultivadas, por medio de bioensayos con *Artemia franciscana* Kellogg, 1906.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. MICROALGAS

Las microalgas utilizadas en este trabajo son todas diatomeas, que por sus características de rápido crecimiento y de fácil adaptación a las condiciones de cultivo usuales, además de su tamaño conveniente y su adecuado valor nutritivo, son ampliamente utilizadas en la acuicultura para la alimentación de organismos filtradores. Todas están depositadas en la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E., en donde se recoge también toda la información recabada de cada cepa por los varios usuarios de la colección (Trujillo-Valle, 1993).

Chaetoceros sp. es una especie costera aislada localmente que se encuentra depositada en el cepario del C.I.C.E.S.E. con la clave "CH-X-1"; tiene buenas características de crecimiento y de adaptabilidad y en la actualidad es utilizada para la alimentación de larvas y adultos de moluscos y crustáceos en varios establecimientos comerciales mexicanos.

Skeletonema costatum Cleve es una especie que proviene del banco de cepas del Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (SKEL) y se encuentra depositada en el C.I.C.E.S.E. con clave "SK-C-2". Esta microalga tradicionalmente se utilizó para la alimentación de larvas de penéidos en Japón, Taiwan y Estados Unidos (Bardach *et al.*, 1986). En México se emplea en las instalaciones del C.I.C.T.U.S. de Puerto Peñasco, Sonora para la misma finalidad (Rodríguez-Marín y Reprieto-García, 1985). La cepa del C.I.C.E.S.E. se está utilizando actualmente en esa misma Institución y además en por lo menos un establecimiento comercial en Baja California Sur, México.

Thalassiosira pseudonana Hasle y Heimdal (3H) proviene del banco de cepas del Bigelow Laboratory for Ocean Sciences y se encuentra depositada como subcepa en el C.I.C.E.S.E. con la clave "TH-P-1". Esta especie se utiliza frecuentemente para la alimentación de larvas y adultos de moluscos (Epifanio, 1979; Walsh *et al.*, 1987). Esta microalga se eligió para comparar los resultados de este trabajo con los de Flaak y Epifanio (1978).

II.2. CARACTERISTICAS DE LAS LAMPARAS

En base a las características del espectro de emisión de luz de las lámparas fluorescentes de tipo comercial se seleccionaron lámparas fluorescentes color azul (LA), marca "General Electric" con número de catálogo "F40B" de 4 pies y de 40 Watts, que emiten principalmente en la banda experimental de luz azul (430-470 nm), que corresponden a las mencionadas por Flaak y Epifanio (1978).

Para comparar el efecto del tipo de iluminación, se utilizaron como control lámparas fluorescentes de luz blanca-fría (LB) marca "SILVANIA" con número de catálogo "F40CW" de 4 pies y de 40 Watts, que emiten en un espectro con dos picos, uno en la banda del azul (430-450 nm) y el otro en la banda del verde-rojo (550-620 nm).

Los espectros de emisión de las lámparas proporcionados por las casas comerciales, fueron comprobados por el M. en C. David Salazar del Departamento de Optica del C.I.C.E.S.E., por medio de un fotomultiplicador Oriel modelo 7070, un monocromador Bausch & Lomb y un fotodetector Oriel modelo 7062 (Fig. 2).

La cantidad de energía emitida por las lámparas fue evaluada por la Dra. Nalewajko con un espectroradiómetro ISCO, ubicando el detector a 8 cm de la fuente de luz.

Debido a que una de las condiciones experimentales consistió en cultivar las microalgas en luz azul, sin aislar los cultivos de la luz ambiental del laboratorio (LM), emitida por lámparas fluorescentes de luz blanca fría del mismo tipo usado para los cultivos, con difusores de acrílico de tipo comercial, se comprobó en el laboratorio de la Dra. Nalewajko, con el mismo instrumento que estos difusores funcionaran solamente como filtros neutros, sin modificar la composición espectral de la luz. Al relacionar los valores de la energía medidos a las diferentes longitudes de onda para las lámparas fluorescentes de luz azul y blanca, con difusor y sin él, se obtuvieron valores de r^2 de 99.88 para las dos estimaciones en luz blanca, y de 99.58 para las de luz azul. Por lo anterior el difusor utilizado produce una leve atenuación en la cantidad de luz sin causar cambios significativos en su composición espectral.

II.3. EFECTO DEL TIPO DE ILUMINACION

La contribución de la luz ambiental a la luz azul resultó del orden de $1.9 \times 10^{14} \text{ q s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ medidos en la superficie de los cultivos. En el caso de los experimentos expuestos a la luz azul, se diseñó y construyó una caja negra con doble pared que se situó de manera tal que cubriera totalmente las lámparas de luz azul y permitiera en su interior el espacio necesario para mantener los cultivos. Un sistema de ventilación mantuvo a los cultivos experimentales en iguales condiciones de temperatura.

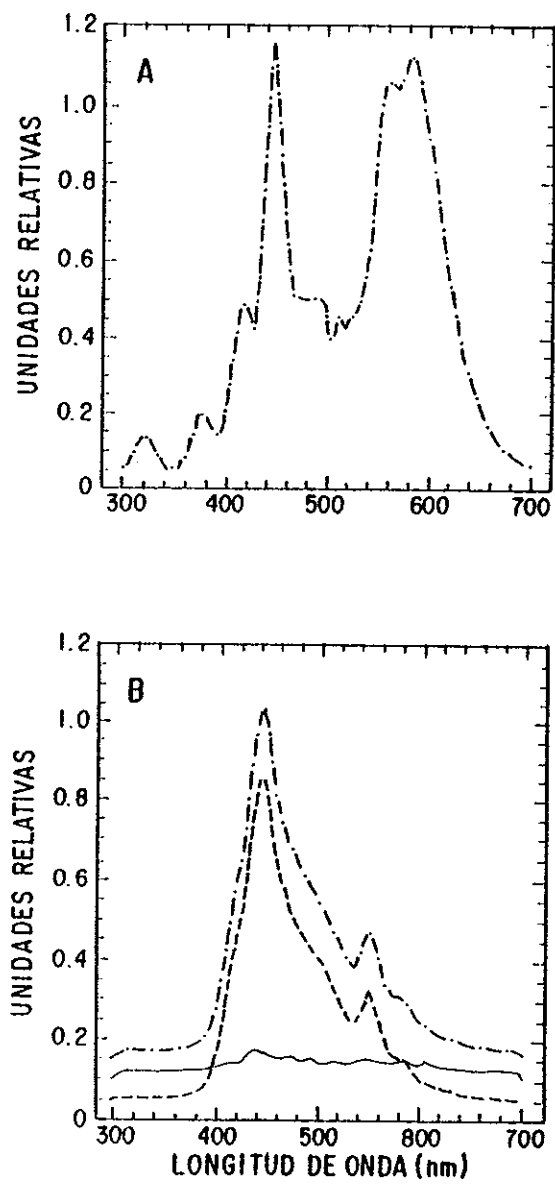


Figura 2. Espectro de emisión (en unidades relativas) de las tres fuentes de luz. A: luz blanca; B: (—) luz azul; (---) luz azul mezclada; (-·-) luz ambiental; nm: nanómetros.

II.3.a. SATURACION DE LA LUZ EN FRASCOS ERLENMEYER: SELECCION DE UNA ESPECIE

Para seleccionar la especie con el patrón de respuesta esperado, se llevaron a cabo por triplicado ensayos de crecimiento con cultivos estáticos en frascos Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio (ver abajo), para cada una de las tres especies. Para asegurarse que las concentraciones de luz no fueran limitantes para el crecimiento, cada especie se cultivó en un gradiente de irradiancia cuántica (medida con un medidor de cuanta 4 Pi Biospherical Instruments Inc., modelo QSC-100) para cada tipo de luz, obtenido con diferentes números de lámparas fluorescentes (Tabla I) que emitía una iluminación continua durante los experimentos. La irradiancia fue estimada a lo largo de una línea, en donde se situaría la parte central de la base de los Erlenmeyers. Los cultivos que sirvieron de inóculo fueron previamente acondicionados a cada concentración y tipo de luz durante un período de 5 a 7 días, dependiendo de la especie.

Tabla I. Valores promedios de la irradiancia medida en la parte central de la base de los frascos Erlenmeyer expuestos a diferente número de lámparas de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB) expresados como $qs^{-1}cm^{-2}$, $\mu mol s^{-1}m^{-2}$ y Wm^{-2} .

NUM. DE LAMPARAS	VALORES X $10^{17} qs^{-1}cm^{-2}$			$\mu mol s^{-1}m^{-2}$			Wm^{-2}		
	LA	LM	LB	LA	LM	LB	LA	LM	LB
1		0.060		100			26.2	25.9	21.7
2		0.126		210			55.1	54.5	45.5
4		0.218		362			95.3	94.3	78.7
6		0.329		547			143.8	142.3	118.8
8		0.432		718			188.8	186.9	156.0

Nota: Los valores de Wm^{-2} están calculados dividiendo los valores en $\mu mol s^{-1}m^{-2}$ por un factor de 3.8 para LA, 3.84 para LM y 4.6 para LB, obtenido de las fórmulas indicadas en Lüning (1981).

El medio de cultivo empleado para *Chaetoceros* sp. y *S. costatum* fue el medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) con doble concentración de silicatos. Para *T. pseudonana* se utilizó medio "f/2", adicionando los silicatos en la misma proporción que para el medio "f". Los medios de cultivo se prepararon con agua de mar del sistema cerrado del laboratorio de acuicultura del CICESE, desinfectada por exposición a radiaciones ultravioleta (U.V.) y esterilizada con hipoclorito comercial al 6% ($1 ml l^{-1}$ de agua) neutralizado posteriormente con tiosulfato ($0.15 gl^{-1}$ de agua) 24 horas antes de ser utilizada (Hemerick, 1973). Finalmente el agua se pasó por filtros de membrana con una abertura de poro de $0.2 \mu m$, se agregaron los nutrientes y los medios fueron esterilizados en una autoclave a $1.05 Kg cm^{-2}$ de presión y $121 ^\circ C$, durante media hora.

El crecimiento de las microalgas en cada condición experimental, se estimó mediante mediciones diarias de la densidad óptica (D.O.) (Sorokin, 1973) con un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 210 y posteriormente con un espectrofotómetro HACH modelo EL/2000. Las mediciones se hicieron a una longitud de onda de 550 nm, para evitar los picos de absorción de la clorofila. Para cada caso, se evaluaron las concentraciones celulares al inicio y al final de la fase de crecimiento exponencial por medio de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. Se calculó la velocidad de crecimiento (μ) con la fórmula $\mu = \log N - \log N_0 / t$, utilizando para este cálculo la transformación logarítmica en base dos de la densidad óptica, debido a la forma dominante de reproducción (asexual, por división binaria de la célula) de estos organismos (Fogg y Thake, 1987).

Se controló que no hubiera cambios en la cantidad de energía disponible para cada condición experimental, a través de mediciones diarias con el medidor de cuanta ya mencionado.

El efecto de la irradiancia sobre el crecimiento de cada especie, se averiguó de manera individual por medio de un análisis de covarianza para comparar las pendientes (b) de las curvas de crecimiento y la intercepción con las ordenadas (a), este último para verificar que el experimento se inició con la misma cantidad de inóculo. Antes de proceder con este análisis se verificó que los datos cumplieran con las hipótesis que fundamentan la covarianza: normalidad de los residuos de la regresión, linealidad y homoscedasticidad (Snedecor y Cochran, 1962). Se siguió el mismo procedimiento para los experimentos realizados con los diferentes tipos de luz.

Se confirmó que los resultados de crecimiento en el gradiente de irradiancia fueran consistentes, repitiendo los experimentos cinco veces para *Chaetoceros* sp., cuatro para *S. costatum* y dos para *T. pseudonana*, comparando los datos de las repeticiones por medio de un análisis de covarianza entre las repeticiones, por cada irradiancia y cada especie.

Se realizó una serie de pruebas "t" de diferencias de medias, para ver si el número de células de los inóculos fue significativamente diferente en las distintas irradiancias. Análogamente se compararon los valores finales del número de células en las diferentes irradiancias. Se repitió el mismo procedimiento para cada una de las especies.

II.4. CULTIVOS SEMICONTINUOS

II.4.a. PORCENTAJE DE DILUCION

La especie seleccionada (*Chaetoceros* sp.) a través de los ensayos en Erlenmeyer, se mantuvo en cultivos semicontinuos (Fogg y Thake, 1987), con el propósito de tener una composición proximal uniforme en el tiempo. Se utilizó un porcentaje de dilución diario determinado empíricamente como sigue, considerando que ésta debía de garantizar la máxima producción de biomasa diaria.

Se tomaron como base los resultados obtenidos para *Chaetoceros* sp. por López-Elías y Voltolina (1993) que utilizaron cuatro lámparas fluorescentes de luz blanca, sin encontrar diferencias importantes en la cantidad de biomasa producida diariamente con porcentajes de dilución de entre 25 y 50 %. Por lo anterior en este trabajo se ensayaron los porcentajes de dilución diarios de 40, 50, 60 y 75 % para cada tipo de luz.

A partir de inóculos previamente acondicionados a cada tipo de luz y transferidos a recipientes de volumen progresivamente mayor, se realizaron por triplicado cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. en garrafones (carboys) de 18 l de capacidad, con 10 l del mismo medio "f" usado en las pruebas anteriores. Los cultivos se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de $33 \pm 1 \text{ }^\circ/\text{‰}$ y pH 7.9 ± 1.1 , que fue controlado por medio de una mezcla de aire y CO_2 suministrada a los cultivos por burbujeo constante. La iluminación fue continua y el doble de la mínima utilizada en los experimentos de saturación de luz.

Diariamente, antes y después de realizar las diluciones, se evaluó la cantidad de biomasa producida, estimada como densidad óptica (D.O.) y como número de células.

En cada caso, se esperó que los cultivos se estabilizaran durante unos días, lo cual se comprobó mediante una prueba de significancia de la pendiente de la regresión ($b=0$) (Sokal y Rohlf, 1979) entre la D.O. estimada por día y la edad en días de cada cultivo. Con la prueba anterior fue posible confirmar si los cultivos tenían una tendencia a incrementar o a disminuir la cantidad de biomasa con bajos porcentajes de dilución ($b>0$) o con altos porcentajes de dilución ($b<0$), respectivamente.

II.4.b. SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA

Con una serie de ensayos se determinó la irradiancia con la cual se obtendría la mayor cantidad diaria de biomasa con los cultivos semicontinuos, mantenidos con los porcentajes de dilución por día determinados en el apartado anterior (II.4.a.)

Los cultivos fueron previamente acondicionados y expuestos a un gradiente de irradiancia, proporcionado por un diferente número de lámparas fluorescentes (Tabla II); durante este ensayo se comenzó con la irradiancia utilizada para los cultivos semicontinuos descritos en la sección anterior y paulatinamente se incrementó la concentración de luz hasta el punto en donde no se detectó cambio en la cantidad de biomasa producida.

Para verificar la posibilidad de un fenómeno de limitación por luz, originado por un efecto de sombreado al producirse un incremento en la cantidad de biomasa celular, se ensayó disminuir el intervalo de dilución por día a un período de 12 horas y posteriormente se practicó un incremento en el porcentaje de dilución.

Tabla II. Valores promedios de la irradiancia medida en la parte central de la base de los garrafones empleados para los cultivos semicontinuos mantenidos con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

NUM. DE LAMPARAS	VALORES X 10^{17} q's ⁻¹ .cm ⁻²			$\mu\text{mol's}^{-1}\text{m}^{-2}$			Wm ⁻²		
	LA	LM	LB	LA	LM	LB	LA	LM	LB
4		0.120		199			52.4	51.9	43.3
4		0.140		232			61.0	60.4	50.4
5		0.220		366			96.3	95.3	79.6
5		0.260		432			113.7	112.5	93.9
6		0.300		498			131.1	129.8	108.3
7		0.340		565			148.7	147.1	122.8
8		0.400		665			175.0	173.0	144.6
8		0.460		764			201.0	199.0	166.0

Nota: Valores de Wm⁻² calculados como en la Tabla I.

II.4.c. CONCENTRACION DE NUTRIENTES

Debido a las altas concentraciones celulares obtenidas en los sistemas semicontinuos, mantenidos con el porcentaje de dilución e irradiancia previamente determinadas, se decidió investigar la posibilidad de que la producción de biomasa fuera limitada por la concentración de nutrientes en el medio, para lo cual los cultivos se mantuvieron con una concentración doble de nutrientes (2f) y se evaluó la cantidad de biomasa producida y estimada como densidad óptica (D.O.).

II.5. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS Y PERFILES DE AMINOACIDOS Y DE ACIDOS GRASOS DE *Chaetoceros* sp.

El contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, peso seco, cantidad de cenizas y pigmentos se evaluó en submuestras de la cosecha diaria de los cultivos semicontinuos, tomadas cada segundo día después de combinar la cosecha de los triplicados de cada situación experimental.

Para los análisis proximales las microalgas fueron concentradas en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 2.5 cm de diámetro, previamente lavados con agua destilada y colocados en una mufla a 470 °C durante 4 horas. Para el peso seco y las cenizas se siguió el mismo procedimiento, excepto que los filtros utilizados fueron de un diámetro de 4.7 cm.

Los análisis antes mencionados se realizaron por lo menos en tres fechas de muestreo para cada caso, siguiendo los siguientes métodos:

Proteínas: Con el reactivo Folin-Ciocalteu, con la metodología descrita por Lowry *et al.* (1951) y modificada por Malara y Charra (1972 a) y por Färber-Lorda (1986), usando la modalidad de extracción de López-Elías y Voltolina (1993).

Lípidos: La extracción se realizó por medio de una mezcla cloroformo-metanol-agua, siguiendo la técnica de Bligh y Dyer (1959) modificada por Chiaverini (1972). La determinación se efectuó según la metodología descrita por Pande *et al.* (1963).

Carbohidratos: La extracción se efectuó con ácido sulfúrico siguiendo la metodología descrita por Whyte (1987) y la determinación con la técnica de Dubois *et al.* (1956) según Malara y Charra (1972 b).

Peso seco y contenido de cenizas: Según la metodología descrita por Sorokin (1973).

Pigmentos: Según el método tricromático descrito por Strickland y Parsons (1972) y utilizando las ecuaciones propuestas por SCOR/UNESCO reportadas en el mismo manual.

Para evaluar el efecto de la calidad de luz y el gradiente de irradiancia sobre cada una de las fracciones orgánicas mayores de *Chaetoceros* sp., se utilizó un análisis de varianza paramétrico de dos vías y las diferencias resultantes se comprobaron por medio de una prueba a posteriori de Student Newman Keuls (Sokal y Rohlf, 1979).

Para cada situación experimental se midieron los espectros de absorción (E_a) de las microalgas en vivo y después de extracción con acetona al 90% (Parsons *et al.*, 1984) de cada especie, inicialmente a intervalos de 5 y 10 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb tipo Spectronic 210, y posteriormente con espectrofotómetros de barrido continuo Perkin-Elmer modelo 402 o Shimadzu UV-1200.

Los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos se realizaron en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del C.I.N.V.E.S.T.A.V. del Instituto Politécnico Nacional, en la Ciudad de México, D.F.

Para los análisis antes mencionados fue necesario reunir una gran cantidad de biomasa, para lo cual se procedió a concentrar y congelar la cosecha de microalgas durante varios días, que posteriormente se secó en un Liofilizador LABCONCO modelo 18.

En este caso, las proteínas se midieron con el método Microkjeldahl, multiplicando el nitrógeno total por el factor de 6.25 (A.O.A.C. 1970 a); los lípidos por extracción en éter de petróleo con el método Soxhlet (A.O.A.C., 1970 b); las cenizas se determinaron según el método general de la mufla (A.O.A.C., 1970 c). La cantidad de fibra cruda se evaluó con el método del detergente neutro (A.O.A.C., 1970 e). La humedad se estimó por el método de la estufa de vacío (A.O.A.C., 1970 d) y los carbohidratos se evaluaron como diferencia entre el total de la suma de los valores anteriores estimados en base seca y 100%.

Los perfiles de ácidos grasos se evaluaron por cromatografía de gases, con una modificación del método de Hammarstrand (Larios-Saldaña, CINVESTAV, com. pers.) y los aminoácidos se determinaron cuantitativamente en un autoanalizador Beckman modelo 118 CL, siguiendo la metodología descrita en el manual del instrumento.

II.6. BIOENSAYO DE ALIMENTACION

El bioensayo de alimentación se realizó con *Artemia franciscana* (San Francisco Bay Brand, lote 900827). La descapsulación de los quistes se hizo con el método del hipoclorito comercial (San Francisco Bay Brand, 1988). A las 6 horas después que se inició la eclosión, los nauplios se recolectaron por medio de un sifón y se introdujeron a un vaso de precipitado en donde se desinfectaron durante cinco minutos con una solución de mertiolate preparada según la proporción recomendada por Correa-Sandoval (1991), para después introducirlos a los sistemas experimentales que consistían de tres acuarios de 45 l cada uno, divididos en tres secciones. Cada sección contenía 8 l de agua, y recibió 5000 organismos, que fueron alimentados con una de las tres dietas elegidas con sus respectivas repeticiones, siguiendo la tabla de raciones propuesta por Tackaert *et al.* (1987) y modificada para *Chaetoceros* sp. por Correa-Sandoval (1991).

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo de alimentación fueron: temperatura entre 20 y 22 °C, salinidad entre 30 y 33 ‰, pH entre 7.0 y 8.0 y cambio de agua completo cada 24 horas. Los acuarios se colocaron expuestos a iluminación continua emitida por dos lámparas fluorescentes de 40 Watts de luz blanca fría (con número de catálogo F96T12), que suministraban $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ($0.060 \times 10^{17} \text{ qs}^{-1} \text{cm}^{-2}$) a lo largo de una línea en donde se ubicaría la parte central de la base de los acuarios.

Debido a que durante el bioensayo de alimentación, las microalgas cultivadas en luz azul, luz mezclada y luz blanca estarían expuestas durante 24 horas (desde su adición al acuario hasta el siguiente cambio de agua) a una baja concentración de luz blanca, se determinó el efecto de este cambio del tipo y cantidad de iluminación sobre la velocidad de crecimiento y la composición bioquímica de *Chaetoceros* sp. Para esto, se empleó la mezcla de la cosecha de los cultivos semicontinuos en cada tipo de luz, diluida al 50% con agua de mar. Esta se introdujo por triplicado en frascos Fernbach de 2.8 l de capacidad y se expuso a las condiciones de iluminación que recibiría en los acuarios. Durante un período de 24 horas se tomaron por triplicado muestras a intervalos de 4 horas para evaluar la velocidad de crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas cultivadas en LA, LM y LB y trasladadas a una menor irradiancia de luz blanca.

En el transcurso del bioensayo se tomaron diariamente de cada sección 30 organismos, que fueron colocados en la solución fijadora descrita por Correa-Sandoval (1991). Posteriormente, se midió su longitud total con un microscopio estereoscópico marca OLYMPUS, identificando a la vez su etapa de desarrollo. El día de cambio de estadio se definió arbitrariamente como el día cuando el 70% o más de los organismos tenían todas las características de la siguiente etapa de desarrollo.

Cuando se notó la primera formación de parejas se dió por terminado el experimento; se realizó un cambio de agua, y se evaluó la sobrevivencia y después de un período de seis horas de inanición se midió por triplicado el peso seco y el contenido de cenizas de una muestra de 100 organismos para cada tratamiento. Después de tomar la muestra para las mediciones biométricas, el resto de la biomasa de *Artemia* fue cosechada, lavada con agua destilada, congelada a -70°C y liofilizada para determinar su contenido de proteínas, de lípidos, de carbohidratos, y los perfiles de aminoácidos y de ácidos grasos utilizando la metodología descrita para el caso de las microalgas y presentada en la sección II.5.

Para evaluar las eventuales diferencias entre las repeticiones de cada situación experimental, se realizó un análisis de varianza de una vía (Sokal y Rohlf, 1979), con los valores de longitud de *Artemia* medidos por cada tratamiento y para cada fecha de medición.

Las tallas finales de cada etapa de desarrollo se contrastaron por medio de un análisis de varianza de una vía (caso paramétrico); en el caso de encontrarse diferencia significativa, se utilizó una prueba a posteriori (mínima diferencia significativa (LSD) con $\alpha = 0.05$) (Sokal y Rohlf, 1979).

III. RESULTADOS

III.1. SATURACION DE LA LUZ EN FRASCOS ERLLENMEYER: SELECCION DE UNA ESPECIE

III.1.a. *Chaetoceros* sp.

Los valores de la velocidad de crecimiento promedio (μ) durante la fase exponencial de *Chaetoceros* sp. cultivado en un gradiente de irradiancia de los tres tipos de luz (luz azul, luz azul mezclada con luz ambiental del laboratorio y luz blanca) (Tabla III), no resultó significativamente diferente en ninguno de los gradientes de irradiancia, ya sea en el valor de la pendiente (b), que estima la velocidad de crecimiento, como en el de las ordenadas al origen (a), que valoran la cantidad de inóculo (Tabla IV). Por lo anterior, se puede concluir que todos los experimentos se iniciaron con la misma cantidad de inóculo y que el crecimiento no estuvo limitado en ninguno de los casos por la irradiancia.

El número de células al final de la fase de crecimiento exponencial, resultó igual a lo largo del gradiente de irradiancia para cada uno de los tres tipos de luz (Tabla V). Sin embargo, al comparar las concentraciones celulares que se obtuvieron con los tres tipos de luz, se encontró que éstas fueron significativamente mayores con luz blanca que con los dos tipos de luz azul (Tabla V), debido a que con la luz blanca se produce una mayor duración de esta fase.

Como ya se ha mencionado, en ninguno de los gradientes se encontraron diferencias en la velocidad de crecimiento exponencial, debidas a la concentración de luz. Por este motivo, se compararon los valores promedio globales de μ , obtenidos por cada tipo de luz y se encontraron valores significativamente mayores para los cultivos mantenidos en luz azul mezclada (2.14), comparativamente a los obtenidos en luz azul (1.39) y menores para los de luz blanca (0.73) (Tabla VI).

Tabla III. Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial de *Chaetoceros* sp. cultivado en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

TIPO DE LUZ	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	718
LA	1.397(0.008)	1.390(0.003)	1.386(0.007)	1.400(0.003)	---
LM	2.175(0.021)	2.151(0.049)	1.962(0.049)	2.263(0.065)	---
LB	0.731(0.036)	0.751(0.064)	0.707(0.053)	0.712(0.069)	0.743(0.052)

Tabla IV. Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial para los cultivos de *Chaetoceros* sp., en diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.

PRUEBA ESTADISTICA	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	718
LUZ AZUL					
Individualmente					
N	9	9	9	9	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.9362*	0.9126*	0.9031*	0.9127*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9861*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9936*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9927*		
LUZ MEZCLADA					
Individualmente					
N	39	51	51	51	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.8679*	0.1272*	0.1057*	0.3670*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.8993*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.7838*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.4817*		
LUZ BLANCA					
Individualmente					
N	54	54	54	54	54
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA
Linealidad	0.9165*	0.9372*	0.9163*	0.9195*	0.9100*
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9962*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9999*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9919*		

Tabla V. Valores promedios (en paréntesis: desviación estándar) del número de células ($\text{cél} \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$) estimado al final de la fase de crecimiento exponencial, para las tres especies de microalgas mantenidas en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), luz azul mezclada (LM) y luz blanca (LB). Letras iguales indican falta de diferencias significativas entre los valores obtenidos en el gradiente de cada tipo de luz (prueba "t" de diferencias de medias; $\alpha=0.05$).

ESPECIE	TIPO DE LUZ	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)				
		100	210	362	547	718
<i>Chaetoceros</i> sp.	LA	998(45)a	970(36)a	943(35)a	980(52)a	
	LM	1027(43)b	1126(26)b	1140(90)b	1040(52)b	
	LB	1340(29)c	1293(48)c	1322(53)c	1293(96)c	1323(90)c
<i>S. costatum</i>	LA	940(26)c	923(18)c	946(30)c	960(21)c	
	LM	790(45)b	810(25)b	797(36)b	820(42)b	
	LB	520(17)a	536(19)a	517(23)a	508(29)a	523(25)a
<i>T. pseudonana</i>	LA	1248(96)a	1198(87)a	1240(83)a	1190(73)a	
	LM	1325(81)b	1420(76)b	1322(65)b	1340(36)b	
	LB	1536(99)c	1620(80)c	1551(67)c	1730(91)c	1630(86)c

Tabla VI. Valores promedios (en paréntesis : desviación estándar) de la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial (μ) de las tres especies de microalgas mantenidas en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB) y resultados de la prueba "t" de diferencia de medias ($\alpha=0.05$). Las letras iguales indican falta de diferencia al nivel de significancia indicado.

Especie	μ			SIGNIFICANCIA POR PARES	t
	LA	LM	LB		
<i>Chaetoceros</i> sp.	1.39(0.006)b	2.14(0.127)c	0.725(0.019)a	LA-LM= 5.65×10^{-4} LA-LB= 6.46×10^{-7} LM-LB= 4.88×10^{-5}	9.98 55.16 18.63
<i>S. costatum</i>	1.03(0.007)a	2.60(0.034)b	0.97 (0.009)a	LA-LM= 9.50×10^{-8} LA-LB= 9.42×10^{-1} LM-LB= 8.82×10^{-6}	89.11 -0.08 28.66
<i>T. pseudonana</i>	1.92(0.058)a	2.29(0.210)b	2.92 (0.198)c	LA-LM= 3.64×10^{-2} LA-LB= 1.88×10^{-3} LM-LB= 2.74×10^{-2}	-3.09 -7.28 -3.39

III.1.b. *S. costatum*

Análogamente a lo mencionado para *Chaetoceros* sp., no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento (b) o en la cantidad de inóculo (a) de los cultivos de *S. costatum* mantenidos a diferentes irradiancias de cada tipo de luz (Tablas VII y VIII), pero los valores promedio de la velocidad de crecimiento obtenidos en luz blanca (0.97) y en luz azul (1.03) resultaron significativamente inferiores de los encontrados en luz azul mezclada (2.60) (Tabla VI).

Tabla VII. Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial de *S. costatum* cultivada en un gradiente de irradiancia de luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

TIPO DE LUZ	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	718
LA	1.017(0.010)	1.025(0.008)	1.030(0.012)	1.032(0.012)	—
LM	2.569(0.004)	2.644(0.015)	2.578(0.016)	2.609(0.008)	—
LB	0.957(0.026)	1.155(0.058)	0.969(0.063)	0.979(0.044)	1.075(0.036)

Tabla VIII. Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial, para *S. costatum*, cultivada bajo diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.

PRUEBA ESTADISTICA	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	710
LUZ AZUL					
Individualmente					
N	9	9	9	9	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.9022*	0.9341*	0.9266*	0.9129*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9647*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9836*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9901*		
LUZ MEZCLADA					
Individualmente					
N	12	24	24	24	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.8642*	0.9923*	0.6259*	0.8312*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9392*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9315*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.3505*		
LUZ BLANCA					
Individualmente					
N	36	36	36	36	36
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA
Linealidad	0.9264	0.7812*	0.8728*	0.9226*	0.9226*
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9737*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9753*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9245*		

Como en el caso anterior, el número de células al final de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, no fue diferente con las distintas irradiancias utilizadas por cada tipo de luz (Tabla V). Sin embargo, al contrastar el número de células entre los tres tipos de luz, la concentración celular final resultó significativamente mayor para los dos tipos de luz azul y menor en luz blanca (Tabla V).

III.1.c. *T. pseudonana*

Como en los casos anteriores, no se encontraron diferencias significativas en los valores de la velocidad de crecimiento (Tabla IX), o de la cantidad de inóculo (Tabla X) de los cultivos de *T. pseudonana* mantenidos en gradientes de irradiancia.

El número de células estimado al final de la fase de crecimiento exponencial resultó igual a lo largo de cada uno de los tres gradientes de irradiancia. Al comparar el número de células entre tipos de luz se encontró que, como en el caso de *Chaetoceros* sp., éste fue mayor con luz blanca que con los dos tipos de luz azul (Tabla V).

Los valores promedios de la velocidad de crecimiento de *T. pseudonana* (Tabla VI) fueron significativamente mayores con la luz blanca (2.92), seguidos por los de luz azul mezclada (2.29) y menores con luz azul (1.92).

Tabla IX. Velocidad de crecimiento promedio (μ) y desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial de *T. pseudonana* cultivada en un gradiente de irradiancia de luz azul (LÁ), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

TIPO DE LUZ	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	718
LA	1.945(0.040)	1.832(0.031)	1.936(0.026)	1.961(0.027)	—
LM	2.532(0.019)	2.346(0.042)	2.023(0.039)	2.277(0.037)	—
LB	2.743(0.056)	2.976(0.046)	2.761(0.034)	3.228(0.087)	2.878(0.061)

Tabla X. Análisis de covarianza con las mediciones de densidad óptica estimada durante la fase de crecimiento exponencial, para los cultivos de *T. pseudonana*, en diferentes irradiancias de luz azul, azul mezclada y blanca. *indica aceptación con $\alpha=0.05$.

PRUEBA ESTADISTICA	IRRADIANCIAS ($\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$)				
	100	210	362	547	710
LUZ AZUL					
Individualmente					
N	9	9	9	9	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.9627*	0.9101*	0.8936*	0.9034*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9426*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9938*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9625*		
LUZ MEZCLADA					
Individualmente					
N	27	42	42	42	
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	
Linealidad	0.4990*	0.7607*	0.7437*	0.7600*	
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.6619*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9240*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.2493*		
LUZ BLANCA					
Individualmente					
N	18	18	18	18	18
Normalidad	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA	ACEPTA
Linealidad	0.6391*	0.4890*	0.5375*	0.4813*	0.5850*
Globalmente					
Homogeneidad de varianza			0.9952*		
Homogeneidad de pendientes (b)			0.9999*		
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)			0.9967*		

III.1.d. SELECCION DE UNA ESPECIE

Los resultados obtenidos con los cultivos estáticos sirvieron para seleccionar la especie que se utilizó para el resto de los ensayos (sección I.1. en objetivos). Los experimentos hechos con *Thalassiosira pseudonana* no fueron adecuados para enmarcarlos en el patrón general de respuestas esperadas, ya que la velocidad de crecimiento exponencial fue mayor en la luz blanca que en los dos tipos de luz azul. De las otras dos especies, *S. costatum* tuvo una velocidad de crecimiento igual en las luces azul y blanca, y solamente la mezcla de ellas resultó, al igual que para *Chaetoceros* sp., en un incremento significativo de la velocidad de reproducción. Por otro lado, el número de divisiones diarias de *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul fue aproximadamente el doble que en la luz blanca, y además, con esta especie se obtuvieron en general concentraciones celulares mayores. Esto haría de *Chaetoceros* sp. una especie más adecuada para las finalidades del presente trabajo, que propone comparar la respuesta de una microalga cultivada en diferentes tipos de luz y en condiciones compatibles con las finalidades de producción masiva de biomasa para uso comercial.

Por todo lo anterior, y considerando además la mayor dificultad de mantener cultivos semicontinuos de *S. costatum* por períodos de tiempo suficientemente largos para permitir muestreos sucesivos de biomasa que fueran representativos de su calidad (Rico-Mora, C.I.C.E.S.E., com. pers.), se seleccionó la cepa *Chaetoceros* sp. con la cual se llevó a cabo el resto de los ensayos (sección I.1 en objetivos).

III.2. CULTIVOS SEMICONTINUOS DE *Chaetoceros* sp.

III.2.a. PORCENTAJE DE DILUCION

En base a los valores de la densidad óptica (D.O.) medida diariamente para los diferentes porcentajes de dilución ensayados, se encontró que el porcentaje de dilución diario de 40 % resultó, para los tres tipos de luz, en un incremento constante de biomasa durante 12 días y que posteriormente los cultivos decayeron entre 3 y 5 días después. Con el porcentaje de dilución diario de 75 % se notó un continuo decremento de los valores de la D.O. de los cultivos expuestos a los tres tipos de luz y solo fue posible mantener los cultivos durante un período de 6 a 7 días, después del cual declinaron rápidamente.

Al efectuar para cada caso una prueba de significancia de la pendiente de la regresión entre la D.O. estimada por día y la edad del cultivo, se detectó un cambio significativo del valor de la pendiente

en el transcurso del tiempo ($b > 0$) para la dilución de 40 %, independientemente del tipo de luz (Tabla XIA). Para la dilución de 75% se evaluó un cambio opuesto ($b < 0$) al descrito para la dilución de 40 % (Tabla XIB).

Tabla XI. Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente, para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. con una dilución diaria de 40 % (A) y de 75 % (B) en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

A) DILUCION DE 40 %	TIPO DE LUZ		
	LA	LM	LB
Individualmente			
N	18	18	18
Normalidad	Acepta	Acepta	Acepta
Homogeneidad de varianza	Acepta	Acepta	Acepta
Linealidad	Acepta	Acepta	Acepta
Coefficiente $b=0$	Rechaza	Rechaza	Rechaza

B) DILUCION DE 75 %	TIPO DE LUZ		
	LA	LM	LB
Individualmente			
N	15	15	15
Normalidad	Acepta	Acepta	Acepta
Homogeneidad de varianza	Acepta	Acepta	Acepta
Linealidad	Acepta	Acepta	Acepta
Coefficiente $b=0$	Rechaza	Rechaza	Rechaza

Se encontró que con los tres tipos de luz el porcentaje de dilución de 50 % por día permitía la estabilización de la biomasa (estimada como densidad óptica) con respecto al tiempo. La prueba de significancia del coeficiente "b" de la regresión, resultó ser aceptada en los tres casos, aunque con una probabilidad de entre 0.1 y 0.05 (Tabla XIIA).

Posteriormente, se efectuó un segundo ensayo con el porcentaje de dilución de 50 % por día y se volvió a comprobar que esta dilución permite la estabilización de los cultivos; o sea, que la cantidad de biomasa producida es aproximadamente constante en el transcurso del tiempo. A partir del día 15 se ensayó una dilución de 60 % y se encontró que en los tres casos se produjo inicialmente un marcado descenso en la cantidad de biomasa producida, que después tendió a estabilizarse, para los tres tipos de iluminación, en valores inferiores a los obtenidos con un porcentaje de dilución diario de 50 % (Tablas XIII y XIV).

Finalmente, se decidió investigar si la estabilidad del cultivo y la biomasa máxima alcanzada en los cultivos expuestos a los tres tipos de luz, dependían de un posible efecto de sombreado debido a la densidad de la biomasa microalgal. Es decir si la velocidad de crecimiento pudiera ser diferente para los distintos tipos de luz, de forma tal que los cultivos alcanzaran su biomasa máxima en tiempos diferentes para después estabilizarse debido a una limitación por luz. Para verificar lo anterior, se realizaron dos tipos de observaciones: primeramente se comprobó con mediciones de densidad óptica que el aumento de concentración celular fuera lineal en el período entre diluciones. En segundo lugar se mantuvieron tres cultivos semicontinuos para cada tipo de luz, utilizando la dilución de 50 % pero disminuyendo el intervalo de dilución, que se cambió de 24 a 12 horas durante un período de 5 días. En todos los casos se encontró un decremento de la concentración celular, que independientemente del tipo de luz alcanzó valores aproximadamente equivalentes al 50% de los alcanzados en 24 horas (Tabla XIV). Con estos resultados se comprobó que bajo las condiciones experimentales ensayadas, de existir un efecto de sombreado, éste no afecta en forma diferente el crecimiento y la producción de biomasa, en dependencia del tipo de luz.

Con base en lo anterior, se puede afirmar que, independientemente del tipo de luz, las diluciones de 50 y 60 % por día permiten la estabilización de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el transcurso del tiempo, con una producción diaria de biomasa aproximadamente constante. Sin embargo, la concentración celular fue mayor con la dilución de 50 %, equivalente a una división celular diaria. Al elevar el número de generaciones por día, aumentando el porcentaje de dilución, se obtuvieron

Tabla XII. Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente durante dos ensayos de cultivo semicontinuo (A y B) de *Chaetoceros* sp. con una dilución diaria de 50 % en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$ o 0.1 (+).

A) DILUCION DE 50 %	TIPO DE LUZ		
	LA	LM	LB
Individualmente			
N	21	21	21
Normalidad	Acepta	Acepta	Acepta
Homogeneidad de varianza	Acepta	Acepta	Acepta
Linealidad	Acepta +	Acepta +	Acepta
Coefficiente b=0	Acepta +	Acepta +	Acepta
Globalmente			
Homogeneidad de varianza		N.P.	
Homogeneidad de pendientes (b)		N.P.	
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)		N.P.	
Nota: N.P. = No probar.			
B) DILUCION DE 50 %	TIPO DE LUZ		
	LA	LM	LB
Individualmente			
N	18	18	18
Normalidad	Acepta	Acepta	Acepta
Homogeneidad de varianza	Acepta	Acepta	Acepta
Linealidad	Acepta +	Acepta +	Acepta +
Coefficiente b=0	Acepta	Acepta	Acepta
Globalmente			
Homogeneidad de varianza		Acepta	
Homogeneidad de pendientes (b)		0.0002	
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)		0.9251	

Tabla XIII. Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas, linealidad y significancia de la pendiente de la regresión entre los valores de densidad óptica medida diariamente en los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. con una dilución diaria del 60% en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

	TIPO DE LUZ		
	LA	LM	LB
Individualmente			
N	15	15	15
Normalidad	Acepta	Acepta	Acepta
Homogeneidad de varianza	Acepta	Acepta	Acepta
Linealidad	Acepta	Acepta	Acepta
Coefficiente $b=0$	Acepta	Acepta	Acepta
Globalmente			
Homogeneidad de varianza		0.9836	
Homogeneidad de pendientes (b)		0.9671	
Homogeneidad de ordenadas al origen (a)		0.9681	

Tabla XIV. Valores promedios y desviación estándar (D.E.) del número de células para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenidos con los diferentes porcentajes de dilución ensayados para los tres tipos de luz. A y B, primer y segundo ensayo con una dilución de 50 % cada 24 horas. C, dilución de 50 % cada 12 horas.

Porcentaje de dilución	LUZ AZUL		LUZ BLANCA		LUZ MEZCLADA	
	cél 10^6 ml $^{-1}$	D.E.	cél 10^6 ml $^{-1}$	D.E.	cél 10^6 ml $^{-1}$	D.E.
40	2.9	0.462	3.2	0.361	2.6	0.390
50A	2.5	0.482	2.9	0.314	1.8	0.341
50B	2.2	0.506	3.0	0.394	2.0	0.426
50C	1.2	0.320	1.6	0.280	1.1	0.312
60	2.0	0.494	2.6	0.777	1.6	0.527
75	1.8	0.463	2.0	0.452	1.2	0.321

densidades celulares inferiores (Tabla XIV), lo cual parece indicar que efectivamente existe limitación por luz para la velocidad de división celular ya que, para poder mantener velocidades de división superiores a una generación diaria los cultivos tienen que ser poco densos, favoreciendo de esta forma la penetración de la luz.

De acuerdo a lo expuesto por Droop (1975), porcentajes de dilución diarios demasiado cercanos a los valores máximos de μ (en este caso alrededor de dos generaciones diarias, equivalentes a los porcentajes de dilución de 50 % cada 12 horas o de 75 % cada 24 horas), tienen como efecto una continua disminución de la densidad celular y por ende el decaimiento del cultivo, lo cual pudo ser comprobado experimentalmente en este trabajo.

Por este motivo se optó seguir trabajando con diluciones diarias del 50 por ciento, con las cuales en todos los casos se obtuvo la máxima producción de biomasa.

Al contrastar la cantidad de biomasa celular producida en los tres tipos de luz con el 50 % de dilución por día, se estimó que ésta fue significativamente menor en los cultivos expuestos en los dos tipos de luz azul, en relación a la que se obtuvo con luz blanca (Tabla XV). Además, se encontró que el número de células varía significativamente y en razón inversa a el porcentaje de dilución, para los tres tipos de luz.

Tabla XV. Análisis de varianza de una vía entre los valores de densidad óptica medidos durante la fase de estabilidad de los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenidos con una dilución diaria del 50% y expuestos a luz azul, azul mezclada y blanca. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Significancia
Factor	2	1.347	1.347	58.57	0.0227
Error	40	0.922	0.023		
Total	41	2.269			

III.2.b. SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA

En la mayoría de los experimentos se logró la estabilización de los cultivos, ya que para cada irradiancia la cantidad de biomasa celular producida no hubo un cambio significativo con respecto al tiempo. Las excepciones fueron las concentraciones de 232 y 366 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de los dos tipos de luz azul, con las cuales los cultivos no se pudieron estabilizar (Tabla XVI).

La cantidad de células producidas, se incrementó conforme aumentó la irradiancia de los tres tipos de luz. La mayor cantidad producida se obtuvo en luz blanca a irradiancias de entre 432 y 498 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Para los dos tipos de luz azul, los valores mayores se encontraron entre 498 y 565 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (Tabla XVII). Al incrementar la cantidad de luz a valores superiores a 565 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, se encontró una disminución en la cantidad de células producidas para los tres tipos de luz. Para los cultivos expuestos a luz blanca, la cantidad de biomasa declinó abruptamente a irradiancias superiores a 565 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ y además los cultivos se mantuvieron estables durante un período muy corto (Tablas XVI y XVII).

Los valores promedio de la densidad de células tuvieron diferencias significativas, por efecto del tipo e irradiancia utilizada (Tablas XVIII y XIX). En términos generales, la concentración celular se incrementa con el aumento de la irradiancia.

El peso seco y el contenido de cenizas de las células resultan con una tendencia inversa, disminuyen al aumentar la irradiancia (Tabla XIX). Las mayores concentraciones celulares se obtuvieron en los cultivos expuestos a luz blanca. Los mantenidos en los dos tipos de luz azul

Tabla XVI. Resumen de las pruebas de significancia de la pendiente de la regresión ($b=0$) entre los valores de densidad óptica medida diariamente y la edad del cultivo (en días), para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenidos con distintos tipos de luz e irradiancias.

$\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$	% de dilución	N	Luz azul decisión	Luz azul mezclada decisión	Luz blanca decisión
199	50	24	acepta	acepta	acepta
232	50	9	rechaza	rechaza	acepta
366	50	9	rechaza	rechaza	acepta
432	50	12	acepta	acepta	acepta
498	50	12	acepta	acepta	acepta
498*	50	9	acepta	acepta	acepta
498	75	21	----	----	acepta
498	85	12	----	----	acepta
565	50	21	acepta	acepta	acepta
565*	50	15	acepta	acepta	acepta
565	75	21	acepta	acepta	----
565	85	12	acepta	acepta	----
665	50	15	acepta	acepta	acepta
764	50	12	acepta	acepta	----

*Repetición del experimento a diferentes tiempos; ----: no efectuada.

Tabla XVII. Valores promedios y desviación estándar del número de células ($\text{cél} \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenidos bajo diferentes condiciones de cultivo y tres tipos de luz: luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

$\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$	% de dilución	N	Células y tipo de luz		
			LA	LM	LB
199	50	24	2.23(0.35)	1.69(0.26)	2.90(0.41)
232	50	9	2.90(0.34)	2.40(0.18)	4.10(0.32)
366	50	9	3.60(0.21)	3.21(0.16)	5.18(0.26)
432	50	12	4.66(0.47)	5.00(0.11)	7.40(0.27)
498	50	12	6.80(0.21)	7.28(0.17)	7.80(0.36)
498*	50	9	7.30(0.29)	7.50(0.26)	8.10(0.24)
498	75	21	-----	-----	6.12(0.28)
498	85	12	-----	-----	6.02(0.29)
565	50	21	6.60(0.26)	6.82(0.15)	7.31(0.42)
565*	50	15	7.58(0.32)	7.60(0.18)	8.00(0.32)
565	75	21	5.26(0.33)	5.32(0.21)	-----
565	85	12	6.27(0.41)	6.36(0.21)	-----
665	50	15	4.20(0.26)	4.10(0.25)	5.12(0.20)
764	50	12	6.30(0.32)	6.21(0.17)	-----

*Repeticiones del experimento a diferentes tiempos; ---: no efectuada.

Tabla XVIII. Análisis de varianza de dos vías para el número de células, microgramos del peso orgánico seco y peso de las cenizas por millón de células para los cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en un gradiente de irradiación de luz azul, azul mezclada y blanca.

NUMERO DE CELULAS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	128.291	21.382	248.579	<0.0001
Tipo de luz	2	6.558	3.279	38.119	<0.0001
Gradiente de luz	4	125.653	31.413	365.199	<0.0001
Interacción	7	12.213	1.745	20.284	0.8327
Residual	27	2.323	0.086		
Total	40	144.827			

PESO ORGANICO SECO

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	3103.891	517.315	23.901	<0.0001
Tipo de luz	2	1983.316	991.658	45.817	<0.0001
Gradiente de luz	4	1113.705	278.426	12.864	0.0244
Interacción	7	426.783	60.969	2.817	0.8896
Residual	27	584.389	21.644		
Total	40	4115.064			

PESO DE LAS CENIZAS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	1183.199	197.199	12.250	<0.0001
Tipo de luz	2	691.644	345.822	21.483	<0.0001
Gradiente de luz	4	509.785	127.446	7.917	0.0002
Interacción	7	41.827	5.975	0.371	0.9932
Residual	27	434.637	16.098		
Total	40	1659.663			

Tabla XIX. Valores promedios y desviación estándar del número de células, del peso seco y del peso de las cenizas (en μg por millón de células) para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp., mantenidos con una dilución del 50% por día en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.

$\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$	$\text{cél}\cdot 10^6\cdot\text{ml}^{-1}$	μg de peso seco por 10^6 células	μg de peso de cenizas por 10^6 células
Luz azul			
199	2.23 (0.35)b	52.72 (3.83)cd	21.38 (2.42)de
432	4.56 (0.47)d	52.48 (1.75)cd	15.57 (1.30)abcd
498	6.80 (0.21)gh	50.13 (2.23)bc	14.62 (1.54)abc
565	6.60 (0.26)fg	48.62 (7.67)bc	14.17 (1.97)ab
665	6.27 (0.41)ef	49.32 (1.27)bc	12.16 (2.30)a
Luz azul mezclada			
199	1.69 (0.26)a	72.02 (3.59)f	30.17 (6.47)f
432	5.00 (0.11)d	65.98 (6.06)ef	20.96 (2.94)cde
498	7.28 (0.17)hi	63.20 (8.08)e	23.06 (8.09)e
565	6.82 (0.15)gh	63.49 (5.09)e	23.49 (4.71)e
665	6.36 (0.21)efg	60.11 (2.61)de	21.22 (4.15)bcde
Luz blanca			
199	2.90 (0.41)c	66.03 (5.62)ef	22.27 (6.17)e
432	7.40 (0.27)ij	52.09 (3.73)c	15.16 (2.85)abcd
498	7.80 (0.36)j	42.50 (5.10)ab	11.79 (1.17)a
565	6.02 (0.29)e	40.17 (1.30)a	11.26 (2.61)a

resultaron inferiores y en general poco diferentes entre sí. El peso seco celular y el contenido de cenizas resultaron significativamente mayores en luz azul mezclada. Los valores menores se obtuvieron para las dos irradiancias superiores de luz blanca (Tabla XIX).

Al finalizar estos ensayos, se intentó nuevamente aumentar el porcentaje diario de dilución, con las concentraciones de cada tipo de luz con las cuales se había obtenido la mayor producción de biomasa y así contrariamente a las pruebas efectuadas anteriormente, los porcentajes de dilución ensayadas (75 y 85 %) permitieron la estabilización de los cultivos con respecto al tiempo (Tablas XVI y XVII), pero en todos los casos el número de células por unidad de volumen fue inferior a los valores obtenidos con la dilución de 50 % por día (Tablas XVI y XVII).

III.2.c. CONCENTRACION DE NUTRIENTES

Debido a las altas concentraciones celulares obtenidas en los ensayos anteriores, se pensó que la producción de biomasa pudiera ser limitada por disponibilidad de nutrientes en el medio. Por este motivo, se incrementó al doble la concentración de nutrientes disponibles (medio 2f) y se notó que la densidad celular producida no aumentó en ninguno de los casos (Tabla XX).

El contenido de nitrógeno disponible en los diez litros de medio f de un carboy, sin considerar la concentración original de compuestos nitrogenados del agua de mar, es de 246.2 mg. Utilizando los datos de concentración celular y de peso seco por millón de células que ya se mencionaron en el apartado anterior, y los porcentajes de proteínas que se detallan más adelante, se calculó el total de nitrógeno proteico presente en un carboy (16% del total de proteínas; e.g. Tacon, 1990) para cada situación experimental. Se obtuvo que el contenido de nitrógeno proteico de un carboy mantenido en luz azul mezclada es cerca del 50% más que la cantidad disponible en el medio, para las concentraciones de luz superiores a $498 \mu\text{mol s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Para los cultivos mantenidos en luz azul, se calculó que solamente hay un 4% más del nitrógeno disponible, en las células cultivadas con la misma cantidad de luz y que para los cultivos mantenidos en luz blanca la concentración de nitrógeno celular fue inferior a la del medio, para todas las irradiancias (Tabla XXI).

Tabla XX. Valores promedios (en paréntesis: desviación estándar) del número de células ($\text{cél} \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$) y porcentaje de proteínas (en % del peso seco total) para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en dos diferentes concentraciones de nutrientes y con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

Tipo de luz	$\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$	Tipo de medio	% de dilución	Número de células	% de proteínas
LA	565	f	50	6.60(0.26)	47.31 (2.91)
LA	565	2f	50	5.30(0.28)	45.93 (1.26)
LA	565	f	75	5.26(0.33)	46.98 (2.40)
LM	565	f	50	6.82(0.15)	51.86 (1.90)
LM	565	2f	50	5.36(0.18)	52.36 (2.38)
LM	565	f	75	5.32(0.21)	53.26 (2.25)
LB	498	f	50	6.02(0.29)	36.57 (1.20)
LB	498	2f	50	6.10(0.26)	37.26 (1.92)
LB	498	f	75	6.12(0.28)	36.44 (2.26)

Tabla XXI. Valores promedios del peso seco por carboy (mg por carboy) porcentaje de proteínas y contenido de nitrógeno proteico (mg N proteico por carboy) para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp., mantenidos con una dilución del 50% por día en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.

$\mu\text{mol's}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$	mg de peso seco por carboy	porcentajes de proteínas	mg de N proteico por carboy
Luz azul			
199	5.27	33.95	63.83
432	5.25	34.25	131.14
498	5.01	46.26	252.31
565	4.86	47.31	242.90
665	4.93	45.20	223.64
Luz azul mezclada			
199	7.20	35.50	69.13
432	6.60	39.26	207.23
498	6.32	49.26	362.63
565	6.35	51.86	359.29
665	6.01	50.21	307.12
Luz blanca			
199	6.60	31.93	97.83
432	5.21	33.69	207.78
498	4.25	36.57	193.97
565	4.01	38.29	148.15

III.3. COMPOSICION DE *Chaetoceros* sp.

III.3.a. PIGMENTOS

Desde el punto de vista cualitativo, los espectros de absorción obtenidos en vivo y por extracción (ver sección II.5) presentaron una diferencia en la longitud de onda del máximo de absorción en la banda del rojo, que disminuyó desde 680 a aproximadamente 665 nm, mientras que la posición del pico de absorción en el azul quedó invariada cerca de 450 nm. Además, examinando los espectros obtenidos con cultivos mantenidos con la misma irradiancia en los tres tipos de luz, no se notaron diferencias importantes, que no pudieran ser adscritas a diferencias de la concentración de células, o de sus pigmentos, en los cultivos mismos (Fig. 3).

Para fines comparativos, los valores de la concentración de los tres tipos de clorofilas y de los carotenoides se normalizaron en unidades de peso seco (ng mg^{-1} de peso seco total). Para la clorofila a, la tendencia general fue la de disminuir su concentración conforme aumenta la cantidad de luz, alcanzando valores similares para los tres tipos de luz a irradiancias superiores a $432 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Para los dos tipos de luz azul, las concentraciones fueron iguales a bajas cantidades de luz ($199 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), y resultaron ser significativamente mayores de la de los cultivos en igual irradiancia con luz blanca (Tablas XXII y XXIII).

Para la clorofila b se encontró una tendencia opuesta, con concentraciones relativas mayores conforme aumenta la irradiancia de los tres tipos de luz. Como en el caso anterior, para las bajas irradiancias de los dos tipos de luz azul ($199 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) se encontraron valores iguales y significativamente mayores de los obtenidos para los cultivos mantenidos con la misma irradiancia de luz blanca (Tablas XXII y XXIII).

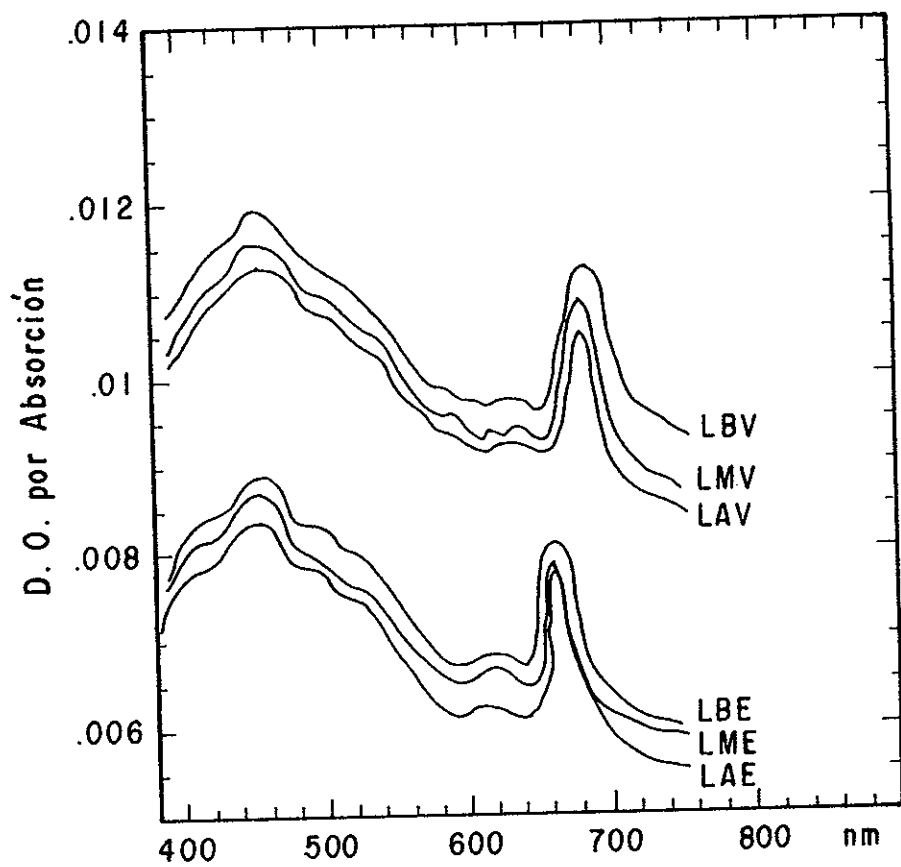


Figura 3. Espectros de absorción en vivo (V) y con extracción (E) para *Chaetoceros* sp. mantenido en cultivos semicontinuos con luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

Tabla XXII. Valores promedios y desviación estándar del contenido de clorofilas (a, b y c), y de carotenoides (expresados en ng mg^{-1} de peso seco), para los cultivos semicontinuos mantenidos en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.

$\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$	TIPOS DE CLOROFILAS			CAROTENOIDES
	a	b	c	
Luz azul				
199	205.2(12.3)c	4.0(0.2)b	152.6(22.1)e	2.8(0.9)a
432	97.1(2.3)b	6.3(20.4)cd	96.0(2.2)c	5.7(0.6)c
498	59.0(3.1)a	8.9(0.5)ef	38.0(3.1)ab	9.6(0.9)fg
565	62.5(1.9)a	9.3(0.2)g	27.0(1.9)a	10.8(0.8)g
665	63.2(1.7)a	7.3(0.6)de	26.0(2.3)a	9.3(0.4)ef
Luz azul mezclada				
199	204.3(24.3)c	3.8(0.3)b	168.9(19.3)e	1.6(0.4)a
432	62.5(1.8)a	5.6(0.6)c	99.0(1.6)c	4.3(0.2)b
498	42.6(1.7)a	6.5(0.7)cd	26.0(1.3)a	7.3(0.9)d
565	47.0(1.9)a	7.2(0.6)de	27.0(1.6)a	8.4(0.8)de
665	53.2(2.6)a	9.2(0.2)g	22.0(1.7)a	7.6(0.7)d
Luz blanca				
199	117.9(20.3)b	1.2(0.4)a	432.6(17.2)f	4.6(0.3)bc
432	51.2(1.1)a	6.2(0.2)cd	123.2(1.6)d	8.3(0.4)de
498	59.7(2.2)a	9.9(0.4)g	48.9(1.3)b	9.6(0.6)fg
565	54.2(1.3)a	8.8(0.9)fg	46.3(2.6)b	9.8(0.6)fg

Tabla XXIII. Análisis de varianza de dos vías para el contenido de clorofilas (a, b y c) y carotenoides estimados para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp., mantenidos en un gradiente de irradiancia de diferentes tipos de luz.

Clorofila a

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	0.0918	0.0153	82.6	<0.0001
Tipo de luz	2	0.0067	0.0033	18.3	<0.0001
Gradiente de luz	4	0.0894	0.0224	120.7	<0.0001
Interacción	7	0.0130	0.0018	10.1	<0.0001
Residual	27	0.0050	0.0001		
Total	40	0.1099			

Clorofila b

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	1.81X10 ⁻⁴	3.02X10 ⁻⁵	52.9	<0.0001
Tipo de luz	2	1.88X10 ⁻⁶	9.44X10 ⁻⁷	1.7	<0.2110
Gradiente de luz	4	1.76X10 ⁻⁴	4.42X10 ⁻⁵	77.4	<0.0001
Interacción	7	4.26X10 ⁻⁵	6.09X10 ⁻⁶	10.6	<0.0001
Residual	27	1.54X10 ⁻⁵	5.70X10 ⁻⁷	10.6	
Total	40	2.39X10 ⁻⁴			

Clorofila c

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	0.3744	0.0624	665.3	<0.0001
Tipo de luz	2	0.9960	0.0248	264.9	<0.0001
Gradiente de luz	4	0.2948	0.0737	785.9	<0.0001
Interacción	7	0.0906	0.0129	137.5	<0.0001
Residual	27	0.0025	9.37X10 ⁻⁵		
Total	40	0.4672			

Carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	2.91X10 ⁻⁴	4.85X10 ⁻⁵	100.0	<0.0001
Tipo de luz	2	4.98X10 ⁻⁵	2.49X10 ⁻⁵	51.4	<0.0001
Gradiente de luz	4	2.45X10 ⁻⁴	6.13X10 ⁻⁵	126.3	<0.0001
Interacción	7	1.25X10 ⁻⁵	1.79X10 ⁻⁶	3.6	0.0063
Residual	27	1.31X10 ⁻⁵	4.85X10 ⁻⁷		
Total	40	3.17X10 ⁻⁴			

La concentración relativa de la clorofila c, como en el caso de la a, fue menor en los cultivos mantenidos en altos valores de irradiancia, resultando en valores similares para las mayores irradiancias de los dos tipos de luz azul y significativamente inferiores a la de los cultivos en luz blanca. Igualmente, para las bajas concentraciones de los dos tipos de luz azul, se encontraron valores similares, y significativamente menores a los encontrados con la misma cantidad de luz blanca (Tablas XXII y XXIII).

Los carotenoides tienden a incrementar en la medida que aumenta la cantidad de los tres tipos de luz. Análogamente a lo descrito para los otros pigmentos, se evaluó una cantidad igual en la menor irradiancia de los dos tipos de luz azul, significativamente inferior de la evaluada en luz blanca.

III.3.b. COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS

Se encontró un patrón general de respuesta: para todos los cultivos semicontinuos mantenidos en un gradiente de irradiancia de los tres tipos de luz, el contenido de proteínas y de carbohidratos tiende a aumentar si se incrementa la cantidad de luz, mientras que para los lípidos y las cenizas existe una tendencia inversa. La única excepción a este patrón fue para los carbohidratos en los cultivos con luz azul mezclada, que permanecieron sin cambio significativo en el gradiente de luz y con valores muy inferiores a los demás (Tabla XXIV).

Al contrastar por medio de un análisis de varianza de dos vías las concentraciones de cada una de las fracciones bioquímicas principales, resultó que para cada tipo de luz existe una diferencia significativa en el porcentaje de cada constituyente (con la excepción de los carbohidratos en los cultivos en luz mezclada) a bajas irradiancias de luz (199 y 432 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) comparativamente a lo evaluado para los mayores niveles de irradiancia (Tablas XXIV y XXV). Los mayores porcentajes de proteínas y de lípidos fueron de los cultivos en luz azul mezclada, seguidos de los obtenidos para luz azul en el caso de las proteínas y de los cultivos en luz blanca para los lípidos. En la mayoría de los casos, las proteínas fueron significativamente inferiores en luz blanca (Tabla XXIV). Lo anterior corresponde al patrón general de respuesta mencionado en la literatura.

El contenido de aminoácidos de *Chaetoceros* sp. cultivado bajo los tres tipos de luz y a la irradiancia de luz que resultó en la mayor producción de biomasa, no resultó muy diferente (Tabla XXVI). Los más abundantes fueron el ácido aspártico, el glutámico, la alanina

Tabla XXIV. Valores promedios y desviación estándar (en porcentaje del peso seco total) de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp., mantenidos a una dilución del 50% por día y en un gradiente de irradiación de tres tipos de luz.

$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas	Total
Luz azul					
199	33.95(3.97)ab	20.86(2.21)de	12.02(3.59)c	28.83(2.04)e	94.84
432	34.25(1.15)ab	19.15(0.42)cd	13.26(1.39)cd	22.88(1.19)ab	89.54
498	46.26(5.06)ef	12.27(0.99)a	16.37(1.59)efg	22.52(0.36)ab	97.40
565	47.31(2.91)efg	11.21(1.32)a	17.23(1.31)fg	22.66(1.54)ab	98.35
665	45.20(0.97)e	12.41(0.66)a	18.43(0.67)g	22.34(1.97)ab	98.34
Luz azul mezclada					
199	35.50(0.64)bc	28.87(2.84)g	3.72(1.34)a	30.88(1.74)f	98.97
432	39.26(0.37)d	27.43(1.36)g	2.61(0.92)a	24.10(0.49)bc	93.40
498	49.26(0.67)fgh	17.40(1.37)bc	3.92(0.74)a	26.73(2.80)de	97.31
565	51.86(1.90)h	18.49(2.91)bcd	4.67(0.86)a	24.22(1.71)bc	99.24
665	50.21(0.37)gh	18.36(2.31)bcd	3.70(0.92)a	24.36(0.79)bc	96.63
Luz blanca					
199	31.93(0.36)a	22.23(0.63)ef	9.40(0.94)b	25.70(0.36)cd	89.26
432	33.69(0.28)abc	24.23(0.95)f	12.37(1.27)c	22.52(0.93)ab	92.81
498	36.57(1.20)bcd	17.46(0.47)bc	14.00(0.47)cde	21.71(0.44)a	89.74
565	38.29(2.60)cd	15.93(0.52)b	15.22(2.47)def	20.63(0.32)a	90.07

Tabla XXV. Análisis de varianza de dos vías ($\alpha=0.05$) para las fracciones bioquímicas de *Chaetoceros* sp. cultivado en un gradiente de irradiancia de luz azul, azul mezclada y blanca.

PROTEINAS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	1637.829	272.971	66.212	<0.0001
Tipo de luz	2	492.495	246.248	59.730	<0.0001
Gradiente de luz	4	968.079	242.072	58.717	<0.0001
Interacción	7	170.313	24.297	5.893	0.0003
Residual	27	111.313	4.122		
Total	40	1919.221			

LIPIDOS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	1085.137	180.856	76.575	<0.0001
Tipo de luz	2	333.617	166.809	70.627	<0.0001
Gradiente de luz	4	697.313	174.328	73.811	<0.0001
Interacción	7	44.528	6.361	2.693	0.0298
Residual	27	63.769	2.362		
Total	40	1193.434			

CARBOHIDRATOS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	1271.936	211.989	120.450	<0.0001
Tipo de luz	2	1186.922	593.461	337.198	<0.0001
Gradiente de luz	4	77.265	19.316	10.975	<0.0001
Interacción	7	41.761	5.966	3.390	0.0100
Residual	27	47.519	1.760		
Total	40	1361.216			

CENIZAS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Efecto principal	6	295.145	49.199	27.451	<0.0001
Tipo de luz	2	96.314	48.157	26.874	<0.0001
Gradiente de luz	4	208.075	52.019	29.029	<0.0001
Interacción	7	20.772	2.967	1.656	0.1625
Residual	27	48.383	1.792		
Total	40	364.300			

Tabla XXVI. Contenido de aminoácidos (en % de aminoácidos totales) de *Chaetoceros* sp. mantenido en cultivo semicontinuo con un porcentaje de dilución diaria de 50 %. LA y LM: 565 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz azul y azul mezclada, respectivamente. LB: 498 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz blanca.

AMINOACIDOS	LA	LM	LB
Lisina	7.26	6.80	6.45
Histidina	2.70	3.04	2.86
Arginina	6.46	5.37	5.16
Ac. Aspártico	12.17	12.97	13.36
Treonina	4.96	5.37	5.25
Serina	5.41	5.46	6.08
Ac. Glutámico	13.82	13.77	14.29
Prolina	5.00	5.10	5.25
Glicina	6.00	6.35	6.18
Alanina	7.21	6.98	8.29
Valina	5.76	5.28	5.90
Metionina	0.20	0.63	0.18
Isoleucina	5.26	5.28	4.42
Leucina	9.36	9.57	8.94
Tirosina	2.60	2.59	2.49
Fenilalanina	5.86	5.46	4.88

y la leucina. Sin embargo, si se consideran las diferencias ya señaladas en el contenido de proteínas para cada tipo de luz, estas diferencias pudieran resultar cuantitativamente importantes. En el caso de la metionina, por ejemplo, que es considerado un aminoácido semi esencial se halló en mayor concentración en los cultivos en luz azul mezclada (0.63) que en los con luz azul (0.20) o blanca (0.18), lo cual pudiera tener importantes consecuencias sobre el valor dietético de la biomasa resultante.

En el caso de los ácidos grasos los perfiles obtenidos para *Chaetoceros* sp. cultivado en los diferentes tipos de luz, con la misma irradiancia mencionada para los aminoácidos, presentaron algunas diferencias, particularmente evidentes para los ácidos esteárico, oléico y linoléico (Tabla XXVII). Los más abundantes, como es común para las microalgas, fueron los ácidos mirístico, palmítico y palmitoléico. Los ácidos grasos de cadena larga (18C o superiores) y altamente insaturados (dos o más doble uniones), que se consideran esenciales para crustáceos y peces (Tacon, 1990) tuvieron concentraciones generalmente bajas, aunque superiores en luz blanca y mezclada que en la luz azul. En cambio, los ácidos 18C esteárico y oléico fueron más abundantes en la luz azul. El porcentaje de insaturación fue ligeramente superior en la luz azul (59.07%), seguido de los medidos para la luz azul mezclada (55.03%) y blanca (54.38%).

III.4. BIOENSAYO DE ALIMENTACION

III.4.a. VARIACIONES EN LA COMPOSICION PROXIMAL DE *Chaetoceros* sp. POR EFECTO DEL CAMBIO DE IRRADIANCIA Y DEL TIPO DE LUZ.

Por medio de una prueba t de diferencia de medias se compararon los valores de los porcentajes de las diferentes fracciones orgánicas de *Chaetoceros* sp. cultivado durante 24 horas con el tipo y cantidad de luz a los cuales las células estarían expuestas durante el bioensayo de alimentación. Se encontró que no hay diferencias entre los valores promedio calculados para cultivos expuestos a un cambio de tipo y de cantidad de luz, con respecto a los mantenidos en las condiciones originales de cultivo (Tablas XXVIII a XXX). Por otro lado, se notó que en el transcurso del tiempo se presentan algunas variaciones para cada uno de los constituyentes en cada tipo de luz. Estos cambios, que fueron menos evidentes para luz blanca, se produjeron en general en forma paralela en los cultivos mantenidos en las condiciones originales de luz y en los expuestos a la nueva situación.

Al evaluar los porcentajes de cambio con respecto al tiempo, se encontró que las variaciones resultantes son en general similares y que solamente en el caso de luz mezclada hay una diferencia

Tabla XXVII. Contenido de ácidos grasos (en % de ácidos grasos totales) de *Chaetoceros* sp. mantenido en cultivo semicontinuo con un porcentaje de dilución diaria de 50 %. LA y LM: 565 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de luz azul y azul mezclada, respectivamente. LB: 498 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ de luz blanca.

ACIDOS GRASOS	LA	LM	LB
Saturados			
Laurístico (12:0)	0.41	0.20	0.22
Mirístico (14:0)	13.19	22.91	18.78
Palmítico (16:0)	18.86	20.96	25.63
Esteárico (18:0)	8.47	0.89	1.00
Porcentaje	40.93	44.96	45.63
Insaturados			
Miristoléico (14:1)	0.51	1.04	0.97
Palmitoléico (16:1)	42.37	50.23	49.89
Oléico (18:1)	15.75	2.13	2.02
Linoléico (18:2)	0.13	0.92	0.89
Linolénico (18:3)	0.10	0.39	0.37
Gadoléico (20:3)	0.21	0.32	0.24
Porcentaje	59.07	55.03	54.38

Tabla XXVIII. Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz azul o expuestos a $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de luz blanca.

Tipo de luz	Tiempo (Hrs)	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Con cambio de tipo de luz				
	0	30.76 (1.16)b	34.06 (8.80)b	19.51 (4.78)d
Luz azul a luz blanca	6	30.88 (1.96)b	28.02 (1.22)b	22.15 (4.43)d
	12	24.18 (3.76)a	19.82 (5.37)a	16.96 (1.50)d
	18	36.40 (0.45)c	15.80 (1.57)a	6.42 (0.09)a
	24	32.69 (3.52)b	21.35 (1.89)b	9.52 (0.63)b
Promedio		30.98 (4.43)a	23.80 (7.22)a	14.91 (6.68)a
Sin cambio de tipo de luz				
	0	30.76 (1.16)b	34.06 (8.80)b	19.51 (4.78)d
Luz azul	6	34.68 (5.91)b	24.77 (5.33)b	13.81 (0.23)c
	12	23.03 (0.68)a	26.12 (3.64)b	15.60 (0.90)d
	18	43.41 (2.01)c	13.91 (4.04)a	6.97 (0.73)a
	24	33.18 (2.63)b	21.17 (1.76)b	9.63 (1.73)b
Promedio		33.01 (7.34)a	24.00 (7.35)a	11.10 (5.64)a

Tabla XXIX. Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz azul mezclada, o expuestos a $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de luz blanca.

Tipo de luz	Tiempo (Hrs)	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Con cambio de tipo de luz				
	0	33.57 (2.35)a	31.73 (3.66)c	2.08 (0.03)a
Luz azul mezclada a luz blanca.	6	38.04 (0.24)b	16.86 (5.02)a	11.63 (1.69)c
	12	33.78 (0.71)a	14.39 (2.31)a	6.44 (2.76)b
	18	34.63 (0.73)a	15.95 (1.85)a	5.64 (0.69)b
	24	33.56 (2.35)a	31.75 (3.65)c	6.30 (2.55)b
Promedio		34.71 (1.90)a	22.13 (8.81)a	6.42 (3.41)a
Sin cambio de tipo de luz				
	0	33.57 (2.35)a	31.73 (3.66)c	2.08 (0.03)a
Luz azul mezclada	6	35.25 (5.04)b	33.45 (5.75)c	10.66 (6.80)b
	12	31.48 (0.93)a	14.45 (2.27)a	16.77 (2.75)c
	18	38.54 (5.51)a	19.89 (2.55)b	5.91 (0.44)b
	24	33.96 (2.75)a	12.98 (0.27)a	5.17 (0.66)b
Promedio		34.56 (2.60)a	22.50 (9.58)a	8.11 (5.73)a

Tabla XXX. Valores promedios y desviación estándar, de la composición proximal en el transcurso del tiempo para los cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en las condiciones originales de cultivo en luz blanca, expuestos a una $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de luz blanca.

Tipo de luz	Tiempo (Hrs)	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Con cambio de tipo de luz				
	0	31.89 (2.83)a	25.79 (6.38)a	11.21 (3.19)b
Luz blanca a luz blanca.	6	32.55 (1.77)a	22.22 (1.53)a	12.17 (1.13)b
	12	39.20 (1.55)b	22.52 (2.51)a	6.65 (1.36)a
	18	30.47 (1.86)a	31.91 (3.05)a	13.09 (1.34)b
	24	31.20 (2.62)a	32.50 (3.33)a	11.44 (2.69)b
	Promedio		33.06 (3.52)a	26.79 (4.86)a
Sin cambio de tipo de luz				
	0	31.89 (2.83)a	25.79 (6.38)a	11.21 (3.19)b
Luz blanca	6	30.19 (0.97)a	24.61 (4.74)a	9.11 (0.49)b
	12	32.92 (1.03)a	27.51 (5.47)a	16.51 (1.98)b
	18	36.60 (1.40)b	31.81 (5.11)a	12.05 (1.08)b
	24	31.92 (1.03)a	32.50 (5.47)a	16.51 (1.98)b
	Promedio		32.70 (2.38)a	32.60 (9.12)a

importante en los lípidos (Fig. 4). Por lo anterior, se consideró que no era necesario modificar la frecuencia de los cambios de agua de los acuarios destinados al bioensayo de alimentación con *Artemia*, ya que en promedio las variaciones producidas a la calidad del alimento no eran significativas.

III.4.b CRECIMIENTO DE *Artemia*

Por medio de una serie de análisis de varianza de una vía, se verificó la falta de diferencia entre las tres repeticiones de cada tratamiento (Tabla XXXI), por lo cual se contrastaron en forma global, con la misma técnica de análisis estadístico, los valores de longitud total obtenidos por cada estadio de vida de *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. mantenido en los tres tipos de luz. Para los estadios de nauplius no se encontraron diferencias importantes de talla entre las diferentes dietas (Tablas XXXI y XXXII). Sin embargo, se detectaron diferencias de longitud para los metanauplius, juveniles y adultos, por efecto del alimento suministrado (Tabla XXXII y XXXIII). Para estos estadios las mayores tallas correspondieron a los organismos alimentados con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul, el segundo lugar fue para la dieta en luz azul mezclada y la talla menor fue la de *Artemia* alimentada con las microalgas mantenidas en luz blanca.

Al evaluar la duración de cada etapa de vida de *Artemia* alimentada con las distintas dietas, se encontró que la alimentación con *Chaetoceros* sp. mantenido en luz blanca causó una mayor duración (1 día) del estadio de metanauplius, con respecto a los otros dos casos (Tabla XXXIV). Además, a pesar de que con dos de los tratamientos los organismos llegaron a la etapa de adulto en igual período de tiempo, se encontraron diferencias en el número de días necesarios para alcanzar la madurez sexual e iniciar a formar las parejas, que fue menor con las microalgas cultivadas en luz azul mezclada (9 días) comparativamente con las de luz azul (12 días) y aún más con las de luz blanca (13 días). Cabe destacar también que el porcentaje de sobrevivencia, fue mayor con *Chaetoceros* sp. mantenido en luz azul mezclada (96%), seguido de la luz azul (84%) e inferior con la luz blanca (76%).

Las curvas de crecimiento de *Artemia* (machos y hembras) alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con las diferentes condiciones de luz (Fig. 5), presentan una tendencia exponencial, donde las tallas mayores correspondieron a organismos adultos alimentados con microalgas producidas con luz azul (aprox. 5700 micras) y azul mezclada (5300 micras) e inferiores con la luz blanca (4850 micras). Sin embargo, los valores promedio de longitud estimados para el día 14 tuvieron un marcado decremento en los tres tratamientos, posiblemente debido a una diferencia en la tasa de mortalidad de los organismos de distinto sexo.

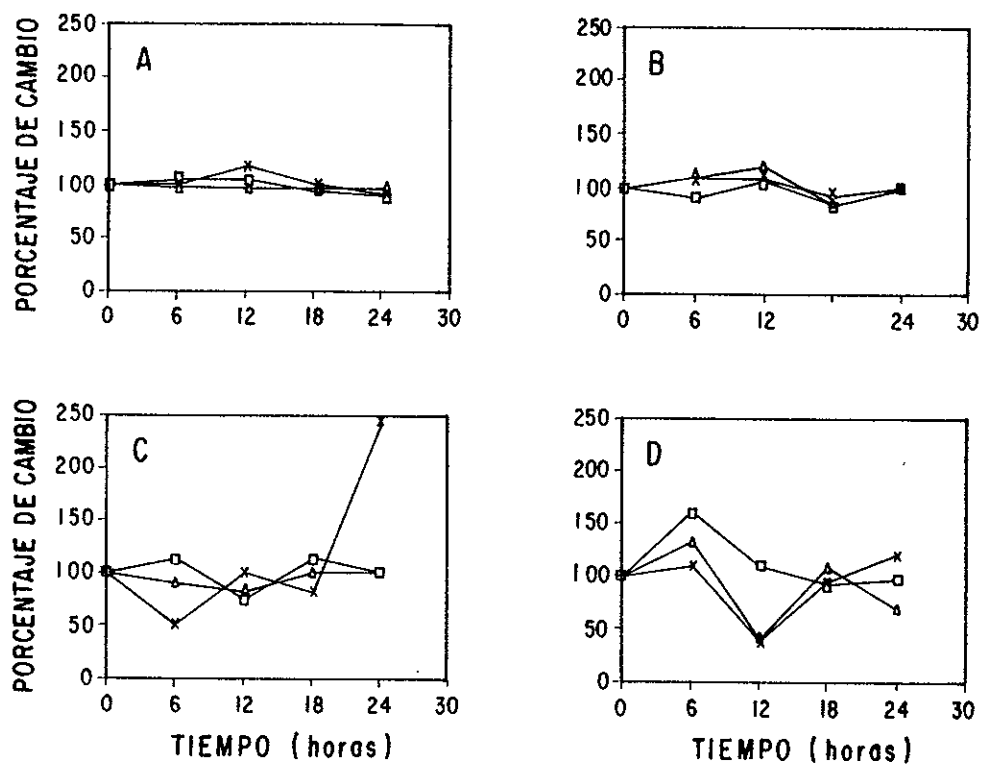


Figura 4. Porcentaje de cambio de cada uno de los constituyentes celulares evaluados al efectuar una variación de la irradiancia y del tipo de iluminación. A: número de células ml⁻¹, B: proteínas, C: lípidos y D: carbohidratos. Luz azul en cuadros, luz azul mezclada en asterisco y luz blanca en triángulos.

Tabla XXXI. Valores de nivel de significancia del análisis de varianza de una vía realizada por cada día con las tres repeticiones de cada tratamiento, con los datos de longitud de *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. mantenido en tres tipos de luz.

Día	TIPOS DE LUZ					
	AZUL		AZUL MEZCLADA		BLANCA	
	n	Significancia	n	Significancia	n	Significancia
1	89	0.4473	89	0.3025	89	0.4473
2	90	0.1472	90	0.3253	90	0.2418
3	90	0.7644	90	0.2832	90	0.7343
4	90	0.3175	85	0.3432	90	0.3054
5	88	0.1058	90	0.3474	90	0.6605
6	83	0.5101	84	0.6709	90	0.2960
7	87	0.6595	86	0.3850	80	0.5231
8	85	0.2639	85	0.2150	80	0.2231
9	85	0.6345	85	0.2786	86	0.1826
10	83	0.2743	84	0.6862	84	0.2932
11	88	0.6938	83	0.4598	85	0.1740
12	89	0.7899	85	0.3947	83	0.4268
13	84	0.1078	85	0.1537	84	0.3327
14	86	0.9926	83	0.9342	87	0.4329

Tabla XXXII. Valores promedios (X), desviación estándar (DE) y comparación a posteriori vía "LSD" ($\alpha=0.05$), de los valores de talla promedio (en μm) para los diferentes estadios de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

Nauplio	n	X	DE	Grupos Homogeneos "LSD"
LA	88	948.700	11.476	a
LM	90	977.646	9.011	ab
LB	89	947.362	11.425	a
Metanauplio	n	X	DE	Grupos Homogeneos "LSD"
LA	364	1833.588	51.684	b
LM	360	1776.013	27.195	b
LB	360	1703.368	25.215	a
Juvenil	n	X	DE	Grupos Homogeneos "LSD"
LA	331	4152.783	46.485	c
LM	345	4022.396	44.509	b
LB	344	3540.652	43.503	a
Adulto	n	X	DE	Grupos Homogeneos "LSD"
LA	295	5655.993	42.024	c
LM	326	5317.642	43.569	b
LB	322	4859.291	44.806	a

Tabla XXXIII. Análisis de varianza de una vía ($\alpha=0.05$) con los valores de la talla promedio (μm) de los diferentes estadios de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con diferentes tipos de luz.

Nauplio					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Entre grupos	2	52422.6	26211.3	2.581	0.0776
Dentro de grupos	264	2680998.6	10155.3		
Total	266	2733421.1			
Metanauplio					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Entre grupos	2	3042300.0	1521152.1	3.185	0.0418
Dentro de grupos	1071	511550000.0	477635.6		
Total	1073				
Juvenil					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Entre grupos	2	70735000.0	35367442.0	51.796	<0.0001
Dentro de grupos	1017	694440000.0	682828.0		
Total	1019				
Adulto					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Entre grupos	2	98999000.0	49499521.0	82.824	<0.0001
Dentro de grupos	940	561790000.0	597646.0		
Total	942				

Tabla XXXIV. Caracterización por estadio de vida y porcentaje de sobrevivencia (%S) de *Artemia franciscana*, alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado en luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB). N: Nauplio, M: Metanauplio, J: Juvenil, A: Adulto, FP: Formación de parejas.

	LA	LM	LB
N	0-1	0-1	0-1
M	2-5	2-5	2-6
J	6-9	6-9	7-10
A	10	10	11
FP	12	9*	13
%S	84	96	76

Nota: * Aún cuando el porcentaje de adultos presentes el día 9 fue inferior a lo estipulado (70%) para que esa fecha pudiera ser considerada como el día de cambio de estadio, se encontró que varios de los adultos ya habían formado parejas estables.

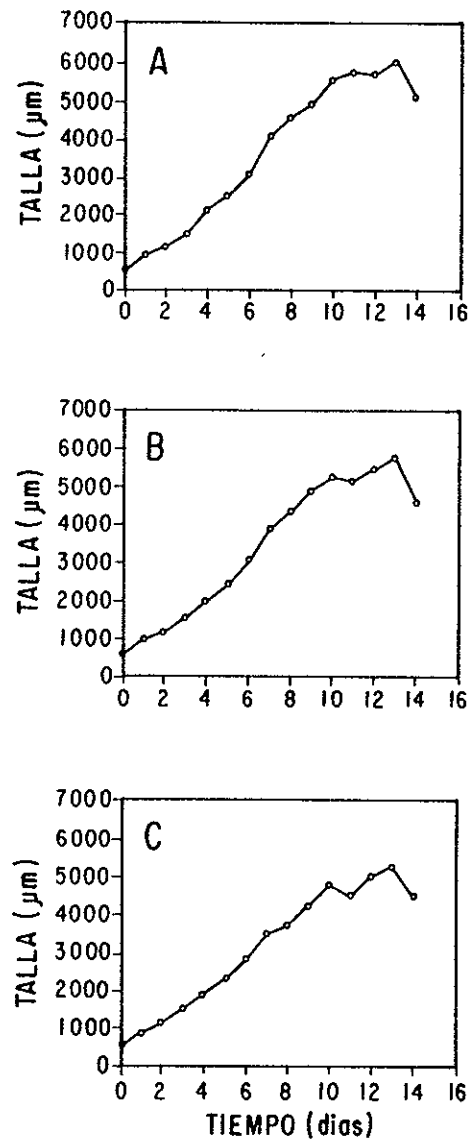


Figura 5. Curvas de crecimiento para *Artemia franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con luz azul (A), azul mezclada (B) y blanca (C).

III.4.c COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS DE *Artemia*.

El peso seco promedio de una *Artemia* adulta alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivada con los dos tipos de luz azul resultó igual (0.28 mg), y superior al que se obtuvo para los organismos que recibieron la otra dieta (Tabla XXXV). El mayor contenido de proteínas se midió en las *Artemias* alimentadas con *Chaetoceros* sp. cultivados en la luz azul mezclada (55.45), seguido por las correspondientes a luz azul (50.06) y en menor cantidad en la luz blanca (46.74). En cuanto a los valores de lípidos y carbohidratos, éstos resultaron muy cercanos para luz azul y blanca. Los valores más bajos fueron para luz azul mezclada. El porcentaje del contenido de cenizas fue mayor para luz blanca y aproximadamente igual en luz azul y mezclada (Tabla XXXV). Sin embargo, no fue posible efectuar una comparación estadística con estos datos, ya que la información proviene de una sola muestra obtenida para cada condición experimental.

Tabla XXXV. Valores de peso seco promedio (en mg) de cien individuos de *A. franciscana* (A) y su composición proximal (B) al ser alimentada con *Chaetoceros* sp., proveniente de los cultivos semicontinuos expuestos a luz azul (LA), azul mezclada (LM) y blanca (LB).

	LA	LM	LB
A) Peso Seco	28.00(1.90)	28.00(2.0)	23.00(1.5)
B) Análisis proximal			
Proteína	50.06	55.45	46.74
Lípidos	15.74	12.44	14.64
Carbohidratos	18.55	15.50	21.70
Cenizas	12.01	11.94	13.37

Con los perfiles de aminoácidos (Tabla XXXVI) se establece que, como en el caso de *Chaetoceros* sp., no existen diferencias importantes en las concentraciones relativas de los distintos aminoácidos. En este caso, la diferencia de contenido proteínico de los organismos que recibieron las diversas dietas no fue muy importante (<10%), por lo cual se puede considerar que la calidad de la biomasa de *Artemia*, desde el punto de vista de contenido de aminoácidos, no fue afectada en forma sustancial por la dieta.

Los perfiles de ácidos grasos de *Artemia* presentan un mayor porcentaje de insaturación para los organismos que recibieron la dieta cultivada en luz blanca, un valor ligeramente inferior para la dieta con luz azul y con valores menores para luz azul mezclada. Para *Artemia*, como para *Chaetoceros* sp., los ácidos mirístico, palmítico y palmitoléico fueron los más importantes (Tabla XXXVII).

Tabla XXXVI. Contenido de aminoácidos (en % de aminoácidos totales) de *A. franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp., proveniente de cultivos semicontinuos expuestos a luz azul, luz azul mezclada y luz blanca.

AMINOACIDOS	LA	LM	LB
Lisina	8.29	8.18	8.33
Histidina	2.73	2.90	2.95
Arginina	8.12	7.55	7.71
Ac. Aspártico	11.62	11.71	11.87
Treonina	5.02	4.23	5.33
Serina	5.03	5.64	5.69
Ac. Glutámico	13.43	14.86	15.26
Prolina	6.13	5.69	6.76
Glicina	5.23	5.38	5.02
Alanina	6.17	6.27	5.23
Valina	4.59	4.84	3.26
Metionina	0.62	0.67	0.52
Isoleucina	4.29	4.21	4.29
Leucina	9.27	8.91	9.11
Tirosina	4.44	4.21	4.11
Fenilalanina	5.00	4.70	4.66

Tabla XXXVII. Contenido de ácidos grasos (expresados en porcentajes del total) de *A. franciscana* alimentada con *Chaetoceros* sp., proveniente de cultivos semicontinuos expuestos a luz azul, luz azul mezclada y luz blanca.

ACIDOS GRASOS	LA	LM	LB
Saturados			
Laurístico (12:0)	0.15	0.39	0.24
Mirístico (14:0)	28.87	11.00	10.54
Palmítico (16:0)	16.43	21.23	20.18
Esteárico (18:0)	1.96	8.27	6.32
Porcentaje	47.41	40.89	37.28
Insaturados			
Miristoléico (14:1)	3.00	0.63	0.48
Palmitoléico (16:1)	37.88	40.98	45.00
Oléico (18:1)	8.91	16.50	14.51
Linoléico (18:2)	1.40	0.57	1.56
Linolénico (18:3)	0.85	0.20	0.58
Gadoléico (20:3)	0.56	0.13	0.53
Porcentaje	52.60	59.11	62.66

IV. DISCUSION

IV.1. CULTIVOS EN FRASCOS ERLLENMEYER

La tasa fotosintética aumenta linealmente con la intensidad luminosa hasta que se aproxima a una meseta en las intensidades de saturación. Este efecto, dentro de intervalos de valores que pueden ser diferentes para distintas especies, puede causar un incremento de la tasa de división celular de las microalgas, debido a la relación que existe entre otros procesos sintéticos (Steemann-Nielsen, 1975; Platt *et al.*, 1980). Se ha comprobado que la intensidad de la luz no es la única causante de estos cambios y que la calidad de la luz juega un papel muy importante en estas variaciones (Kirk, 1983).

La falta de diferencia entre las velocidades de crecimiento de los cultivos estáticos de *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira pseudonana*, mantenidos en gradientes de concentración de luz, demuestra que ninguna de las especies, por lo que se refiere a sus características de crecimiento fue limitada por la irradiancia.

Por lo anterior, las respuestas de las tres especies a la exposición a tres diferentes tipos de luz dependen solamente de la calidad de la luz y posiblemente a su diferente contenido energético. En dos casos (*Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum*), el patrón de la respuesta fue similar al descrito en la literatura, en la cual se menciona que la velocidad de crecimiento se incrementa al exponer las células del fitoplancton a luz azul (Senger, 1987; Hauschild *et al.*, 1991; Ojala, 1993).

Sin embargo, *T. pseudonana* no tuvo una respuesta de este tipo y, como ya fue descrito por Flaak y Epifanio (1978) para la misma cepa de esta especie, creció más rápidamente en la luz blanca que en la luz azul. Por este motivo, y debido a la finalidad del presente estudio, se decidió cultivar en forma semimasiva a *Chaetoceros* sp. que presenta un mayor interés, desde el punto de vista de producción de biomasa para la acuicultura, en comparación de *Skeletonema costatum* cuyo uso se ve limitado en la práctica por las dificultades señaladas por varios operadores comerciales, de mantener esta especie en cultivo.

IV.2. CULTIVOS SEMICONTINUOS

IV.2.a PORCENTAJE DE DILUCION

Se han descrito modelos matemáticos (Ketchum y Redfield, 1938; Monod, 1942), por medio de los cuales es posible determinar teóricamente la dilución económica (dilución con la cual se obtiene la máxima producción de biomasa). Sin embargo, en la literatura existen muchos ejemplos de trabajos en donde la aplicación de estos modelos no dió los resultados esperados. Estas discrepancias se deben a que estos modelos consideran independientes entre sí dos de las variables que se emplean (porcentaje de dilución y producción de biomasa), que son en realidad dependientes una de la otra. Por lo anterior, en la práctica es necesario realizar cultivos semicontinuos con diferentes diluciones y con base en los resultados, evaluar el porcentaje más conveniente (Droop, 1975).

Los datos obtenidos con los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp. mantenido en los tres tipos de luz, indican que la cantidad de biomasa celular producida con los diferentes porcentajes de dilución ensayados corresponde con la teoría de los cultivos semicontinuos. Según esta teoría, la cantidad de biomasa celular producida diariamente aumenta en relación al porcentaje de dilución, hasta llegar a un valor máximo después del cual existe una relación inversa entre el porcentaje de dilución y la cantidad de biomasa. Esto se debe a que, en cultivos densos, la velocidad de división celular es afectada negativamente por la escasa cantidad de luz disponible. Al aumentar la dilución, las mejores condiciones iniciales de iluminación causadas por la baja densidad de las células en suspensión, tienen como resultado un incremento de la velocidad de división celular, que nuevamente es limitada cuando la cantidad de luz disponible al interior del cultivo vuelve a disminuir. Por otro lado, porcentajes de dilución diarios demasiado cercanas a los valores máximos de la velocidad de crecimiento tienen como efecto el decaimiento del cultivo, lo cual pudo ser comprobado experimentalmente en este trabajo.

López-Elías y Voltolina (1993), encontraron que con la misma especie de diatomea usada en este estudio, mantenida en exposición a luz blanca, la dilución de 50 % por día permite la estabilización de los cultivos. Lo anterior fue comprobado con los resultados obtenidos para luz blanca en esta investigación. Sin embargo, para los cultivos expuestos a luz azul y azul mezclada no se encontró en la literatura con un punto de comparación.

Las observaciones de la densidad óptica realizadas a intervalos de 12 horas, presentaron para todos los casos un incremento lineal de la biomasa durante las 24 horas entre las diluciones. Por lo

tanto, debido a que la tasa de división celular (1 división por día) fue igual y constante con los tres tipos de luz, las diferencias encontradas en la producción de biomasa y en su calidad pueden ser atribuidas solamente a la cantidad de la luz y a su composición espectral.

Para los tres tipos de luz las diluciones de 50 y 60 por ciento por día permiten la estabilización de los cultivos de *Chaetoceros* sp. en el transcurso del tiempo, con una producción diaria de biomasa aproximadamente constante. La dilución de 50 % por día fue la que permitió obtener una mayor cantidad de biomasa celular en los cultivos mantenidos en exposición con los tres tipos de luz, y fue la que se seleccionó para los ensayos siguientes.

IV.2.b SATURACION DE LUZ PARA LA MAXIMA PRODUCCION DE BIOMASA

Con los cultivos expuestos a irradiancias progresivamente mayores hubo un incremento de la concentración celular en dependencia directa de la cantidad de luz disponible, hasta que se alcanzó un nivel máximo de producción a 498 y 565 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ para la luz blanca, y para los dos tipos de luz azul respectivamente.

Richardson *et al.* (1983) reportan que los valores de flujo de fotones necesarios para un buen crecimiento del fitoplancton están dentro de un intervalo de 50 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, aunque mencionan que pueden existir variaciones debidas a diferencias taxonómicas. Sin embargo, esos valores son notablemente inferiores a los encontrados en este trabajo y de todas formas son difícilmente comparables. Sensores planos ubicados contra la pared de los recipientes de cultivo, en la zona opuesta a la fuente de luz, detectaron valores de luz de más que dos órdenes de magnitud inferiores a los medidos en la pared opuesta por lo cual, en la práctica, las células de los cultivos en los experimentos de este trabajo están expuestas a una irradiancia que varía en forma continua entre los valores proporcionados en el lado del recipiente expuesto a la fuente de luz, hasta los que reciben como contribución ambiental en los casos de luz blanca y azul mezclada, siendo inferiores y cercanos a cero para el de luz azul.

Por otro lado, un ulterior aumento de la cantidad de luz arriba de los valores mencionados, no causó incrementos adicionales de la densidad celular y de hecho resultó, por lo menos con la luz blanca, en un decremento que puede ser interpretado como un fenómeno de fotoinhibición.

Con estos resultados se concluye que las condiciones de iluminación utilizadas fueron las adecuadas para obtener la máxima producción de biomasa en las condiciones de cultivo señaladas, y

que cualquier diferencia en la composición de las células producidas se debe exclusivamente a la calidad de la luz y no a la cantidad.

Es importante resaltar que, al aumentar el porcentaje de dilución diario a 75 % con las concentraciones de luz que se determinaron como necesarias para la máxima producción de biomasa, se obtuvo la estabilidad de los cultivos, contrariamente a los resultados obtenidos a bajos flujos de fotones, aunque las concentraciones celulares resultaron nuevamente inferiores. Esto confirma que la velocidad de división celular fue afectada, en el caso anterior, por la baja irradiancia disponible, que tuvo como resultado el continuo decremento de la concentración de la biomasa celular, estimada como densidad óptica.

En lo que se refiere a la calidad de la biomasa, los datos obtenidos concuerdan con la poca literatura disponible sobre esta cepa. El peso seco celular y el contenido de sustancia orgánica de los cultivos mantenidos a bajas irradiancias no difieren de mucho de los reportados por López-Elías y Voltolina (1993) y por Cordero-Esquivel *et al.* (1993). Para células obtenidas con concentraciones y tipos de luz diferentes, la única fuente de información bibliográfica es el trabajo de Correa-Reyes (1993) quien reporta, al igual que en este trabajo, un mayor peso celular para los cultivos en luz azul mezclada y que el menor se obtuvo para los mantenidos en luz azul.

Por este motivo, aunque la concentración de células fue superior en luz blanca, en términos de biomasa se obtuvo una mayor cosecha con los cultivos con luz mezclada que con luz blanca y azul.

IV.2.c CONCENTRACION DE NUTRIENTES

Se comprobó que la producción de biomasa, a pesar de ser tan elevada, no estaba limitada por la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, el contenido de nitrógeno disponible en un carboy con medio f resultó inferior al contenido de nitrógeno proteínico de la biomasa producida. A pesar de esta discrepancia, la cantidad de nitrógeno disponible no resultó limitante para el crecimiento, ya que la concentración celular y su contenido proteínico no cambiaron cuando se aumentó la concentración de nutrientes o el porcentaje de dilución. Con base en lo anterior, se puede considerar que la síntesis proteica no se vio afectada por la disponibilidad de nutrientes, probablemente presentes en concentraciones relativamente elevadas en el agua del sistema cerrado del laboratorio del C.I.C.E.S.E. Por otro lado, el aumento del porcentaje de dilución tiene como lógica consecuencia un incremento en la velocidad de división celular (en este caso, dos divisiones diarias), a valores muy cercanos al máximo medido para esta cepa en una variedad de situaciones experimentales (Trujillo-Valle, 1993).

Por este motivo, las células pueden considerarse en fase de crecimiento exponencial, cuando la síntesis proteica es máxima (Flaak y Epifanio, 1978; Fogg y Thake, 1987). La falta de cambio en el contenido proteínico con el aumento del porcentaje de dilución indica por lo tanto que, aún con la dilución inferior, los porcentajes de proteína celular obtenidos representan los valores máximos que se pueden obtener con esta microalga, por lo menos en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo.

IV.3. COMPOSICION DE *Chaetoceros* sp.

IV.3.a. PIGMENTOS

La luz es absorbida principalmente por la clorofila a, que puede ser complementada en esta función por las clorofilas b y c. En forma general se reporta que el contenido de clorofila c es siempre menor que el de la a, excepto para el grupo de los dinoflagelados (Raymont, 1980). Los datos de pigmentos para los cultivos de *Chaetoceros* sp. indican que las clorofilas a y c presentan una relación inversa con la concentración de luz, lo cual probablemente indica que tienen la misma función en la cosecha cuántica. Los valores de clorofila b y de carotenoides presentaron una tendencia contraria con respecto a los otros tipos de pigmentos; lo anterior puede ser debido a dos causas: la primera, es que estos pigmentos actúen como fotoprotectores para las altas concentraciones de luz, o bien que sirvan como transductores de la energía cosechada por las clorofilas a y c. A este punto, cabe destacar que el contenido de clorofila c fue mayor que el de la a, para los cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en exposición con luz blanca, lo cual pudiera indicar una mayor cosecha de luz con este tipo de pigmento.

Los valores del contenido de clorofilas y de carotenoides obtenidos para *Chaetoceros* sp. en el gradiente de irradiancia de los tres tipos de luz, indican que con los dos tipos de luz azul se evaluó un mayor contenido de clorofilas a y b, y bajas concentraciones de clorofila c y carotenoides con respecto a lo evaluado en luz blanca. Este patrón de respuesta, debido a la calidad de la luz, fue confirmado por varios autores (Wallen y Geen, 1971b; Czezuga *et al.*, 1981), aunque se encontraron discrepancias en el contenido de carotenoides, que en este trabajo fue menor en los dos tipos de luz azul que en luz blanca. Generalmente, una mayor producción de pigmentos y especialmente de carotenoides, parece ser un mecanismo de adaptación que ha sido desarrollado para proteger a las células de las radiaciones elevadas. Este patrón de aumento de carotenoides por efecto de la luz azul se cumple para varias microalgas, como *Euglena*, *Scenedesmus* y *Chlorella* (Rau y Schrott, 1987).

Muchos trabajos demostraron que la luz azul y azul-verde tiene influencia en la composición pigmentaria y en la fotosíntesis del fitoplancton (Emerson y Lewis, 1943; Hauschild *et al.*, 1962 a y b; Wallen y Geen, 1971 b; Jeffrey y Vesk, 1977; Vesk y Jeffrey, 1977; Langowska y Zawadzki, 1979; Antoine

et al., 1983; Holdsworth, 1985; Glover *et al.*, 1987; Heil *et al.*, 1989). De todos ellos se puede generalizar que la luz azul afecta la proporción de clorofila y carotenoides, que resultan mayores en luz azul que en luz verde o blanca, mientras que otros autores determinan que por efecto de la luz azul se produce un decremento en la síntesis de las clorofilas a y b, y de los carotenoides (Czeczuga, 1986; Rivkin, 1989; Olaizola y Duerr, 1990).

Diversos investigadores (Stemann-Nielsen, 1975; Ferris y Christian 1991; Prézelin *et al.*, 1991) han demostrado que la mayoría de las algas tienen menor cantidad de clorofila cuando se aumenta la cantidad de luz. Sin embargo, de acuerdo con Harris (1978), la disminución del contenido de clorofilas es un fenómeno complejo que también está asociado con cambios en las membranas de los cloroplastos, en los carotenoides y en los demás pigmentos accesorios. De esta breve síntesis de datos de la literatura parece evidente que las contrastantes respuestas en la síntesis de pigmentos por efecto de la densidad del flujo de fotones y de la calidad de la luz, pueden ser debidas a diferencias específicas, a variaciones sustanciales en las condiciones de experimentación y, como ya se mencionó, a diferencias fisiológicas. Aunque los datos recabados en el presente trabajo no permiten más que la formulación de hipótesis, ya que para explicarlos sería necesario conocer con exactitud la función de cada uno de los tipos de pigmentos, se puede concluir, junto con Harris (1978), que la síntesis y las concentraciones relativas de los varios pigmentos se deben a fenómenos complejos y que las importantes diferencias en la cantidad de pigmentos por unidad de biomasa, son un efecto conjunto de la irradiancia y de la calidad de la luz usada para los cultivos semicontinuos de *Chaetoceros* sp.

Con altas irradiancias el crecimiento celular es limitado más bien por la tasa de fijación del carbono, que a su vez depende del metabolismo de la célula. Así, las células expuestas al sol utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la síntesis de la RuBP carboxilasa y quizá otras enzimas de las reacciones oscuras. Como resultado, dichas células se caracterizan por tener menos clorofila por célula (a veces correlacionado con una disminución del tamaño del cloroplasto), una menor pendiente inicial (α), mayor I_K y con frecuencia un valor mayor de F_{MAX} . Las células adaptadas al sol también son menos sensibles a la fotoinhibición a altas intensidades de luz. La adaptación a la sombra o al sol típicamente requiere de uno a tres días (Darley, 1987).

Un incremento en el número y/o en el tamaño de las unidades fotosintéticas es una respuesta común en microalgas bajo condiciones limitantes de luz (Richardson *et al.*, 1983). Por lo anterior se puede explicar el alto contenido de clorofila de los cultivos mantenidos a bajos niveles de irradiancia. Las diferencias encontradas entre los cultivos mantenidos en luz blanca y azul, a bajas densidades

celulares e iguales flujos de fotones, reflejan una baja eficiencia de las clorofilas en la utilización de luz de longitud de onda corta (Jeffrey y Vesk, 1977; Vesk y Jeffrey, 1977; Humphrey, 1983). Como prueba adicional, la mayor producción en luz blanca se obtiene con valores inferiores de irradiancia ($498 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), que los determinados para luz azul ($565 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$).

IV.3.b. COMPOSICION PROXIMAL

Existe abundante literatura científica que documenta varios tipos de cambios fisiológicos (Voskresenskaya, 1972; Ferris y Christian, 1991; Falkowski y La Roche, 1991) y de composición bioquímica (Roscher y Zetsche, 1986; Wallen y Geen, 1971a; Rivkin, 1989) debidos al efecto de la calidad de la luz.

Los valores de la composición proximal de las células en los sistemas semicontinuos mantenidos a bajas concentraciones de luz blanca, corresponden en forma general a la tendencia de los datos de literatura obtenidos para esta especie.

López-Elías y Voltolina (1993) obtuvieron para la diatomea *Chaetoceros* sp., mantenida bajo condiciones similares de cultivo y con irradiancias de luz blanca de aproximadamente $180 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, la siguiente composición proximal: proteínas 36%, lípidos 14%, carbohidratos 9.5 y 18% de cenizas. Cordero-Esquivel *et al.* (1993) reportan, pero como porcentajes de peso seco orgánico, un 45% de proteínas, 37% de lípidos, 17% de carbohidratos (y 32% de cenizas), obtenidos con la misma especie bajo condiciones análogas de cultivo, y con concentraciones y tipo de luz similares. Parsons *et al.* (1961), encuentran para una especie de *Chaetoceros* no identificada, valores muy similares a los aquí reportados para proteínas (35%) pero porcentajes inferiores de lípidos y de carbohidratos (6.6 y 6.9, respectivamente).

Los resultados de esta investigación indican que, para bajas irradiancias de los dos tipos de luz azul, los valores de la composición proximal de las células no corresponden con los datos de literatura (Voskresenskaya, 1972), acerca del metabolismo del carbono, ya que no se vió incrementada significativamente la síntesis proteica.

Una importante diferencia en la composición proximal de las células de los cultivos en los dos tipos de luz azul, fueron las cantidades muy bajas de carbohidratos que se obtuvieron con los cultivos mantenidos en luz azul mezclada, resultando más evidente para altas irradiancias en este tipo de luz. Una posible explicación al hecho anterior es que el mecanismo de la PEP carboxilación (Fig. 1), funcione

más eficientemente en luz azul mezclada, lo que implicaría que la síntesis de compuestos se desvíe hacia la formación de precursores de aminoácidos y de ácidos grasos, mientras que para luz azul, con la cual se obtuvo un porcentaje relativamente alto de carbohidratos y menor por lo que se refiere a los lípidos, la síntesis de carbohidratos parece proceder normal y evidentemente a expensas de la síntesis lipídica. La única diferencia entre los dos tipos de luz azul es el contenido energético, que es ligeramente superior para luz azul pura (aproximadamente 2 Wm^{-2}). La síntesis de carbohidratos es un proceso que requiere, en presencia de luz azul, mucha energía para revertir la tendencia a las PEP-carboxilación (Kowallik, 1970; Voskresenskaya, 1972; Ruyters, 1980). La ligera diferencia energética entre los dos tipos de luz azul es aparentemente la única explicación de las importantes diferencias entre los contenidos de los compuestos de reserva de las microalgas cultivadas con esos mismos tipos de luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1994).

Con los datos obtenidos en los cultivos mantenidos a bajas concentraciones de luz, la síntesis de proteínas fue independiente de la calidad espectral de la luz y solamente para luz azul mezclada los carbohidratos fueron bajos, si bien las diferencias se midieron a favor de la síntesis de lípidos en vez de las proteínas.

Diversos autores mencionan que el crecimiento de las algas puede ser regulado por ambos factores, o por la intensidad y por la composición espectral de la luz (Morris, 1981; Prézelin, 1981; Richardson *et al.*, 1983). Este estudio demuestra que los mismos factores intervienen directamente también sobre la composición proximal de *Chaetoceros* sp.

Con poblaciones naturales y microalgas cultivadas Morris *et al.* (1974) determinan que para altas irradiancias, la tasa de fijación del carbono excede a la velocidad de incorporación de nitrógeno y que por este motivo el exceso del carbono y de energía de la fotosíntesis son almacenados como polisacáridos. Igualmente, Kanopa y Schnur (1980) determinaron que para la cianobacteria *Merismopedia tenuissima* mantenida en un gradiente cuantitativo de luz existe una relación inversa entre la razón de incorporación de polisacáridos y de proteínas y la irradiancia utilizada (de 10 a $180 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$). Esto evidentemente no es el caso para luz azul, en donde se encontró que para altas irradiancias se produce un mayor contenido proteínico.

Existen otros ejemplos en la literatura en donde el patrón de respuesta no corresponde con el esperado por efecto de la luz azul: recientemente, Rivkin (1989) consideró la influencia de la intensidad y de la composición espectral de la luz por medio de un experimento factorial, en el cual evaluó el

efecto de estas dos variables sobre la composición química, la razón de incorporación de carbono, la síntesis de polímeros y la velocidad de crecimiento para dos especies de microalgas. Sus datos demuestran que la composición espectral tiene un efecto significativo, menos sobre la velocidad de crecimiento, que no resultó afectada. En ambas especies existió una tendencia común, según la cual las proteínas y los polisacáridos fueron mayores para altas irradiancias. La síntesis de proteínas, la incorporación de carbono y la respiración fueron mayores para la luz azul que para la luz blanca de igual irradiancia.

Para intentar separar el efecto de la adaptación cromática del efecto de la intensidad lumínica en el metabolismo, Gostan *et al.* (1986) mantuvieron cultivos semicontinuos de la diatomea *Chaetoceros protuberans* Lauder. Las células fueron expuestas a dos cantidades similares de PUR (radiación usable fotosintéticamente), en luz blanca y en luz azul y se encontró un aumento en la concentración relativa de carbohidratos, conforme se incrementó la PUR para ambos tipos de luz. La eficiencia de este incremento no fue modificado por la luz azul. Además, la concentración relativa de las proteínas permaneció constante para la luz blanca, en tanto que la eficiencia neta de producción mejoró a la menor intensidad obtenida con luz azul. En este trabajo se determinó que los cambios en la calidad de luz no afectan los valores promedio de la velocidad de crecimiento, lo cual está en desacuerdo con lo reportado por Wallen y Geen (1971a), Faust *et al.* (1982), Humphrey (1983) y por Senger (1980, 1984 y 1987) y con los datos que se obtuvieron en este trabajo.

La discrepancia de los resultados obtenidos por diversos autores, de los cuales los mencionados son sólo algunos ejemplos, se vió confirmada en el presente trabajo, con los cultivos estáticos de tres especies de diatomeas (Sección IV.I.). Además, se encontró que una misma especie puede responder en forma muy diferente variando ligeramente las condiciones experimentales: en cultivos estáticos expuestos a luz azul la velocidad de crecimiento de *Chaetoceros* sp. se incrementa, lo cual corresponde a la mayoría de los datos de literatura. Sin embargo, para cultivos semicontinuos (mantenidos con igual velocidad de crecimiento), la composición proximal a bajas irradiancias de luz azul no corresponde al patrón esperado con ese tipo de luz con el cual, según Voskresenskaya (1972), la síntesis proteínica se vería acelerada independientemente de la cantidad de luz disponible. En el caso de *Chaetoceros* sp. mantenido en exposición a los mismos tres tipos de luz, pero con distinta contribución de luz ambiental, se reportan diferencias cuantitativas importantes, sin embargo, la tendencia fue similar a la descrita en este trabajo (Correa-Reyes, 1993).

Existe un considerable desacuerdo en cuanto a las diferencias en la composición proximal aún para la misma especie y durante la misma fase de crecimiento. Se ha sugerido por varios autores que estas discrepancias se deben entre otras, a las condiciones experimentales, incluyendo cantidad y calidad de la luz, estado fisiológico, variaciones específicas o clonales y que también pudieran ser causadas por la composición del medio de cultivo. Indudablemente, las variables físicas y químicas del medio ambiente tienen un papel muy importante en la determinación de la composición proximal de las células del fitoplancton (Raymont, 1980). Entre éstas, como ya se demostró en este trabajo, las variaciones en la cantidad y calidad de la luz pueden influir preponderantemente.

IV.3.c. COMPOSICION BIOQUIMICA

Diversas investigaciones acerca de la composición de aminoácidos del fitoplancton marino, indican considerables diferencias entre especies de microalgas. Los aminoácidos más abundantes son los ácidos aspártico, glutámico, glicina, alanina, lisina y arginina (Parsons *et al.*, 1961). Wallen y Geen (1971a) enlistan 18 aminoácidos y mencionan que los principales aminoácidos de la fracción proteínica son el ácido aspártico, el glutámico y la alanina. Cualitativa y cuantitativamente los resultados de estos autores son muy similares a los determinados en este trabajo.

En contraste con lo reportado por Parsons *et al.* (1961) y por Wallen y Geen (1971a), otros autores (Cowey y Corner, 1966; Chau *et al.*, 1967; Chuecas y Riley, 1969b) concluyen de sus investigaciones que el contenido de los aminoácidos estudiados en más de 20 especies de microalgas, es considerablemente similar. Estos autores por otro lado sugieren que hay diferencias entre grupos de organismos, por ejemplo, para las diatomeas se ha encontrado una mayor proporción de glicina, alanina y arginina y bajas concentraciones de ácido glutámico, aspártico y lisina. Sin embargo, en este trabajo no se encontraron bajos valores de los aminoácidos antes mencionados, ya que su contribución es cerca de un 30% del total estimado para los tres tipos de luz, resaltando que por efecto de la calidad de luz no se evaluaron marcadas diferencias en la proporción de estos contribuyentes, excepto por el valor ligeramente superior de la metionina en luz azul mezclada.

Los triglicéridos son considerados el material típico de almacenamiento de lípidos, aunque no representan la única fracción lipídica. Por estudios de laboratorio se ha determinado que para *Chaetoceros simplex*, los porcentajes de principales ácidos grasos saturados son: 13% de mirístico (14:0) y 18% de palmítico (16:0); para los insaturados se reporta un 48% de palmitoléico (16:1) y 9% de oléico (18:1) (Raymont, 1980; Seidel *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1990).

En este estudio los porcentajes de los ácidos de cadena corta (menores de 18C) no resultaron muy diferentes, en dependencia del tipo de luz. Por otro lado, se notaron diferencias de aproximadamente un orden de magnitud entre los ácidos esteárico y oléico, que resultaron más abundantes en la luz azul. De particular interés pudieran ser también, desde el punto de vista dietético, los mayores contenidos de ácidos grasos poliinsaturados con 18 átomos de carbono para luz blanca y mezclada, cuya importancia para la alimentación de varios organismos marinos ha sido subrayada por varios autores (Tacon, 1990, entre otros).

Se ha evaluado que aparte de las diferencias estimadas por grupos taxonómicos, la composición lipídica puede variar de acuerdo a la técnica y a la edad del cultivo. Chuecas y Riley (1969a) determinaron que bajo condiciones de limitación por nitrógeno se produce una mayor cantidad de ácidos palmítico y oléico, bajo condiciones de saturación por luz, y que cuando se incrementa la concentración de nitrógeno la proporción de ácidos grasos poliinsaturados aumenta.

En la literatura relacionada con el efecto de la luz existe muy poca información acerca de los perfiles de ácidos grasos. Además, las diferentes técnicas de extracción y de análisis que se utilizaron hacen difícil contrastar las tendencias encontradas en este estudio.

IV.3.d. CONSIDERACIONES PRACTICAS

El empleo de mayores irradiancias de las que normalmente se usan en los sistemas de laboratorio para la producción de microalgas, ofrece la posibilidad de obtener mayores concentraciones de biomasa con los sistemas convencionales de producción (carboy o garrafón), y ofrece la ventaja de obtener una producción comparable o mayor a las que se logran con sistemas de cultivo masivo (estanques). Además de la posibilidad de reducir considerablemente el espacio dedicado a estos cultivos, la calidad de los diferentes tipos de biomasa obtenidos por el efecto de la irradiancia y calidad de la luz utilizada, puede ser más fácilmente controlada.

El cultivo de *Chaetoceros* sp. en diferentes condiciones de iluminación resulta, desde el punto de vista nutricional en dietas con distinta calidad. Por lo anterior sería posible plantear la utilización de una sola especie de microalga cultivada en diferentes condiciones de iluminación. Al mezclarlas se podría obtener, con una sola especie de microalga, dietas mixtas con diferente valor nutritivo, lo cual además ofrece la ventaja de disminuir el número de especies cultivadas y evitaría el problema de la contaminación cruzada entre distintas especies, que a menudo sucede sobre todo en laboratorios de producción.

Otro hecho que se debe resaltar es, que las microalgas cultivadas en altas irradiancias tienen menor contenido de pigmentos; debido a que éstos son considerados compuestos relativamente complejos que podrían requerir de un mayor gasto de energía para su asimilación (Becker, 1986; Borowitzka, 1986), puede tomarse en cuenta que *Chaetoceros* sp. mantenidos en condiciones de cultivo similares a las descritas en este trabajo, ofrecería una mejor calidad dietética.

Con los resultados de esta investigación, se ha demostrado que se pueden producir microalgas con composiciones proximales notablemente diferentes, cambiando las condiciones de cultivo. La efectividad de estas dietas quedarían de todas formas por comprobar, ya que no es suficiente, como lo hacen notar Brown *et al.* (1989), considerar solo la composición en términos de contenido de proteínas o de otros componentes dietéticos particulares, para una completa evaluación del valor nutritivo de una dieta.

IV.4 BIOENSAYO DE ALIMENTACION

IV.4.a VARIACIONES EN LA COMPOSICION PROXIMAL DE *Chaetoceros* sp. POR EFECTO DEL CAMBIO DE IRRADIANCIA Y DEL TIPO DE LUZ

De acuerdo a lo mencionado por Darley (1987), la adaptación a la luz o a la sombra es un fenómeno que requiere de por lo menos uno a tres días. Por esto, al inicio del presente trabajo se planteó que un cambio de irradiancia y de tipo de luz no causaría cambios importantes en la composición proximal de las microalgas usadas para el bioensayo, que tenían que quedar en baja irradiancia de luz blanca solamente durante 24 horas. De hecho, tal hipótesis quedó comprobada ya que los cambios que se notaron en la composición de las microalgas, mantenidas durante 24 horas en irradiancias similares a las del bioensayo de alimentación, resultaron independientes del origen de los cultivos y son probablemente el resultado de procesos relacionados con la reproducción.

IV.4.b CRECIMIENTO DE *Artemia*

A partir del estadio de metanauplio se encontró una mayor longitud promedio para *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. mantenido en los dos tipos de luz azul. Para los estadios de juveniles y adulto la mayor talla se encontró para *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. expuesto a luz azul, seguido por las de la dieta de luz azul mezclada y la menor talla correspondió a los organismos alimentados con las microalgas mantenidas en luz blanca. Por otro lado, la notable diferencia entre las fechas del primer apareamiento causaron que la talla de los organismos alimentados con la dieta cultivada en luz mezclada fueran las menores.

En relación al tiempo necesario para alcanzar los diferentes estadios de vida, se encontró que el alimento producido en los tipos de luz azul reduce la duración de algunos estadios.

Correa-Reyes (1993), quien utilizó la misma especie de microalga cultivada bajo condiciones similares de luz, encontró longitudes mayores para *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. mantenido en luz blanca y valores significativamente menores para los dos tipos de luz azul. Por otro lado, este autor utilizó una mayor contribución de luz ambiental, que causó que las microalgas utilizadas como alimento tuvieron una respuesta similar a la descrita en este trabajo desde el punto de vista cualitativo, pero cuantitativamente diferente respecto a las concentraciones relativas de carbohidratos y de lípidos. Esta diferencia en la composición proximal de las dietas es probablemente el motivo de respuesta diferencial en el crecimiento de *Artemia*.

Los valores de longitud promedio, así como el tiempo necesario para alcanzar los diferentes estadios de vida corresponden al rango de valores reportados en nuestro laboratorio para esta especie, ya que otros autores (Paniagua-Chávez, 1993; Arriaga-Haro, 1993) al cultivar *Artemia franciscana* con microalgas producidas a bajas concentraciones de luz blanca, determinan valores similares de longitud total, en el tiempo necesario para alcanzar las distintas etapas de vida y en la sobrevivencia. Por otro lado, otros autores (Sick, 1976; Correa-Sandoval, 1991), evalúan para *Artemia* tallas mayores a las estimadas en este trabajo con la dieta producida en luz blanca, pero con tiempos muy largos para alcanzar el estadio de adultos (16 y 31 días respectivamente).

El crecimiento más rápido, la mayor sobrevivencia, el menor tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual y los resultados de longitud promedio obtenidos para *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivada en los dos tipos de luz azul, resultan interesantes desde el punto de vista de un sistema de producción, ya que se plantea la posibilidad de obtener organismos con una mayor talla en un menor tiempo. Todas estas diferencias son el resultado de la diferente calidad de las microalgas suministradas como alimento, aunque resulta imposible atribuirlos a factores específicos (tipo y cantidad de compuestos) que, como se ha mencionado, difieren ampliamente entre dietas con la excepción del mayor contenido de proteínas de las dietas cultivadas con luz azul, que es probablemente el factor directamente responsable de la mayor velocidad de crecimiento al utilizar estas dietas.

IV.4.c COMPOSICION PROXIMAL, PERFILES DE AMINOACIDOS Y ACIDOS GRASOS DE *Artemia*

Todavía no se han definido los requerimientos nutritivos de *Artemia*, pero se ha observado que las especies de microalgas que tienen un mayor contenido proteínico resultan en un mejor crecimiento, aunque en otras investigaciones se menciona que el contenido y el tipo de carbohidratos son tan importantes como los requerimientos mínimos de proteínas (Sick, 1976; Claus *et al.*, 1979; Sorgeloos, 1980; Sorgeloos *et al.*, 1980; Sorgeloos, 1985; Bengtson *et al.*, 1991).

Las diferencias evaluadas en la calidad de las microalgas cultivadas en los tres tipos de luz, produjeron cambios sustanciales en la velocidad de crecimiento de *Artemia franciscana*, en el tiempo necesario para alcanzar las distintas etapas de vida y en la sobrevivencia de los organismos, resultando más eficientes las dietas de microalgas producidas en los dos tipos de luz azul. Esto coincide con los resultados obtenidos en relación a la composición proximal de *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. cultivado con los tres tipos de luz, porque el peso seco y el contenido relativo de proteínas, lípidos y carbohidratos fue mayor para los organismos alimentados con las microalgas producidas en los dos tipos de luz azul, y confirma la importancia dietética de las proteínas para *Artemia*.

Los valores de la composición proximal de *Artemia franciscana* obtenida en el laboratorio de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. por otros autores, en varios casos con la misma especie de microalga pero bajo diferentes condiciones de cultivo, tienen porcentajes inferiores de los constituyentes (Paniagua-Chávez, 1993; Arriaga-Haro, 1993; Correa-Reyes, 1993). Variaciones de este tipo pueden atribuirse a diferencias en la calidad del alimento, o a diferentes exigencias de distintas especies, razas geográficas, o hasta diferentes estadios de vida de la misma especie. Por otro lado, las técnicas utilizadas pudieron proporcionar información contrastante sobre la calidad del alimento o de la biomasa producida.

Con relación a la composición de aminoácidos, se evaluaron valores altos para histidina, arginina, ácido glutámico, prolina y leucina, mientras que la más baja concentración fue estimada para la metionina, lo cual coincide con los datos de Gallagher y Brown (1975); Gallagher y Mann (1982) y Tacon (1990) quienes mencionan bajos valores de metionina para *Artemia*. Esta coincidencia para éstos y los demás aminoácidos, confirma que el perfil general de estos compuestos no es determinado extrínsecamente y que éstas características no pueden ser modificadas, a largo plazo, únicamente mediante el uso de dietas diferentes (Kanasawa *et al.*, 1979; Sakamoto *et al.*, 1982; Bengtson *et al.*, 1991; Sargent *et al.*, 1993).

El contenido y el perfil de ácidos grasos de *Artemias* ha sido ampliamente estudiado, a partir de las observaciones realizadas por Watanabe *et al.* (1983), quienes demostraron que los ácidos grasos esenciales en *Artemia* son especialmente variables. Se menciona que la composición está determinada por las condiciones del medio ambiente y no por las características genéticas. De hecho, diversos autores como por ejemplo Millamena *et al.* (1985) y Lavens *et al.* (1989 citado por Bengtson *et al.*, 1991), han demostrado que los perfiles de ácidos grasos de adultos de *Artemia* y también de los quistes que producen, reflejan fuertemente el perfil de ácidos grasos de la dieta con la que ellos se alimentaron. Por otro lado también se ha demostrado que, en dependencia de los requerimientos dietéticos, este organismo puede elongar y desaturar diferentes ácidos grasos (Tacon, 1990; Abelin, 1992; Navarro y Amat, 1992). En este trabajo, no existió una correspondencia entre los valores de la composición de ácidos grasos de *Chaetoceros* sp. y la de *Artemia*. Esto coincide con lo mencionado por el segundo grupo de autores ya citado, y parece demostrar que, por lo menos a largo plazo, la capacidad de bioconversión de *Artemia* no permite modificar sustancialmente su composición bioquímica.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que las diferencias en las dietas no se reflejan en la composición final de *Artemia* y que su efecto solamente se puede apreciar utilizando los parámetros de crecimiento que se usaron como un primer elemento de evaluación en este trabajo.

V. CONCLUSIONES

En condiciones de suficiencia de luz se pudo confirmar que distintas especies de microalgas pueden tener diferentes tipos de respuesta a la exposición a la luz azul, en consecuencia el patrón de respuesta que en general consiste en un aumento en la velocidad de división celular, no se encuentra en todas las microalgas ni aún, como en el caso de *Skeletonema* y *Thalassiosira*, en especies que pertenecen a la misma familia (Thalassiosiraceae).

En el caso de la especie que tuvo este tipo de patrón en la velocidad de crecimiento, se obtuvo un mayor contenido de proteínas en las microalgas mantenidas en la luz azul, pero en la baja concentración de luz no se notaron diferencias debidas a la calidad de la luz.

Uno de los efectos más interesantes que se obtuvieron con los dos tipos de luz azul es la gran diferencia en la cantidad de los compuestos de carbono no nitrogenados, aunque la única semejanza entre estos dos, aparte de la mínima contribución de los rayos de longitud de onda superior a 600 nm, que prácticamente no se pudo detectar con los instrumentos de medición a disposición, es la pequeña diferencia en el contenido energético. Esta es aparentemente la única explicación para entender la desviación del carbono asimilado hacia la glicogénesis en luz azul pura y a la lipogénesis en presencia de luz azul mezclada.

La calidad de la biomasa producida en condiciones de máxima producción resultó notablemente diferente en los tres casos, lo que permite cultivar una sola especie de microalga y producir dietas diferentes, sencillamente modificando las condiciones de calidad y cantidad de luz. Los resultados de éste y de un trabajo análogo resaltan la importancia que tiene definir bien las condiciones experimentales de iluminación, ya que pequeñas variaciones pueden resultar en un tamaño de respuesta cuantitativamente diferente.

La literatura indica que el contenido de proteínas de la dieta es un factor importante en la alimentación de *Artemia*. Los datos obtenidos en esta investigación confirman este punto y demuestra además que la composición bioquímica fina (perfil de aminoácidos y de ácidos grasos) no es influida, a largo plazo, por la composición de la dieta, sobre todo en el caso de los ácidos grasos. Esto comprueba también la elevada capacidad de biotransformación de estos compuestos por parte de *Artemia*, para la cual no se han descrito exigencias específicas de los ácidos grasos que son esenciales para la mayoría de los organismos.

V. LITERATURA CITADA

- Abelin, P. 1992. Development and evaluation of unconventional forms of *Artemia* sp. as a food source for Penaeid shrimp. Universiteit Gent, Belgie. Doctoral Thesis. 189 pp.
- Antoine, S.E. y K. Benson Evans. 1983. The effect of light intensity and quality on the growth of benthic algae. II. Populations dynamics. Arch. Hidrobiol. 99(3):118-128.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1970 a. Protein analysis: Microkjeldahl method 42-014. Washington.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1970 b. Lipids: Ether extract method 7-048. Washington.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1970 c. Ash content: Muffle method 7-010. Washington.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1970 d. Water content analysis method 7-003. Washington.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1970 e. Official Methods of Analysis. Crude fiber: Neutral detergent method. Washington.
- Aparicio, P.J., J.M. Roldán y F. Calero. 1976. Blue light photoreactivation of nitrate reductase from green algae and higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70(4):1071-1077.
- Arriaga-Haro, V.M. 1993. Evaluación de dos dietas frescas y una preservada para *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Tesis de Maestría. 53 p.
- Azuara, M.P. y P.J. Aparicio. 1983. In vivo blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. Plant Physiol. 71:286-290.
- Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. McLarney. 1986. Acuicultura: Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce. AGT Editor, México. 741 pp.
- Becker, C.W. 1986. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. 339-419. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Bengtson, D.A., P. Léger y P. Sorgeloos. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. 256-280. En: Browne, R.A., P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman. (ed.). *Artemia* Biology. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor. Boston. 374 pp.
- Birmingham, B.C. 1979. The effect of light quality on the growth, photosynthesis, extracellular release and photorespiration of four freshwater algae. The University of Windsor, Ontario, Canada. Doctoral Thesis. 279 pp.

- Bligh, 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. 1986. Micro-algae as sources of fine chemicals. *Microbiol. Sci.* 3:372-375.
- Brand, L.E. y R.L.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.
- Brown, T.J. y G.H. Geen. 1974. The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. *J. Phycol.* 10:213-220.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey y C.D. Garland. 1989. Nutritional Aspects of Microalgae used in Mariculture; a Literature Review. CSIRO Marine Laboratories 205. 44pp.
- Castro, T. y C. Gallardo. 1980. *Artemia* sp. en investigación y docencia. Cuadernos CBS 2. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México. 42 pp.
- Chau, Y.K., L. Chuecas y J.P. Riley. 1967. The component combined amino acids of some marine phytoplankton species. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 47:543-554.
- 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.
- Chuecas, L. y J.P. Riley. 1969 a. Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 49:97-116.
- Chuecas, L. y J.P. Riley. 1969 b. The component combined amino acids of some marine diatoms. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 49:117-120.
- Claus, C., F. Benijts y G. Vandeputte. 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.
- Cordero-Esquivel, B., D. Voltolina y F. Correa-Sandoval. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B:369-373.
- Correa-Reyes, J.G. 1993. Alimentación de *Artemia franciscana* con microalgas cultivadas bajo diferentes tipos de luz. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. México. Tesis de Licenciatura. 56 pp.
- Correa-Sandoval, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de *Artemia franciscana* Kellogg. 1906. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Tesis de Doctorado. 154 pp.
- Cowey, C.B. y E.D.S. Corner. 1966. The amino acid composition of certain unicellular algae and of the faecal pellets produced by *Calanus finmarchicus* when feeding on them. 225-231. En: Barnes, H. (ed.). Some Contemporary Studies in Marine Science, Allen & Unwin, London. 340 pp.
-

- Czeczuga, B. 1986. The effect of light on the content of photosynthetically active pigments in species of the genus *Chara*. *Aquat. Bot.* 24:397-401.
- Czeczuga, B., I. Lengiewicz y A. Golecka Rybaczek. 1981. Effect of blue-green light on the total chlorophyll and carotenoid content in Chlorophyta. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* 28:451-457.
- Darley, W.M. 1987. *Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico*. Cap. 2:29-80. Ed. Limusa. 236 pp.
- Dring, M.J. 1982. *The Biology of Marine Plants*. 13-42. Ed. Edward Arnold. 199 pp.
- Dring, M.J. 1986. Pigment composition and photosynthetic action spectra of sporophytes of *Laminaria* (Phaeophyta) grown in different light qualities and irradiances. *Brit. Phycol. J.* 21:199-207.
- Dring, M.J. 1987. Marine plants and blue light. 121-140. En: Senger, H. (ed.) *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 159 pp.
- Droop, M.R. 1975. The chemostat in mariculture. 71-93. En: Persoone, G. y E. Jaspers (ed.). *Proc. 10 th. Europ. Symp. Mar. Biol. Ostend, Belgium*.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28:350-356.
- Duke, C.S., B.E. Lapointe y J. Ramus. 1986. Effects of light on growth, RuBPCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta). *J. Phycol.* 22:362-370.
- Emerson, R. y C.M. Lewis. 1943. The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wavelength of light. *Am. J. Bot.* 30(3):165-178.
- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae diets fed to the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 18:1-12.
- Falkowski, P.G. y J. La Roche. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27:8-14.
- Falkowski, P.G. y T.G. Owens. 1980. Light-shade adaptation. *Plant Physiol.* 66:592-595.
- Färber-Lorda, J. 1986. *Études biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique Euphasia superba et Thysanoessa macrura* recolté au cours de la Campagne Fibex. Université de Aix-Marseille II. These de Doctorat. 214 pp.
- Faust, M.A., J.C. Sager y B.W. Meeson. 1982. Response of *Prorocentrum mariae-lebouriae* (Dinophyceae) to light of different spectral qualities and irradiances: growth and pigmentation. *J. Phycol.* 18:349-356.
- Ferris, J.M. y R. Christian. 1991. Aquatic primary production in relation to microalgal responses to changing light: A review. *Aquatic Sciences.* 53(43):189-213.
-

- 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.
- Gallagher, S.M. y W.D. Brown. 1975. Composition of San Francisco Bay brine shrimp (*Artemia salina*). *J. Agric. Food Chem.* 23:630-632.
- Gallagher, S.M. y R. Mann. 1982. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter *Thalassiosira pseudonana* (3H) on its food value to the bivalve *Tapes japonica*. *Aquaculture* 26:95-105.
- Glover, H.E., M.D. Keller y R.R.L. Guillard. 1987. Light quality and oceanic ultraphytoplankters. *Nature (Lond.)* 319:342-343.
- Gostan, J., C. Lechuga-Deveze y L. Lazzara. 1986. Does blue light affect the growth of *Chaetoceros protuberans* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 22:63-71.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confereacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Harris, G.P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 10:1-171.
- Hauschild, Ch.A., McMurter, H.J.G y F.R. Pick. 1991. Effect of spectral quality on growth and pigmentation of pico cyanobacteria. *J. Phicol.* 27:698-702.
- Hauschild, A.H.W., C.D. Nelson y G. Krotkov. 1962 a. The effect of light quality on the products of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* Can. *J. Bot.* 40:179-189.
- Hauschild, A.H.W., C.D. Nelson y G. Krotkov. 1962 b. The effect of light quality on the products of photosynthesis in green and blue-green algae, and in photosynthetic bacteria. *Can. J. Bot.* 40:1619-1631.
- Heil, W.G., D. Dörnemann y H. Senger. 1989. Effect of light quality on the in vivo thylakoid protein phosphorylation in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Photochem. Photobiol.* 49(2):205-207.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. 255-273. En: J.R. Stein (ed.). *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press. New York. 448 pp.
- Holdsworth, E.S. 1985. Effects of growth factors and light quality on the growth, pigmentation and photosynthesis of the two diatoms, *Thalassiosira gravida* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.* 86:253-262.
- Humphrey, G.F. 1983. The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments, and photosynthetic rate of unicellular marine algae. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 66:49-67.
-

- Jeffrey, S.W. y M. Vesik. 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in the marine diatom *Stephanopyxis turris*. J. Phycol. 13:271-279.
- Kamiya, A. y W. Kowallik. 1991. Influences of blue light on uptake and consumption of amino acids in a colorless mutant of *Chlorella*. Plant Physiol. 138:279-284.
- Kamiya, A. y S. Miyachi. 1975. Blue light-induced formation of phosphoenolpyruvate carboxylase in colorless *Chlorella* mutant cells. Plant Cell. Physiol. 16:729-736.
- Kanazawa, A., S.I. Teshima y K. Ono. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acid. Comp. Biochem. Physiol. 63B:295-298.
- Kanopka, A. y M. Schnur. 1980. Effect of light intensity on macromolecular synthesis in cyanobacteria. Microb. Ecol. 6:291-301.
- Ketchum, B.H. y A.C. Redfield. 1938. A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. Biol. Bull. 75:165-169.
- Kirk, J.T.O. 1983. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge. 401 pp.
- Kowallik, W. 1970. Light effects on carbohydrate and protein metabolism in algae. 165-181. En: Halldal, P. (ed.). Photobiology of Microorganisms. Wiley-Interscience, London and New York. 479 pp.
- Kowallik, W. 1987. Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism. 8-16. En: Senger, H. (ed.). Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plant and Microorganisms. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 169 pp.
- Kulandaivelu, G. G. Sorojini. 1980. Blue light induced enhancement in activity of certain enzymes in heterotrophically grown cultures of *Scenedesmus obliquus*. 372-380. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Langowska, I. y Z. Zawadzki. 1979. Effects of the kind of illumination on growth of *Scenedesmus obliquus* (Sc. 449). Pol. Arch. Hydrobiol. 26(3):257-266.
- Lavens, P., P. Léger y P. Sorgeloos. 1989. Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring using a controlled production unit. En: De Pauw, N., E. Jaspers, H. Ackefors y N. Wilkins (ed.). Aquaculture-A Biotechnology in Progress. European Aquaculture Society. Bredene, Belgium. 731-742.
- Léger, P., D.A. Bengtson, K.L. Simpson y P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev. 24:521-623.
- Lips, S.H. y Y.J. Avissar. 1986. Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. 43-67. En: Richmond, A.R. (ed.). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 528 pp.
- López-Eliás, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. Ciencias marinas. 19(2):169-180.
-

- López-Figueroa, F. 1991. Red, green and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a, biliprotein and total protein synthesis in the red alga *Chondrus crispus*. Br. Phycol. J. 26:383-393.
- López-Figueroa, F. y W. Rüdinger. 1991. Stimulation of nitrate net uptake and reduction by red and blue light and reversion by far-red light in the green alga *Ulva rigida*. J. Phycol. 27:389-394.
- 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.
- Lüning, K. 1981. Light. En: Lobban, C.S. y M.J. Wynne (ed.). The Biology of Seaweeds. Botanical Monographs Oxford, Blackwell Sci. Publ. 17:326-330.
- Malara, G. y R. Charra. 1972 a. Dosage des protéines particulières 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. 1972 b. Dosage des glucides particulières de phytoplancton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Margalef, R. 1967. Luz y temperatura. 100-129. En: Ginés, H. y R. Margalef (ed.). Ecología Marina. Ed. Ibero-Americana, Caracas, Venezuela. 711 pp.
- Millamena, O., R.F. Bombo, N.A. Jumalon y K.L. Simpson. 1985. The effect of various diets on the nutritional value of *Artemia* as feed for *Penaeus monodon* larvae. Book of Abstracts, 16 th Annual Meeting World Mariculture Society, Orlando, Fl. 21-27.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes. Hermann et Cie, Paris. 210 p.
- Morris, I. 1981. Photosynthetic products, physiological state, and phytoplankton growth. 83-102. En: Platt, T. (ed.). Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Aq. Sci. Bulletin 210:346 pp.
- Morris, I., H.E. Glover y C.S. Yentsch. 1974. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: the effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. Mar. Biol. 27:1-9.
- Navarro, J.C. y F. Amat. 1992. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp *Artemia* sp. cysts. Aquaculture 101:223-227.
- Ogasawara, N. S. Miyachi. 1970. Regulation of CO₂-fixation in *Chlorella* by light of varied wavelengths and intensities. Plant Cell. Physiol. 11:1-14.
- Ojala, A. 1993. The influence of light quality on growth and phycobiliprotein/chlorophyll a fluorescence quotient of some species of freshwater algae in culture. Phycologia. 32(1):22-28.
- Olaizola, M. y E.O. Duerr. 1990. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol. 2:97-104.
-

- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkatasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.* 6:415-423.
- Paniagua-Chávez, C.G. 1993. Viabilidad, composición proximal y valor alimenticio de *Dunaniella* sp. preservada por congelamiento. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Tesis de Maestría. 74 p.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 101-113.
- 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.
- Pirson, A. y W. Kowallik. 1960. Wirkung des blauen und roten Spektralberiches auf die Zusammensetzung von *Chlorella* bei Anzucht im Licht-Dunkel-Wetchsel. *Naturwissenschaften* 47:476-479.
- Pirson, A. y W. Kowallik. 1964. Spectral responses to light by unicellular plants. *Photochem. Photobiol.* 3:489-497.
- Platt, T., C.L. Gallegos y W.G. Harrison. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38:687-701.
- Prézelin, B.B. 1981. Light reactions in photosynthesis. 1-53. En: Platt, T. (ed.). *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. *Can. Bull. Fish. Aquatic Sci.* 210. 346 pp.
- Prézelin, B.B., M.M. Tilzer, O. Schofield y C. Haese. 1991. The control of the production process of phytoplankton by the physical structure of the aquatic environment. *Aquatic Science* 53:85-96.
- Rau, W. y E.L. Schrott. 1987. Blue light control of pigment biosynthesis. 43-63. En: Senger, H. (ed.) *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plant and Microorganisms*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 169 pp.
- Raven, J.A. 1974. Photosynthetic electron flow and photophosphorylation. 391-413. En: Stewart, W.D.P. (ed.). *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs. Vol. 10. Univ. of Calif. Press, Berkeley and Los Angeles. 989 pp.
- Raven, J.A. y J. Beardall. 1981. Respiration and photorespiration. 55-82. En: Platt, T. (ed.) *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. *Can. Bull. of Fish. and Aq. Sc. Bulletin* 210. 346 pp.
- Raymont, J.E.G. 1980. *Plankton and Productivity in the Ocean*. Cap. 4:191-202. Pergamon Press, Oxford and New York. 489 pp.
- Richardson, K., J. Beardall y J.A. Raven. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157-191.
- Rivkin, R.B. 1989. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55:291-304.
-

- Rodríguez-Marín, 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.
- Roscher, E. y K. Zetsche. 1986. The effects of light quality and intensity on the synthesis of ribulose-1, 5-biphosphate carboxilase and its mRNAs in the green alga *Chlorogonium elongatum*. *Planta* 167:582-586.
- Ruyters, G. 1980. Blue light-effects on enzymes of the carbohydrate metabolism in *Chlorella*. I. Pyruvate kinase. 361-367. En: Senger, H. (ed.). *The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Ruyters, G. 1984. Effects of blue light on enzymes. 283-301. En: Senger, H. (ed.). *Blue Light Effects in Biological Systems*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 538 pp.
- Ruyters, G. 1987. Control of enzyme capacity and enzyme activity. 71-88. En: Senger, H. (ed.). *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 160 pp.
- Sakamoto, M., D.L. Holland y D.A. Jones. 1982. Modification of the nutritional composition of *Artemia* by incorporation of polyunsaturated fatty acids using micro-encapsulated diets. *Aquaculture* 28:311-320.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B:39-44.
- San Francisco Bay Brand, Inc. 1988. Tips on cyst decapsulation and commercial cyst usage. 4 pp.
- Sargent, J.R., J.G. Bell, M.V. Bell, R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. 103-124. En: Lahlou, B. y P. Vitiello (ed.). *Coastal and Estuarine Studies*. 43. *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. American Geophysical Union, Washington. 316 pp.
- Schopfer, P. 1977. Phytochrome control of enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:223-252.
- Seidel, C.R., J. Kryznowek y K.L. Simpson. 1980. International Study on *Artemia*. XI. Amino acid composition and electrophoretic protein patterns of *Artemia* from five geographical locations. En: Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (ed.) *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Universa Press. Wetteren, Belgium. 375-379.
- Senger, H. 1980. *The Blue Light Syndrome*. Preface III. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York. 665 pp.
- Senger, H. 1984. *Blue Light Effects in Biological Systems*. Springer-Verlag, Berlin. 538 pp.
- Senger, H. 1987. *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Vol. I:160 pp. y Vol. II:169 pp.
- Sick, L.V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *Mar. Biol.* 35:69-78.
-

- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1962. *Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology*. The Iowa State University Press. Ames. 394-412.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometria: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia*. in aquaculture. 25-46. En: Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roel y E. Jaspers. *The Brine Shrimp Artemia* Vol. 3. Ecology Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 pp
- Sorgeloos, P. 1985. Potentials of converting microalgae into brine shrimp *Artemia*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 20:147-149.
- Sorgeloos, P., M. Baeza Meza, E. Bossuyt, E. Bruggeman, J. Dobbeleir, D. Versichele, E. Laviña y A. Bernardino. 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: The conversion of a waste product into highly nutritive animal protein. *Aquaculture* 21:393-396.
- Sorgeloos, P. y G. Persoone. 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceas. II Hatching and culturing of the brine shrimp *Artemia salina* L. *Aquaculture*, 6:303-317.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J. (ed.). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth measurement*. Crambridge University Press, New York. 448 pp.
- Steemann-Nielsen, E. 1975. *Marine Photosynthesis. With Special Emphasis on the Ecological Aspects*. Elsevier Scientific Publishing Company. 141 pp.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parson. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bulletin 167. Fish. Res. Board of Canada, Ottawa. 310 pp.
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. 182-210. En: Platt, T. (ed.). *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. *Can. Bull. Fish. Aquatic Sci.*, 210. 346 pp.
- Tackaert, W., P. Vanhaecke y P. Sorgeloos. 1987. Preliminary data on the heritability of some quantitative characteristics in *Artemia*. 241-248. En: Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Decler y E. Jaspers (ed.). *Artemia Research and Its Applications*. Vol. 1. Morfology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium. 380 pp.
- Tacon, A. 1990. *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*. Argent Laboratories Press, Redmont, Washington. 208 pp.
- Thompson, P.A., P.J. Harrison y J.N.C. Whyte. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26:278-288.
- Trujillo-Valle, M.L. 1993. *La Colección de Microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas. Serie Acuicultura CIACT9301*. CICESE. 103 p.
- Turpin, D.H. 1991. Effects on inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27:14-20.

- Vanhaecke, P. y P. Sorgeloos. 1983. International study on *Artemia*. Bio-economical evaluation of the nutritional value for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae on nine *Artemia* strains. *Aquaculture* 32:285-293.
- Venkataraman L.V. 1986. Blue-green algae as biofertilizer. 455-471. En: Richmond, A. (ed.) *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Vesk, M. y S.W. Jeffrey. 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. *J. Phycol.* 13:280-288.
- Voskresenskaya, N.P. 1952 Influence of the spectral distribution on the products of photosynthesis. *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.* 86:429-435.
- Voskresenskaya, N.P. 1953. The significance of the spectral composition of light in photosynthetic formation of substances. *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.* 93:911-914.
- Voskresenskaya, N.P. 1972. Blue-light and carbon metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:219-234.
- Wallen, D.G. y G.H. Geen. 1971 a. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* 10:34-43.
- Wallen, D.G. y G.H. Geen. 1971 b. Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* 10:44-51.
- Wallen, D.G. y G.H. Geen. 1971 c. The nature of the photosynthate in natural phytoplankton populations in relation to light quality. *Mar. Biol.* 10:157-168.
- Walsh, D.T., Ch.A. Wisthlandley, R.A. Kraus y E.J. Petrovits. 1987. Mass culture of selected marine microalgae for the nursery production of bivalve seed. *J. Shellfish Res.* 6(2):71-77.
- Watanabe, T., F. Oowa, Ch. Kitajima y S. Fujita. 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina* as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44(10):1115-1121.
- Watanabe, T., T. Tamiya, A. Oka, M. Hirata, C. Kitajima, S. Fujita. 1983. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on (n-3) highly unsaturated fatty acid and fat-soluble vitamins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49:471-479.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60:231-241.
- Widell, S. y Ch. Larsson. 1984. Blue light effects and the role of membranes. 177-184. En: Senger, H. (ed.). *Blue Light Effects in Biological Systems*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 538 pp.
- Yentsch, C.S. 1980. Light attenuation and phytoplankton photosynthesis. 95-127. En: Morris, I. (ed.). *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Univ. of Calif. Press. Berkeley and Los Angeles. 625 pp.
-