

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**USO DE UN FOTOBIORREACTOR PARA LA
PRODUCCION MASIVA DE MICROALGAS
PARA LA ACUICULTURA.**

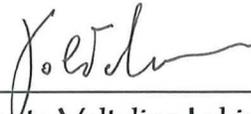
**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

LUZ MARIA TORRES RODRIGUEZ

Ensenada, B. C., Mexico. Abril de 1997.

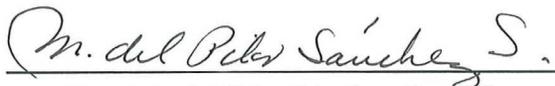
TESIS DEFENDIDA POR
LUZ MARÍA TORRES RODRÍGUEZ

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE



Dr. Domenico Fausto Voltolina Lobina

Director del Comité



Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Miembro del Comité



Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Miembro del Comité



M.C. Luis Gustavo Alvarez Sánchez

Miembro del Comité



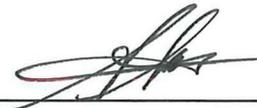
M.C. José Antonio López Elías

Miembro del Comité



Dr. Gilberto Caxiola Castro

Jefe del Departamento de Ecología



M.C. Alberto Amador Buenrostro

*Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado*

25 de abril de 1997



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

**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

**USO DE UN FOTOBIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE
MICROALGAS PARA LA ACUICULTURA.**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesario para
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS.**

Presenta:

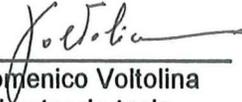
LUZ MARÍA TORRES RODRÍGUEZ

Ensenada, Baja California, México, Abril de 1997.

RESUMEN de la tesis de Luz María Torres Rodríguez presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOLOGÍA con opción en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Abril de 1997.

**USO DE UN FOTOBIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE MICROALGAS
PARA LA ACUICULTURA**

Resumen aprobado por:


Dr. Domenico Voltolina
Director de tesis

Se mantuvieron cultivos estáticos al exterior de la diatomea *Chaetoceros muelleri*, en sistemas tradicionales de columnas abiertas de fibra de vidrio (300 l) y en columnas con un fotobiorreactor acoplado, con la finalidad de evaluar y comparar la concentración celular y el peso seco orgánico (P.S.O) producidos en ambos sistemas, durante las estaciones de invierno, primavera y verano.

Las mayores concentraciones celulares y de P.S.O, se obtuvieron en la primavera, seguidas por las de verano e invierno. Para las dos últimas estaciones, la producción fue probablemente limitada por los valores extremos de la temperatura, más que por las cantidad de irradiancia y por el fotoperíodo de éstas estaciones. Los mayores porcentajes de ceniza, se obtuvieron en el invierno, seguido por los de primavera y verano y en todos los casos los porcentajes fueron mayores a los reportados por la literatura.

La concentración celular en el sistema con fotobiorreactor fue significativamente mayor a la del sistema tradicional al termino del período de luz del tercer día de cultivo, durante el invierno y la primavera, mientras que en verano, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en esta temporada el valor de P.S.O, fue significativamente mayor al del sistema tradicional al final del período de luz del tercer día de cultivo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre el P.S.O. de ambos sistemas en el invierno y la primavera. El porcentaje de cenizas varió de manera irregular en ambos sistemas, pero los mayores porcentajes se presentaron en el sistema tradicional.

Las producciones de biomasa normalizadas y expresadas como número de células producidas por sistema, por unidad de irradiancia (mol) y de tiempo (hora), fueron mayores en el sistema con fotobiorreactor que en el sistema tradicional, lo cual se debe a la mayor área de exposición a la luz en el fotobiorreactor que disminuye el efecto del autosombreado, por lo cual este sistema puede considerarse más productivo que el sistema tradicional, debido a que en un menor tiempo alcanza una máxima producción celular y de biomasa.

ABSTRACT of the Thesis of LUZ MARÍA TORRES RODRÍGUEZ, submitted as a partial requirement to obtain her MASTER IN SCIENCES degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. April 1997.

MICROALGAE MASS PRODUCTION FOR AQUACULTURE WITH A PHOTOBIOREACTOR

The cell and organic biomass production achieved in three 300 l outdoors batch cultures of the diatom *Chaetoceros muelleri*, grown in transparent fiberglass columns during winter, spring and summer of 1996 in Bahía Kino, Sonora, Mexico, were compared to those obtained in an equal number of similar containers equipped with a photobioreactor consisting of an external 15 m spiral of Tygon tubing, through which the cultures were continuously circulated during daytime.

The highest cell and organic weight productions were in spring with both systems, followed by those of summer, and the lowest were in winter, probably as a result of the extreme temperatures of the region, rather than for differences in irradiance and photoperiod. Ash cell contents were highest in winter and in all cases higher than those reported in the literature for this and for similar species.

During winter and spring, cell production after three light periods was higher with the photobioreactor, and there were no differences in the cell concentrations obtained in summer with the two systems. However, the use of the photobioreactor caused an increase in organic biomass production in summer, but there were no differences in the other seasons. This indicates variation in cell sizes and / or in ash contents, which were constantly lower with the photobioreactor.

The numbers of cells produced in a culture container for a given available irradiance and time unit ($\text{cell mol}^{-1} \text{hr}^{-1}$) were lower in the traditional system, showing that the frequency of exposure and the time of permanence in the external tubing were sufficient to reduce the self-shading effect common to the traditional culture systems for mariculture.

DEDICATORIA

A mis abuelos Rubén y Víctor con quienes disfruté inolvidables momentos de mi niñez y juventud.

A mi padre por enseñarme que el tiempo que se invierte en sembrar y cultivar un árbol, no es tiempo perdido.

A mi madre por enseñarme a ser fuerte cuando se esta lejos de quien se quiere.

A mis padres quienes me han dado la libertad de volar hacia los cielos que yo elegí.

A mis hermanos Ivone y Hasan por el fuerte vinculo de amor y amistad que nos une aun en la distancia.

A mi familia por que aun cuando lejos, me dieron la fuerza y ánimo de seguir adelante, sobre todo en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Domenico Voltolina, a quien doy las gracias por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por el apoyo que siempre recibí de su parte y por enseñarme con su ejemplo lo que es un verdadero investigador y maestro.

A mis sinodales Dra. Ma. del Pilar Sánchez, Dra. Beatriz Cordero, M.C. Luis Gustavo Alvarez y M.C. José Antonio Lopez Elías, por todas sus observaciones y sugerencias en este trabajo. Por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de esta faena y sobre todo por enseñarme como se quiere y respeta a un amigo y maestro, como es el Dr. Domenico Voltolina.

A Pily por ser la brillante luz con quien siempre conté en el transcurso de una gran parte de este trabajo, pero sobre todo por que ella ha sido maestra, compañera y "Amiga".

A Bety por sus sugerencias, apoyo y compañerismo, pero sobre todo su tiempo y paciencia para escucharme cuando se lo pedí.

A mis amigas Edna, Evelia, Fabiola, Sandra, Ma. Alcira y Aurora, a quienes les agradezco su apoyo y consejo en los momentos en que los necesite, pero sobre todo por los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A mis amigos y compañeros que conocí en Ensenada, con los que he compartido buenos y malos momentos, especialmente a la congregación "paceña".

A mis amigos y compañeros del departamento de acuicultura, Lya, Edna, Mony, Lulú, Kenia, Rebeca, Gaby, Lety, Gabriel, Miguel Angel, Jaime, Sergio y Saúl, con quienes conviví momentos de trabajo y descanso y quienes hicieron de mi estancia en el departamento una agradable experiencia.

A mis maestros y compañeros de generación, sobre todo con los que más conviví.

A Ma. Elena, Karla, Rosy, Norberto, Francisco, don Miguel y don Guillermo, que siempre fueron agradables compañeros de departamento.

A mis padres por amarme y tener fe en mí.

A mis hermanos por ser los mejores amigos que tengo.

A mi familia, por el amor, confianza y apoyo incondicional que siempre me han brindado, especialmente a mis tías: Lupe, Ma. Elena, Leticia, Lourdes, Raquel, Ana y a mi tío Víctor.

Al Señor Herve Lemire y su familia, por su apoyo y cariño.

A CONACYT y a CICESE, por haberme permitido con su apoyo, las facilidades de cumplir esta meta en mi desarrollo académico y profesional.

A el CREMES y CICTUS unidad Bahía Kino, por haberme permitido trabajar con su equipo y en sus instalaciones.

A Gaby, Ivanpedro, Chuy, Miguel, Francisco y todos los demás compañeros con quienes conviví en mi estancia en Bahía Kino.

ÍNDICE

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1 Hipótesis | 7 |
| I.2 Objetivo general | 8 |
| I.2.1 Objetivos específicos | 8 |
| II METODOLOGÍA | 9 |
| II.1 Descripción del área de estudio | 9 |
| II.1.1 Características climatológicas | 9 |
| II.2 Diseño del fotobiorreactor | 10 |
| II.2.1 Construcción y funcionamiento | 10 |
| II.2.2 Condiciones del experimento | 12 |
| II.3 Características del cultivo | 13 |
| II.3.1 Descripción de la especie cultivada | 13 |
| II.3.2 Técnicas de cultivo | 14 |
| II.3.3 Muestras | 15 |
| II.4 Eficiencia del sistema | 16 |
| II.5 Análisis estadístico | 17 |
| III RESULTADOS Y DISCUSIONES | 18 |
| III.1 Condiciones de cultivo | 18 |
| III.2 Cultivos | 26 |
| III.2.1 Cultivos de Invierno | 28 |
| III.2.2 Cultivos de Primavera | 32 |

ÍNDICE (Continuación)

| | <u>Página</u> |
|----------------------------------|---------------|
| III.2.3 Cultivos de Verano | 36 |
| III.2.4 Diferencias estacionales | 40 |
| III.3 Consideraciones generales | 42 |
| VI CONCLUSIONES | 48 |
| LITERATURA CITADA | 50 |
| ANEXOS | 57 |

LISTA DE FIGURAS

| <u>Figura</u> | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 1 Sistema de cultivo en columna con fotobiorreactor. 1) Columna de fibra de vidrio sun-lite de 300 l. (1.55 m de alto por 0.5 m de diámetro), 2) Bomba sumergible, 3) Manguera de aire, 4) Estructura del fotobiorreactor (madera) 3.20 m de alto por 0.30 m de ancho, 5) Manguera transparente (tygon) de 1.9 cm, 6) Suministro de de aire (PVC), 7) Tramo de PVC, 8) Enchufe eléctrico, 9) retorno. Las flechas indican la circulación del fluido. | 11 |
| 2 Valores de pH promedio, registrado en los cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> , a diferentes horas de cultivo, en los fotobiorreactores (FBR) y en los sistemas tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V). I-S (◇); I-FBR (◆); Pr-S (▣); Pr-FBR (■); V-S (○) y V-FBR (●). La flecha indica la hora en que se encendió el FBR y las líneas gruesas sobre el eje de las horas, muestran los períodos de obscuridad. | 19 |
| 3 Temperatura promedio (°C), registrada en los cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> , a diferentes horas de cultivo, en los fotobiorreactores (FBR) y en los sistemas tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V). I-S (◇); I-FBR (◆); I-S 2 (△); I-FBR 2 (▲); Pr-S (▣); Pr-FBR (■); V-S (○) y V-FBR (●). Los números 1 y 2 indican los experimentos de invierno. La flecha señala la hora en que se encendió el FBR, y las líneas gruesas sobre el eje de las horas, muestran los períodos de obscuridad. | 21 |
| 4 Variación de la irradiancia instantanea registrada ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en diferentes horas del día a través de cada uno de los experimentos en la estación de: a) invierno, b) primavera y c) verano. Experimento 1(◆); experimento 2(●) y experimento 3(■). Las líneas gruesas en el eje del tiempo indican períodos de obscuridad, ya que este eje no es continuo. | 25 |
| 5 Curvas de crecimiento promedio (10^5 cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , usando el sistema en cultivos con fotobiorreactor (FBR) y tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V): I-S (◇); I-FBR (◆); Pr-S (▣); Pr-FBR (■); V-S (○) y V-FBR (●). La flecha indica cuando se prendió la bomba del FBR. Las líneas gruesas indican períodos de obscuridad. | 27 |
| 6 Curvas de crecimiento promedio de <i>Chaetoceros muelleri</i> , en mg l^{-1} de peso seco orgánico, en cultivos con fotobiorreactor (FBR) y tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V): I-S (◇); I-FBR (◆); Pr-S (▣); Pr-FBR (■); V-S (○) y V-FBR (●). La flecha indica cuando se prendió la bomba del FBR. Las líneas gruesas indican períodos de obscuridad. | 27 |

LISTA DE TABLAS

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|---|---------------|
| I | Valores de temperatura promedio (°C) de los cultivos para distintas horas del día, en las estaciones de invierno, primavera y verano. En paréntesis, desviación estándar. | 20 |
| II | Valores promedio de la temperatura de los cultivos (°C) registrada en las estaciones de invierno, primavera y verano, a diferentes horas de cultivo. Los asteriscos muestran los datos correspondientes al primero (*) y el segundo (**) experimento de invierno. | 22 |
| III | Valores promedio de la irradiancia acumulada (mol m^{-2}) a diferentes horas de cultivo, para las distintas estaciones de experimentación. | 23 |
| IV | Valores promedio y promedio total de la concentración celular (10^4 cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha=0.05$). $a < b < c < d$. | 29 |
| V | Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Dunn, después de aplicar un análisis de varianza de una vía por rangos (Kruskal Wallis) ($\alpha=0.05$). $a < b$. | 29 |
| VI | Valores promedio del peso seco orgánico normalizado ($10^{-2} \text{ mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de invierno a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Dunn, después de aplicar un análisis de varianza por rangos (Kruskal Wallis) ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b$. | 31 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|--|---------------|
| VII | Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a diferentes horas de cultivo. | 31 |
| VIII | Valores promedio y promedio total de la concentración celular ($\times 10^4$ cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de primavera a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq b < c$. | 33 |
| IX | Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), en la estación de primavera a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Dunn, después de aplicar un análisis de varianza de una vías por rangos (prueba de Kruskal Wallis) ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b$. | 33 |
| X | Valores promedio del peso seco orgánico normalizado (10^{-2} mg \bullet 10^6 cel) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de primavera a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b$. | 34 |
| XI | Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de primavera a diferentes horas de cultivo. | 35 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|---|---------------|
| XII | Valores promedio y promedio total de la concentración celular (10^4 cél ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de verano a diferentes horas de cultivo. Se aplicó un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). Las letras indican la igualdad entre las producciones de los sistemas. | 37 |
| XIII | Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenidos en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b \leq bc \leq c$. | 37 |
| XIV | Valores promedio del peso seco orgánico normalizado ($10^{-2} \text{ mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b \leq bc \leq c$. | 38 |
| XV | Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a distintas horas de cultivo. | 39 |
| XVI | Valores promedio de la irradiancia acumulada (mol m^2), valores promedio normalizados ($10^{13} \text{ cel} \cdot 270 \text{ l} \cdot \text{mol} \cdot \text{hora}$) y el porcentaje de la diferencia entre los sistemas de cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> , mantenido en diferentes estaciones y horas de cultivo. | 41 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|--|---------------|
| XVII | Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de producción expresado como número celular (cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 58 |
| XVIII | Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de producción expresada como número celular (cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 58 |
| XIX | Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de producción expresado como número celular (cel ml^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de verano. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 59 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|---|---------------|
| XX | Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$; P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 60 |
| XXI | Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 60 |
| XXII | Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de verano. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 61 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|--|---------------|
| XXIII | Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 62 |
| XXIV | Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 62 |
| XXV | Resumen del análisis de varianza de dos vías, con los valores de peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de verano. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor. | 63 |

LISTA DE TABLAS (continuación)

| <u>Tabla</u> | | <u>Página</u> |
|--------------|--|---------------|
| XXVI | Resumen de los análisis de dos vías, con los valores de producción expresada como número celular (cel ml ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ♦ marca la transformación de los datos a logaritmo natural (ln). La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores de los valores, "a" corresponde al menor. | 64 |
| XXVII | Resumen de los análisis de dos vías (•) y de una vía por rangos caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis) (♦), con los valores de producción expresada como peso seco orgánico (mg l ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ■ marca la transformación de los datos a raíz cuadrada. La prueba a posteriori utilizada en el ANOVA de dos vías fue la de Student Newman Keuls y en el ANOVA de una vía por rangos, se uso la prueba de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores de los valores, "a" corresponde al menor. | 65 |
| XXVIII | Resumen de los análisis de dos vías (•) y de una vía por rangos caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis) (♦), con los valores de producción expresada como peso seco orgánico normalizado (mg • 10 ⁶ cel) de <i>Chaetoceros muelleri</i> , cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ♦ marca la transformación de los datos a logaritmo natural (ln). La prueba a posteriori utilizada en el ANOVA de dos vías fue la de Student Newman Keuls y en el ANOVA de una vía por rangos, se uso la prueba de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores de los valores, "a" corresponde al menor. | 66 |

USO DE UN FOTOBIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE MICROALGAS PARA LA ACUACULTURA

I. INTRODUCCIÓN

Todo laboratorio de producción de larvas, postlarvas y juveniles de organismos acuáticos necesita mantener un sistema de cultivos de apoyo para la alimentación de estos organismos durante por lo menos parte del proceso de cría. En la mayor parte de los casos se trata de microfiltradores, que utilizan principalmente microalgas, aunque en algunos casos es preciso proporcionar también organismos zooplanctónicos como rotíferos, cladóceros, copépodos y otros microcrustáceos, entre ellos diferentes estadios del branquiópodo *Artemia*, que por lo general también necesitan de microalgas para su cría (Horstmann, 1985).

Se ha reconocido desde hace tiempo que esta actividad de apoyo para la finalidad primaria de cualquier laboratorio comercial, representa una fracción importante del costo global de operación de esos laboratorios. Fulks y Main (1991) y Coutteau y Sorgeloos (1992) calcularon que esta fracción puede llegar a representar hasta el 50 % de los costos totales de operación, de hecho se considera que la necesidad de aumentar la producción de microalgas y los costos y dificultades involucrados en ésto, representan un verdadero "cuello de botella" al crecimiento de la actividad acuícola (Coutteau y Sorgeloos, 1992.). En casos específicos se ha calculado que estos costos pueden representar en México hasta más del 60% del costo global (Trujillo Valle y Voltolina, 1994 y com. pers.).

Lamentablemente, no existen muchos estudios publicados que analicen los varios factores de costos involucrados en la producción de microalimento, que la mayoría de los laboratorios consideran información privilegiada y de hecho es difícil hasta el cálculo del costo global de producción por unidad de biomasa. Los estudios más recientes indican costos variables entre 50-100 y hasta 400 dólares americanos por Kg de microalgas secas (Fulks y Main, 1991; Coutteau y Sorgeloos, 1992) y que la importancia relativa de los factores de costos varía en dependencia de muchas causas, en general de tipo climático, macro y microgeográfico y microeconómico (Trujillo Valle y Voltolina, 1994).

Existen suficientes antecedentes sobre las varias posibilidades de reducir los costos de producción de los laboratorios de producción acuícola. La mayor parte de ellos se refiere a los costos involucrados en la producción de alimento, ya que el resto de los factores de costo que se refieren a esta actividad son difícilmente remediabiles mediante innovaciones o adaptaciones tecnológicas, en vista de que se refieren a costos de bienes y servicios básicos (Fulks y Main, 1991).

Uno de los factores de costo más estudiados es el que se refiere a la formulación del medio de cultivo para microalgas, por lo que se han ensayado muchas fuentes alternativas de nutrientes. Tales son los casos del uso de fertilizantes agrícolas (González Rodríguez y Maestrini, 1984; Geldenhuys *et al.*, 1988; López Elías y Voltolina, 1993), aguas residuales (Sánchez Saavedra y Voltolina, 1994), uso de biodigestores (Paniagua Michel *et al.*, 1987; Sánchez Saavedra, 1989; Sánchez Saavedra y Bückle Ramírez, 1993) o más sencillamente de medios simplificados (López Elías, 1990; Figueroa Soto y Tapia Díaz, 1991; Bustillos y López Elías, 1994).

Por otro lado, los intentos de sustituir de una forma total o parcial a las microalgas frescas como fuente principal de alimento han llevado a buscar técnicas para su preservación, como son el secado (Laing *et al.*, 1990; Laing y Millican, 1992), el liofilizado o congelado (Cordero Esquivel *et al.*, 1993), la elaboración de pastas (Donaldson, 1991), o el uso de alimentos alternativos como son las levaduras (Coutteau *et al.*, 1990, 1991), las bacterias (Douillet, 1987) y el empleo de dietas artificiales elaboradas con alimentos naturales inertes, como el salvado de arroz (Dobbeleir *et al.*, 1980; Dhert *et al.*, 1992), o artificiales en forma de microencapsulados (Jones *et al.*, 1984; Chu *et al.*, 1982, 1987).

Sin embargo, la mayoría de los laboratorios comerciales ha reconocido el costo del medio de cultivo como de importancia secundaria (Fulks y Main, 1991; Trujillo Valle y Voltolina, 1994). Por otro lado, los resultados con alimentos inertes, naturales o artificiales, no han sido siempre satisfactorios (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Cañizares Villanueva *et al.*, 1994) y existe además una renuencia del Sector Productivo a utilizarlos, sobre todo por la dificultad de mantenerlos en suspensión y porque generalmente estas dietas son una fuente importante de deterioro de la calidad del agua de cultivo (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

Dentro de las investigaciones sobre los otros factores de costo de producción, existen unas pocas enfocadas a solucionar los problemas que para la mayoría de los productores son los más importantes, como son el costo de mano de obra y los costos de los servicios. Para los primeros, se han diseñado sistemas continuos o semi-continuos los cuales, aumentando el nivel de automatización, podrían disminuir en términos cuantitativos la necesidad de mano de obra y de servicios y costos auxiliares, como es el costo de inversión relativo a las superficies y volúmenes dedicados a cultivos de apoyo (Fulks y Main, 1991) aunque, al aumentar la calidad de la mano de obra y los costos iniciales de inversión, esta solución no resuelve este tipo de problemas en países en vía de desarrollo lento y hasta en los que están en desarrollo sostenido, como es el caso de México.

En otras investigaciones se toman en cuenta los problemas relacionados con los costos de energía eléctrica o se considera el uso generalizado de cultivos sucesivos y de sistemas redundantes, diseñados para que ofrezcan una mayor garantía de la continuidad de la producción, que se traduce en un exceso productivo comparado con las necesidades reales de los laboratorios.

También se han propuesto y ya se han puesto en práctica en varios lugares de diferentes países, sistemas de producción masiva en solariums o invernaderos y hasta al exterior (Chaumont, 1993), con resultados de producción aceptables en términos cuantitativos y con ahorros variables de energía eléctrica. Sin embargo, la densidad celular que se obtiene no es por lo general superior a la de los sistemas tradicionales, por lo cual no se resuelve el problema de los costos involucrados en el diseño redundante de estos sistemas de producción.

Como ya se mencionó, son muy escasos los estudios publicados, dedicados a evaluar la importancia de los factores de costos involucrados en la producción de microalgas para la acuicultura. El más reciente (Fulks y Main, 1991), revela que existe una variabilidad elevada, que se debe a una multitud de factores como son la ubicación geográfica, la accesibilidad de insumos y servicios, el costo de la mano de obra y su disponibilidad local, aparte de los climáticos y de los típicamente biológicos, como las necesidades dietéticas de los organismos en cultivo y la facilidad de cultivar la o las especies de microalgas necesarias.

En años recientes, el Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. se ha dedicado a estudiar este problema a nivel regional, sobre todo en los estados ribereños del Golfo de California, en los cuales domina un clima desértico, semidesértico o subtropical seco.

La mayoría de los laboratorios de esta región, hasta hace poco, cultivaban microalgas en ambientes controlados, con sistema de alumbrado artificial total o parcial. Los costos en términos de energía eléctrica, aunque variantes en dependencia de las dimensiones del laboratorio, de la ubicación geográfica, del clima y del sistema de climatización y de alumbrado entre otros, pueden en algunos casos representar hasta el 30 % del costo total de operación. Por este motivo, se ha sugerido el uso de cultivos al exterior, con previa aclimatación y estudio de las condiciones límite dentro de las cuales cada especie o cepa de microalgas puede ser utilizada (Tinoco Villa, 1996; Borbón Muñoz y Victoria Gallardo, 1996). Esta técnica es ahora la que se utiliza con preferencia a otras, hasta en las condiciones climáticas más extremas de la región, que se encuentran en el estado de Sonora, con resultados satisfactorios ya que permiten producciones por lo general iguales o sólo ligeramente inferiores a las que se obtienen en condiciones de cultivo al interior.

Por otro lado, es posible mejorar esta técnica para bajar aun más los costos de producción, optimizando el uso de la infraestructura disponible en estos laboratorios, en los cuales se utiliza la técnica de inóculos sucesivos que consiste en una serie de cultivos terminales de dimensiones que aumentan progresivamente. Esta técnica se ha generalizado en los laboratorios comerciales porque requiere de un menor cuidado y de mano de obra menos calificada, en comparación con los sistemas de tipo continuo o semi-continuo, además de ser menos susceptible a la contaminación con especies de microalgas ajenas.

Para cultivar microalgas es necesario tomar en cuenta los factores ambientales que regulan su crecimiento, como la composición del medio de cultivo, la luz, la temperatura, la salinidad, el pH y la disponibilidad de CO₂.

Aún cuando todos estos factores están inicialmente adecuados, algunos de ellos se pueden volver limitantes en el transcurso del cultivo, lo cual tiene como consecuencia bajas concentraciones celulares finales, sobre todo en los últimos niveles de producción.

Tal es el caso de la cantidad de luz. En los cultivos al interior, la producción y la velocidad de crecimiento están por lo general limitados por la cantidad de luz (Sánchez Saavedra y Voltolina, 1996) y aún al exterior, a pesar de la mayor energía lumínica disponible en la superficie del cultivo, el aumento paulatino de la concentración celular tiene como resultado una disminución de la penetración de la luz (y posiblemente un cambio de su calidad espectral) de forma tal que, a pesar de las mejores condiciones iniciales de iluminación, este tipo de cultivos no produce una cantidad de biomasa proporcional al aumento de la energía disponible. En otras palabras, la disponibilidad de luz vuelve a ser un factor limitante ya que, aún cuando en estos sistemas se cuenta con sistemas de aireación que provocan una circulación dentro del cultivo, el tiempo en que las células reciben una suficiente cantidad de luz natural se reduce, a medida que aumenta su concentración celular en el cultivo.

Para diversas especies de microalgas se ha estudiado el efecto de los diferentes ciclos de disponibilidad de luz (Brand y Guillard, 1981; Hama *et al.*, 1988; Grobbelaar, 1989) y se reporta que, en general, estos organismos pueden reproducirse en ciclos de luz y oscuridad o en luz continua independientemente de la intensidad pero que hay especies que, bajo estas mismas condiciones, crecen más lentamente o detienen su reproducción. Richmond (1986) menciona que el tiempo de exposición, así como el tipo y la magnitud de la iluminación utilizada pueden determinar la respuesta a esta variable y Torzillo *et al.* (1991) reportan que además de las variaciones en la cantidad de luz y en la frecuencia de los ciclos lumínicos, la temperatura es un factor que contribuye en la magnitud y el tipo de respuesta.

Varios de estos antecedentes indican que ciclos de exposición a la luz con una frecuencia mediana (del orden de horas), aunque de corta duración, pueden ser favorables para el crecimiento de las microalgas. Por este motivo se pensó deseable diseñar y experimentar con un sistema para el cultivo de microalgas, que permitiera disminuir el efecto de la limitación del crecimiento debido a la escasa disponibilidad de luz, mediante una exposición periódica del cultivo a un nivel mayor de iluminación. Esto tendría que favorecer el crecimiento de las microalgas, por lo menos cuando éstas se encuentren limitadas por la escasa iluminación en un sistema tradicional, lo que permitiría obtener una mayor densidad de células en tiempos más cortos.

En un principio, todo sistema cerrado o semicerrado dentro del cual tiene lugar un proceso biológico por efecto de la exposición a la luz, puede ser definido como un fotobiorreactor. En el presente trabajo se utilizó este término para el sistema modificado, en el cual se espera acelerar los procesos biológicos relacionados con el aumento de la biomasa microalgal.

El uso de fotobiorreactores cilíndricos o tubulares empezó a fines de los años cincuentas (Tredici *et al.*, 1993), con la idea de proporcionar una mayor exposición de luz al cultivo aumentando la relación área - volumen y hacer más eficiente el sistema de mezcla (Iqbal *et al.*, 1993). Sin embargo, con estos sistemas no se obtuvieron al inicio buenos resultados, por el alto costo y la baja calidad de los materiales empleados en la construcción de los reactores.

Actualmente países como Francia, Italia e Israel, siguen experimentando a escala piloto con estos sistemas, para el cultivo de diversas especies de microalgas, entre ellas *Dunaliella* y *Spirulina*, obteniéndose aproximadamente el 50 % más de producción que en canales de alta velocidad (Torzillo *et al.*, 1986; Tredici *et al.*, 1993).

Los modelos que más se han estudiado son fotobiorreactores semicontinuos del tipo cerrado porque permiten un mejor control físico, químico y biológico del cultivo, previenen la evaporación y logran un mejor control de la temperatura, pueden ser usados como cultivos al exterior ya que tienen una mayor protección contra la contaminación ambiental y en muchas situaciones dan una mejor producción de biomasa que los sistemas tradicionales abiertos (Tredici y Materassi, 1992). Su utilización práctica se refiere a fines diversos, como la producción de biomasa para la alimentación de organismos acuáticos (James y Al-Khars, 1990; Tredici y Materassi, 1992), la producción industrial de una variedad de productos de interés farmacéutico y metabolitos de alto valor comercial (Borowitzka, 1988; Pushparaj *et al.*, 1994; Benemann, 1989; Tredici y Materassi, 1992).

Sin embargo, estos sistemas presentan algunas limitaciones para su escalamiento, ya que un aumento del diámetro del tubo resulta en un decremento de la relación área - volumen y por lo tanto en una reducción de la luz incidente por unidad de volumen (Edmund *et al.*, 1990). Además en los sistemas cerrados se tiende a producir oxígeno en exceso y esto causa un incremento de la fotorespiración e inhibe o disminuye

la actividad fotosintética, y en ocasiones es necesario el empleo de un sistema de enfriamiento, lo cual eleva sus costos, debido a que la temperatura puede aumentar de 10 a 30 °C más que la del medio ambiente por lo menos durante algunas horas en el día. Por lo anterior su uso ha sido limitado a producción de metabolitos de alto valor económico (Benemann, 1989; Tredici y Materassi, 1992).

El sistema que se propone para este trabajo es de tipo cerrado (cultivo terminal), pero permite el intercambio de gases con la atmósfera y está diseñado para ciclos breves (dos-tres días) de producción, que minimiza el peligro de contaminación debida al acarreo de contaminantes por factores diversos, principalmente por vientos y por insectos.

I. 1 HIPÓTESIS

El uso de un fotobiorreactor que permite el aumento del tiempo de exposición a la iluminación natural, favorece el crecimiento de las microalgas y permite obtener una mayor producción de biomasa.

I. 2 OBJETIVO GENERAL

Optimizar un sistema de producción de microalgas ya existente, minimizando la limitación por disponibilidad de luz, en cultivos al exterior.

I. 2. 1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y comparar el crecimiento y producción de microalgas en un sistema de cultivo tradicional y en un fotobiorreactor.
- Comparar la producción del nuevo sistema (fotobiorreactor) en tres situaciones estacionales.
- Comparar la relación entre el crecimiento y la producción con la radiación disponible en tres estaciones y con diferentes tiempos de exposición.

II. METODOLOGÍA

II.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Los cultivos experimentales se realizaron en las instalaciones del Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (IAES), mientras que las determinaciones de biomasa fueron realizadas en el laboratorio del Departamento de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Sonora (DICTUS), unidad Bahía Kino. El primero se ubica en la ensenada Kun kaak, frente a la Isla Tiburón en Bahía Kino, Estado de Sonora, población costera situada a 100 Km de la ciudad de Hermosillo.

El laboratorio se encuentra construido sobre una elevación de 16 m arriba del nivel medio del mar. Las instalaciones techadas cubren un área de 2,050 m² y comprenden básicamente tres secciones: microalgas, larvas de moluscos y larvas de camarón.

La sección de microalgas dentro del laboratorio es de 395 m². El área de cultivo de microalgas al exterior cuenta con 280 m² y se utiliza para cultivos de tipo terminal en columnas de 300 l y en tanques de 2,000 3,000 y 4,700 l.

II. 1. 1 CARACTERÍSTICAS CLIMATOLÓGICAS

Bahía Kino está ubicada geográficamente a los 28° 49' 12" de latitud Norte y 11° 56' 56" de longitud Oeste. Presenta un clima desértico semicálido, con vientos frescos y temperaturas extremas que van desde cero grados en enero y febrero, hasta temperaturas máximas de 48°C en julio y agosto.

La precipitación pluvial media anual varía de 75 a 200 mm con mayor incidencia en los meses de julio a septiembre. Los meses más secos son abril y mayo, con precipitaciones en el intervalo de 0 a 0.2 mm y los meses más húmedos son julio y agosto.

Durante la mayor parte del año predominan vientos suaves del Sur. En el período de agosto a octubre se presentan vientos fuertes a moderados del Norte y Noroeste (Rodríguez Ortega *et al.*, 1994).

II. 2 DISEÑO DEL FOTOBIORREACTOR

La finalidad del fotobiorreactor es la de optimizar un sistema de producción estático ya existente, minimizando la limitación por la escasa disponibilidad de la luz al interior de los cultivos.

La modificación consiste en agregar un sistema de bombeo conectada a una estructura en forma de espiral, que al ser integrada a un sistema tradicional de producción de microalgas, incrementa periódicamente la cantidad de luz recibida por el cultivo.

II. 2.1 CONSTRUCCIÓN Y FUNCIONAMIENTO

El fotobiorreactor, del cual se construyeron tres ejemplares, consiste en una manguera de tygon de 1.9 cm de diámetro, enrollada y sujeta en forma de espiral alrededor de dos barrotes de madera de aproximadamente 2.54 por 5.08 cm de lado y 3.20 m de longitud, unidos por tramos de madera de 16.5 cm, formando una estructura en forma de escalera. La manguera está sujeta por los costados exteriores de la estructura de madera, por medio de alambre y clavos de 5 cm de longitud y con separaciones entre ellos de 11.5 cm (Figura 1). El largo de la manguera del fotobiorreactor y el número de vueltas de la espiral puede variar dependiendo de las necesidades del cultivo. Para éste diseño se utilizaron 15 m de manguera, con 14 vueltas en la espiral.

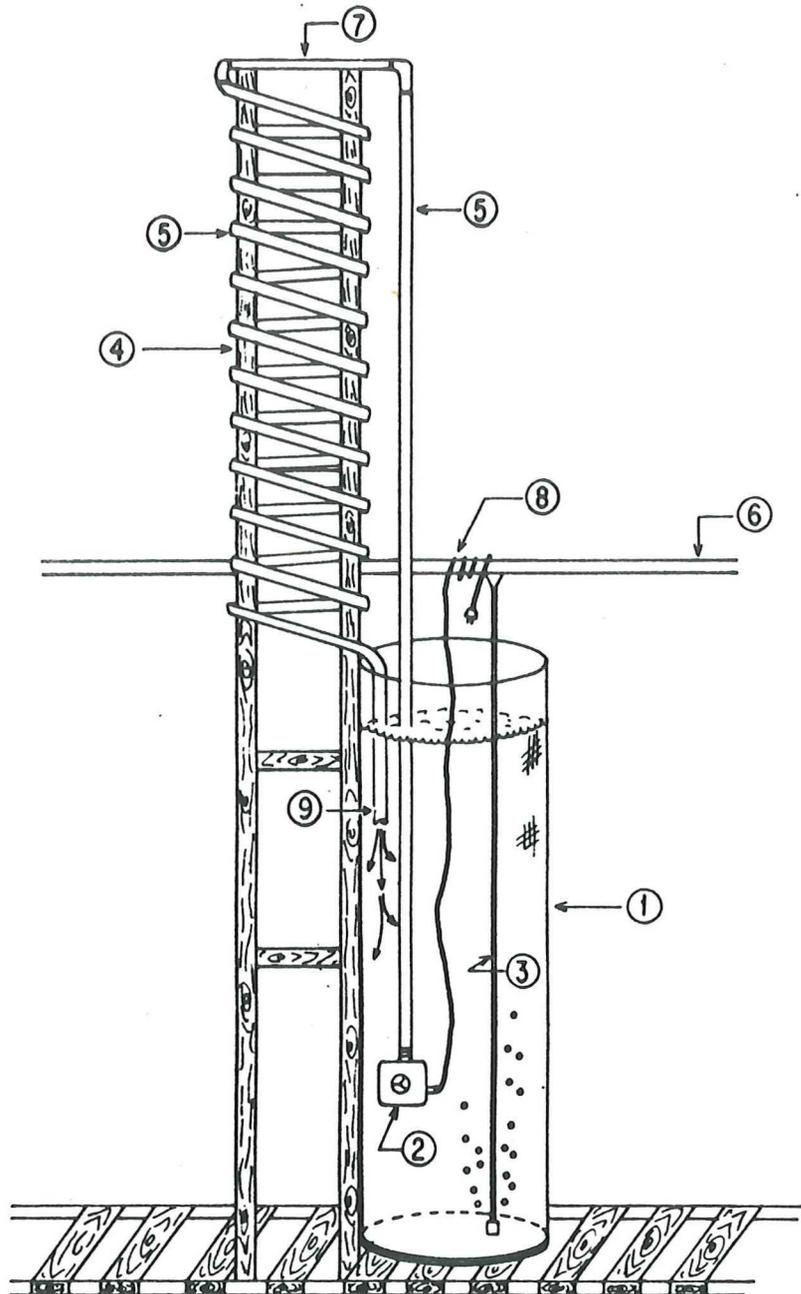


Figura 1. Sistema de cultivo en columna con fotobiorreactor. 1) Columna de fibra de vidrio sun-lite de 300 l. (1.55 m de alto por 0.50 m de diámetro), 2) Bomba sumergible, 3) Manguera de aire, 4) Estructura del fotobiorreactor (madera) 3.20 m de alto por 0.30 m de ancho, 5) Manguera transparente (tygon) de 1.9 cm, 6) Suministro de aire (PVC), 7) tramo de PVC, 8) Enchufe eléctrico, 9) retorno. Las flechas indican la circulación del fluido.

El fotobiorreactor está diseñado para ser acoplado a un costado de un recipiente tradicional de cultivo. En este caso se utilizaron columnas de fibra de vidrio "Sun-lite" de fondo plano de 50 cm de diámetro por 155 cm de altura y de 300 l de capacidad. De la columna de cultivo sale una manguera transparente de 1.9 cm de diámetro que viaja hasta la parte superior de la estructura que conforma el fotobiorreactor y de ésta baja nuevamente a la columna de cultivo.

El trabajo que realiza el fotobiorreactor se inicia cuando por medio de una bomba centrífuga sumergible (Aquatron Purex de 1/16 Hp) colocada en la parte media de la columna de cultivo, se impulsa un flujo constante de 20 l de cultivo min^{-1} hasta la parte superior del fotobiorreactor (aproximadamente 1.5 m por arriba de la superficie del cultivo).

Las bombas de los fotobiorreactores fueron conectadas a un controlador de encendido (SPER Scientific 8100030 de 120 volts), el cual se programaba en cada experimento para controlar el tiempo de encendido y apagado de las bombas de una manera automática. La circulación del cultivo a través del fotobiorreactor se iniciaba 24 horas después de haberse inoculado las columnas y continuaba desde el amanecer hasta el atardecer.

Debido a que una de las finalidades del fotobiorreactor es optimizar los costos de producción, este sistema fue construido con materiales y accesorios de bajo costo, fácilmente disponibles y de uso común en un laboratorio de producción.

II. 2. 2 CONDICIONES DEL EXPERIMENTO

La fase experimental del trabajo comprendió la comparación de la producción de la biomasa algal en tres unidades de producción convencional en columnas de fibra de vidrio de 300 l, con otras tres equipadas con un fotobiorreactor.

Los experimentos se llevaron a cabo en los meses de enero, marzo y mayo de 1996. Cada experimento fue repetido dos o tres veces, y el tiempo de cultivo de cada uno fue de 72 horas, equivalente a la rutina de producción de la mayoría de los laboratorios comerciales de acuicultura de la región.

En el caso del mes de enero, se efectuaron dos experimentos, el primero (16 al 19 de enero), fue el único experimento en donde las columnas de cultivo fueron inoculadas a las 12:45 horas. En el segundo experimento (23 al 26 de enero), las columnas de cultivo fueron inoculadas por la mañana (7:30).

En el mes de marzo, se realizaron tres experimentos, el primero (18 al 20 de marzo), al igual que en los otros dos, las columnas de cultivo fueron inoculadas por la mañana (7:00). En este experimento, los cultivos tuvieron una duración de 48 horas, por motivos climatológicos (onda calida), que dió como resultado un rápido crecimiento del cultivo, así como su rápida declinación. Los experimentos 2 (23 al 26 de marzo) y 3 (del 31 de marzo al 3 de abril), tuvieron la duración establecida (72 horas).

En mayo, se realizaron tres experimentos; el primero de éstos, se realizó del 7 al 10 de mayo; el segundo del 14 al 17 de mayo y el tercero del 21 al 24 de mayo. En los tres casos, la inoculación de las columnas fue por la mañana (7:20).

Las columnas de cultivo se colocaron en el área exterior del laboratorio del CREMES, los recipientes se instalaron sobre tarimas de madera en un área de 4.7 por 1 m y orientandolos en dirección Norte-Sur, de forma tal que los recipientes no se sombrearan mutuamente. La separación entre columnas fue de 30 cm y su distribución fue hecha al azar. La distribución de Norte a Sur de los sistemas experimentales en columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F) fue la siguiente: S-3, F-3, S-2, S-1 F-2 y F-1, en donde los números corresponden a las repeticiones.

II. 3 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

II. 3. 1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE CULTIVADA

La microalga escogida para realizar los cultivos experimentales fue el clon CHGRA de *Chaetoceros muelleri*, perteneciente a la clase Bacillariophyceae, obtenida de la colección del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.) con clave CH-M-1 (Trujillo Valle, 1993).

Esta diatomea tiene un tamaño de 4-6 μm y por su valor nutritivo es empleada ampliamente en laboratorios comerciales como uno de los principales alimentos para

larvas de peneidos, larvas y adultos de moluscos bivalvos y zooplancton como *Artemia* sp.

Además de poseer una elevada tasa de reproducción y un buen crecimiento en medios simplificados (Trujillo Valle, 1993), se ha observado en ensayos anteriores que esta especie presenta buenos resultados de crecimiento en cultivos al exterior en varias condiciones estacionales (Borbón Muñoz y Victoria Gallardo, 1996; Tinoco Villa, 1996).

II. 3. 2 TÉCNICA DE CULTIVO

El agua de mar utilizada para la preparación del medio de cultivo proviene de un pozo de playa que pasa por estanques de sedimentación, por filtros de arena y por una serie de filtros de cartucho que retienen partículas de 10, 1 y 0.5 μm . Además fue tratada con hipoclorito comercial al 6% a razón de 1 ml/ l de agua de mar durante 24 horas antes de ser utilizada. El cloro se neutralizó con tiosulfato de sodio (50 mg/ ml de hipoclorito agregado) (Hemerick, 1973).

La técnica de cultivo utilizada fue la de seguirinóculos progresivos, que consiste en mantener y transferir el inóculo a recipientes de volumen progresivamente mayor: tubo de ensayo (10 ml), matraz Erlenmeyer (250 ml), matraz Fernbach (2 y 6 l) y garrafón (18 l), cultivados en el interior del laboratorio del CREMES. Para los cultivos de hasta 6 l, el agua se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.12 Kg. cm^{-2} de presión durante 25 minutos. A partir de volúmenes de garrafón la esterilización fue sólo por vía química, como se describió anteriormente.

El inóculo empleado para las columnas de 300 l de capacidad, con 270 l de medio, provino de un cultivo en columna iniciado dos ó tres días antes del comienzo del experimento, para acondicionar a las células a las condiciones ambientales exteriores, del cual se tomó el volumen requerido para tener una concentración inicial promedio de 2×10^5 cél ml^{-1} en todas las columnas usadas en el experimento.

Los cultivos al exterior se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: valor promedio de temperatura de 19.3 ± 2.1 °C para enero, 24.1 ± 1.5 °C para marzo y 29.1 ± 1.8 °C para mayo; salinidad de 34‰ y pH mantenido entre 7.5 y 8.5 por medio de una mezcla de aire, enriquecido con CO_2 durante el período diurno, esta fue suministrada a

los cultivos por burbujeo constante, que sirvió también para mantener a las células en suspensión.

En todos los casos se empleó el medio de cultivo f/2 de Guillard y Ryther (1962), completo y preparado con sales de grado analítico para los cultivos hasta 2000 ml y de grado técnico para los volúmenes mayores. A partir del nivel garrafón se discontinuó el uso de metales traza y vitaminas.

Como ya se mencionó, los experimentos se mantuvieron con el fotoperíodo natural, sujeto a las variaciones estacionales. Considerando las horas luz-oscuridad del día, los fotoperíodos fueron en el mes de enero, de 10.5:13.5 horas, en marzo 11.5 :12.5 horas y para mayo 12.5 :11.5.

II. 3. 3. MUESTREOS

El horario de los muestreos en todos los experimentos, se basó en el número de horas luz del día, calculadas considerando como primera y última hora de luz las que registraron una irradiancia igual e inferior, respectivamente, a la recibida por los cultivos al interior (0.16×10^{17} cuanta $s^{-1} cm^{-2}$). Tres de los cuatro muestreos diarios eran realizados al inicio, mitad y final del período de luz. El cuarto muestreo se realizó a la mitad del período de obscuridad.

En cada muestreo se midió la temperatura con un termómetro de mercurio, con precisión de lectura de ± 0.5 °C, y el pH por medio de un potenciómetro portátil (Hanna Instruments).

La irradiancia cuántica (densidad de flujo de fotones) se midió en el transcurso del día con frecuencia horaria, además de que en las horas de muestreo, por medio de un medidor de cuanta 4π Biospherical Instruments Inc., modelo QSL-100. El número de cuanta de luz fue transformado a $mol m^{-2} s^{-1}$ siguiendo los pasos propuestos por Lüning (1981). Posteriormente, se hizo una integración de la irradiancia total cuántica en el tiempo de duración de los cultivos (irradiancia total acumulada) ($mol m^{-2}$), o en casos específicos en horas de cultivos (irradiancia total acumulada durante este tiempo específico de cultivo) ($mol m^{-2}$).

Durante cada muestreo se midió así mismo la densidad óptica de los cultivos con un espectrocolorímetro Leitz Inc. modelo M, las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 550 nm, para evitar los picos de absorción de las clorofilas, con la finalidad de averiguar el estado de los cultivos. Además, se tomaron muestras para las determinaciones de producción de biomasa en terminos de concentración celular y de sustancia orgánica producida por unidad de volumen de cultivo y de unidad productiva (columna).

La toma de muestras en cada columna, se realizó en la superficie del cultivo, con la ayuda de botellas de plástico de 300 ml.

II. 4 EFICIENCIA DEL SISTEMA

La eficiencia del sistema experimental se determinó por medio de la comparación de la producción de la biomasa algal, estimada como número de células producidas en cada sistema, normalizados por unidad de tiempo y/o por la cantidad de energía lumínica disponible.

La cantidad de células de microalgas en cada situación experimental, se estimó mediante mediciones diarias de la densidad celular por medio de conteos directos al microscopio y con un hematocitómetro "Reichert Bright-line" de 0.1 mm de profundidad.

El peso seco y el contenido de cenizas se estimaron según la metodología descrita por Sorokin (1973). Para lo anterior se filtraron dos o tres alícuotas de los diferentes cultivos a través de filtros de fibra de vidrio Poretics GC-50 y GB 140 o Whatman GF/B de 4.7 cm de diámetro, previamente incinerados y pesados. Las muestras se secaron a 60 °C en una estufa Ríos Rocha modelo Ns-33 y se pesaron en una balanza Mettler H8 con resolución de 1 mg. El contenido de cenizas se estimó después de incinerar la muestras en una mufla Felisa R Ind., a una temperatura de 480°C durante seis horas, después de lo cual se estimó el peso inorgánico de las muestras y, por diferencia su contenido orgánico ó peso seco orgánico (P.S.O.), el que con fines comparativos fue normalizado por un millón de células (P.S.O.N).

La cantidad de biomasa celular producida en cada sistema experimental (columna sencilla y con fotobiorreactor) fue normalizada por la cantidad de irradiancia acumulada

durante el tiempo del cultivo, considerando el área de exposición de cada sistema. El área de la sección iluminada de cada sistema fue calculada siguiendo las ecuaciones propuestas por Edmund *et al.*(1990), en donde se considera el área de la sección longitudinal (A) y esta se relaciona con el diámetro de la columna (d) y la longitud (l) o espesor del volumen del cultivo mediante la fórmula $A=d l \pi$. En este caso los sistemas fueron operados con un volumen de 270 l ó 1.375 m de columna de agua. Para la espiral del fotobiorreactor, se consideró el área de la sección longitudinal que se calculó con la ecuación $A= d l$, en donde (l) es la longitud total de la manguera expuesta a la luz.

II. 5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis de varianza de dos vías y donde fue necesario, pruebas a posteriori Student Newman Keuls (Sokal y Rohlf, 1979), para comparar la producción estimada como concentración celular (cél ml^{-1}), peso seco orgánico (mg l^{-1}) y peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$), obtenidas en ambos sistemas (sencillo y con fotobiorreactor) en cada estación a diferentes horas de cultivo, así como en las tres situaciones estacionales a una misma hora de cultivo. Todos los análisis fueron realizados con $\alpha=0.05$. En los casos donde no se cumplieron las hipótesis que fundamentan dicho análisis, se utilizó la transformación de los datos seleccionando la que dio una mayor probabilidad de ajuste a las pruebas (Fry, 1993).

En los casos donde la transformación de los datos utilizados en el ANOVA de dos vías no cumplieron con las hipótesis de este análisis, se utilizó la prueba no paramétrica de ANOVA por rangos, con $\alpha=0.05$, utilizando el método de Dunn como prueba de comparación múltiple.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1 CONDICIONES DE CULTIVO

El pH se mantuvo en el intervalo de 7.5 a 8.5 en todos los cultivos realizados, en parte debido al suministro de CO₂, que impidió un aumento excesivo de este parámetro durante el día, aunque sin cancelar totalmente el efecto de la actividad fotosintética que es especialmente evidente en los ensayos de marzo y mayo (Figura 2), cuando es notorio el aumento paulatino del pH durante las horas diurnas. En la noche, cuando se discontinuaba el suministro de CO₂, la actividad respiratoria de las microalgas lograba disminuir el pH a los valores mínimos del intervalo mencionado, que corresponde al óptimo reportado para ésta y otras especies similares (Trujillo Valle, 1993).

Las temperaturas promedio diarias del cultivo registradas en el mes de enero variaron entre 14.8 y 22.4 °C. Estos valores caen dentro del intervalo de temperaturas en cultivos de invierno, reportados para esta región por Tinoco Villa (1996). Como era de esperarse las menores temperaturas se registraron en la mañana y las más elevadas fueron durante la tarde (Tabla I y Figura 3a).

La mayor diferencia en el valor de temperatura promedio, entre los sistemas de cultivo fue aproximadamente de 1 a 1.3 °C, registrada a medio día en el primer experimento y durante la tarde durante el segundo experimento y en general las temperaturas resultaron superiores en el sistema con fotobiorreactor (Tabla II).

La temperatura de los cultivos al exterior es determinada principalmente por el grado y duración de la radiación solar (Richmond, 1986). En el caso de invierno, la irradiancia acumulada promedio (para las 72 horas de los cultivos) fue de 182 moles m⁻², con 10.5 horas de exposición diaria a la luz solar (Tabla III).

Las temperaturas registradas en los cultivos en marzo variaron entre los 19.7 y 29.02 °C y fueron ligeramente inferiores a las registradas para la primavera de 1995 (24 - 31 °C) por Tinoco Villa (1996), pero concuerdan con las registradas en Bahía Kino en varios

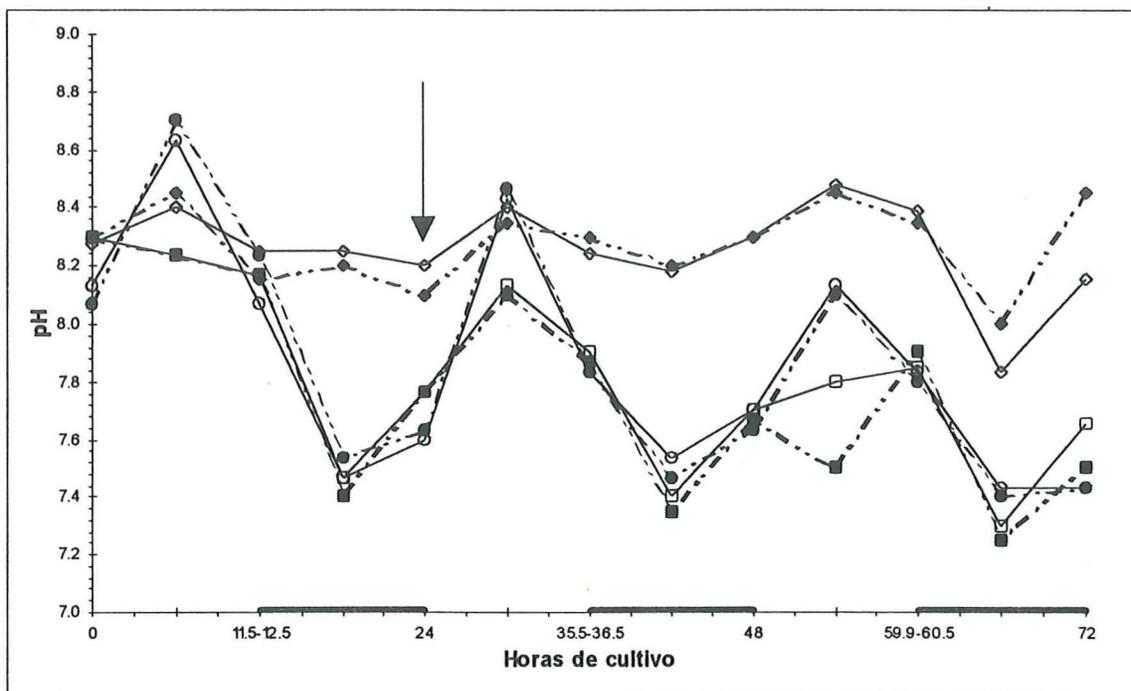


Figura 2. Valores de pH promedio, registrado en los cultivos de *Chaetoceros muelleri*, a diferentes horas de cultivo, en los fotobiorreactores (FBR) y en los sistemas tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V). I-S (◇); I-FBR (◆); Pr-S (□); Pr-FBR (■); V-S (○) y V-FBR (●). La flecha indica la hora en que se encendió el FBR y las líneas gruesas sobre el eje de las horas, muestran los períodos de obscuridad.

Tabla I. Valores de temperatura promedio (°C) de los cultivos para distintas horas del día, en las estaciones de invierno, primavera y verano. En paréntesis la desviación estándar.

| Hora | Invierno (enero) | Primavera (marzo) | Verano (mayo) |
|-------------|---------------------|----------------------|------------------|
| 7:00 - 7:30 | 14.84 ± (2.33) | 19.69 ± (1.77) | 25.04 ± (0.59) |
| 12:45-13:30 | 21.85 ± (2.12) | 27.21 ± (1.47) | 32.52 ± (0.65) |
| 18:00-19:50 | 22.41 ± (1.84) | 29.02 ± (1.68) | 34.93 ± (0.73) |
| 00:45-1:30 | 20.12 ± (3.05) | 23.12 ± (1.31) | 29.54 ± (0.68) |

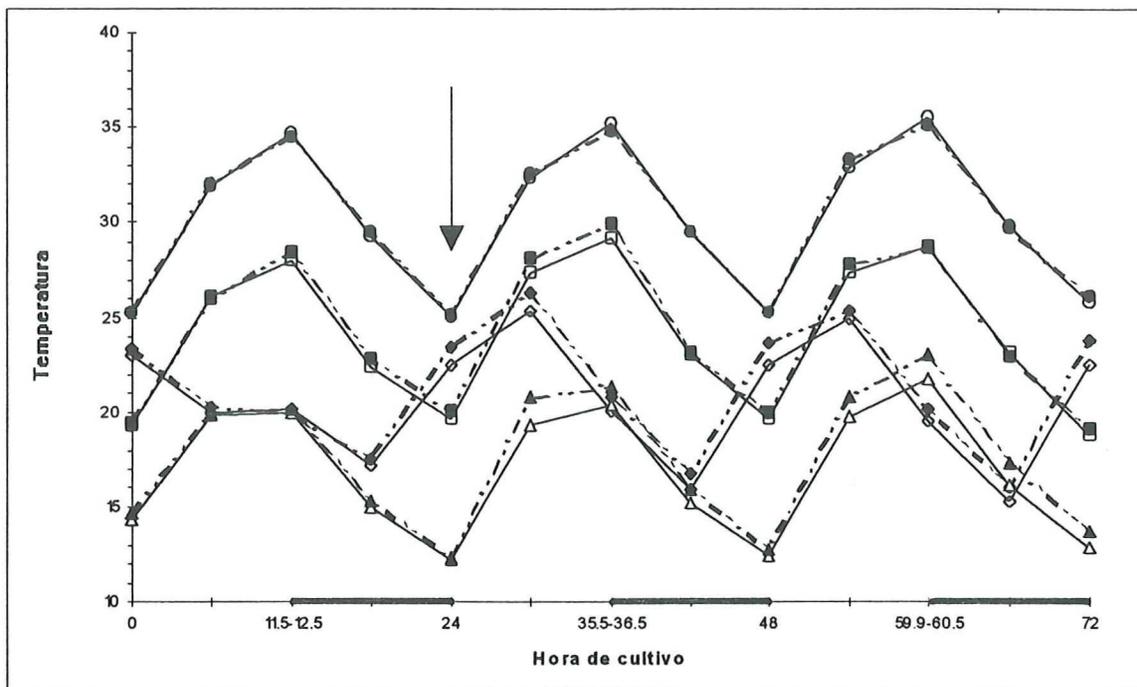


Figura 3. Temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$), registrada en los cultivos de *Chaetoceros muelleri*, a diferentes horas de cultivo, en los fotobiorreactores (FBR) y en los sistemas tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V). I-S (\diamond); I-FBR (\blacklozenge); I-S 2 (\triangle); I-FBR 2 (\blacktriangle); Pr-S (\blacksquare); Pr-FBR (\blacksquare); V-S (\circ) y V-FBR (\bullet). Los números 1 y 2 indican los experimentos de invierno. La flecha señala la hora en que se encendió el FBR, y las líneas gruesas sobre el eje de las horas, muestran los períodos de obscuridad.

Tabla II. Valores promedio de la temperatura de los cultivos (°C) registrada en los experimentos de invierno, primavera y verano, a diferentes horas de cultivo. Los asteriscos muestran los datos correspondientes al primero (*) y segundo (**) experimento de invierno.

| Estaciones | Hora del día | Hora de cultivo | Sistemas | | Promedio | Diferencia |
|------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|------------|
| | | | Fotobiorreactor | Sencillo | | |
| Invierno | 12:45 | 24 | * 23.5 ± (0.0) | * 22.5 ± (0.0) | 23.0 | 1.0 |
| | 12:45 | 48 | * 23.7 ± (0.6) | * 22.5 ± (0.0) | 23.1 | 1.2 |
| | 18:00 | 53.23 | * 25.3 ± (0.3) | * 24.9 ± (0.1) | 25.1 | 0.4 |
| | 12:45 | 72 | * 23.8 ± (0.4) | * 22.5 ± (0.5) | 23.2 | 1.3 |
| | 7:30 | 24 | ** 12.3 ± (0.2) | ** 12.2 ± (0.3) | 12.3 | 0.1 |
| | 7:30 | 48 | ** 12.3 ± (0.2) | ** 12.4 ± (0.5) | 12.4 | -0.1 |
| | 18:00 | 58.5 | ** 23.0 ± (0.8) | ** 21.8 ± (0.2) | 22.4 | 1.2 |
| | 7:30 | 72 | ** 13.7 ± (0.4) | ** 12.9 ± (0.1) | 13.3 | 0.8 |
| Primavera | 7:00 | 24 | 20.1 ± (2.4) | 19.7 ± (2.4) | 19.9 | 0.4 |
| | 7:00 | 48 | 19.9 ± (2.2) | 19.6 ± (2.1) | 19.8 | 0.3 |
| | 18:30 | 59.5 | 28.7 ± (0.3) | 28.7 ± (0.8) | 28.7 | 0.0 |
| | 7:00 | 72 | 19.2 ± (1.6) | 18.8 ± (1.9) | 19.0 | 0.4 |
| Verano | 7:20 | 24 | 25.1 ± (0.2) | 25.1 ± (0.3) | 25.1 | 0.0 |
| | 7:20 | 48 | 25.2 ± (0.3) | 25.2 ± (0.3) | 25.2 | 0.0 |
| | 19:50 | 60.5 | 35.2 ± (1.7) | 35.5 ± (1.9) | 35.4 | -0.3 |
| | 7:20 | 72 | 26.1 ± (1.7) | 25.8 ± (1.8) | 26.0 | 0.3 |

Tabla III. Valores promedio de la irradiancia acumulada (mol m^{-2}) a diferentes horas de cultivo, para las distintas estaciones de experimentación.

| Estación | Horas luz al día | Hora de cultivo | mol m^{-2} |
|-----------|------------------|-----------------|---------------------|
| Invierno | 10.5 | 24 | $58.7 \pm (3.5)$ |
| | | 48 | $118.0 \pm (8.5)$ |
| | | 53.25-58.5 | $166.0 \pm (18.4)$ |
| | | 72 | $182.0 \pm (3.5)$ |
| Primavera | 11.5 | 24 | $95.0 \pm (10.4)$ |
| | | 48 | $196.0 \pm (8.2)$ |
| | | 59.5 | $287.0 \pm (8.5)$ |
| | | 72 | $287.0 \pm (8.5)$ |
| Verano | 12.5 | 24 | $100.0 \pm (14.0)$ |
| | | 48 | $200.0 \pm (24.3)$ |
| | | 60.5 | $315.0 \pm (18.7)$ |
| | | 72 | $315.0 \pm (18.7)$ |

años de observación. Al igual que en invierno, la temperatura promedio máxima en el día fue alcanzada por la tarde y la mínima por la mañana (Tabla I y Figura 3a); las diferencias entre los sistemas de cultivo se registraron solamente por la mañana, cuando la temperatura en el fotobiorreactor fue entre 0.3 y 0.4 °C superior que en el sistema tradicional (Tabla II).

El aumento en los valores de las temperaturas en los cultivos de primavera con respecto a los de invierno, son el resultado del aumento en una hora en el tiempo de exposición a la radiación solar (11.5 horas) y de un incremento del 36.6%, en la cantidad de la energía acumulada (287 moles m^{-2}) (Tabla III y Figura 4).

Las temperaturas promedio de los cultivos registradas en el mes de mayo fluctuaron entre los 25.0 y 35.0 °C (Tabla I y Figura 3a), inferiores a las que reportan Borbón Muñoz y Victoria Gallardo (1996) para esta zona (32-42 °C) en la estación de verano (V), registrándose las máximas temperaturas del día por la tarde, misma hora en que se presentaron las diferencias máximas (0.3 °C) entre los sistemas de cultivo (Tabla II), que desaparecían por la mañana.

En cuanto a la duración de luz, ésta aumentó una hora en verano (12.5 horas), y la irradiancia acumulada aumentó en un 8.9% (315 moles m^{-2}) con respecto a los valores registrados en primavera (Tabla III).

La cantidad de energía y el tiempo de exposición, tienen una relación directa con la variación de la temperatura de cultivos al exterior. El aumento de la temperatura, también se relaciona directamente con un aumento en el área de exposición del cultivo a la radiación solar, que es mayor en el fotobiorreactor; sin embargo, las diferencias de temperatura entre los sistemas indican de manera general que al ir aumentando estacionalmente la cantidad y duración de la luz, estas diferencias se aminoran, independientemente del área de exposición de los sistemas. Esto puede deberse a una disipación del calor en el sistema con fotobiorreactor, minimizando las diferencias entre los sistemas, ya que si bien este ofrece una mayor área de exposición a la radiación solar, también brinda una mayor circulación del cultivo y permite de esta manera que se disipe el exceso de calor.

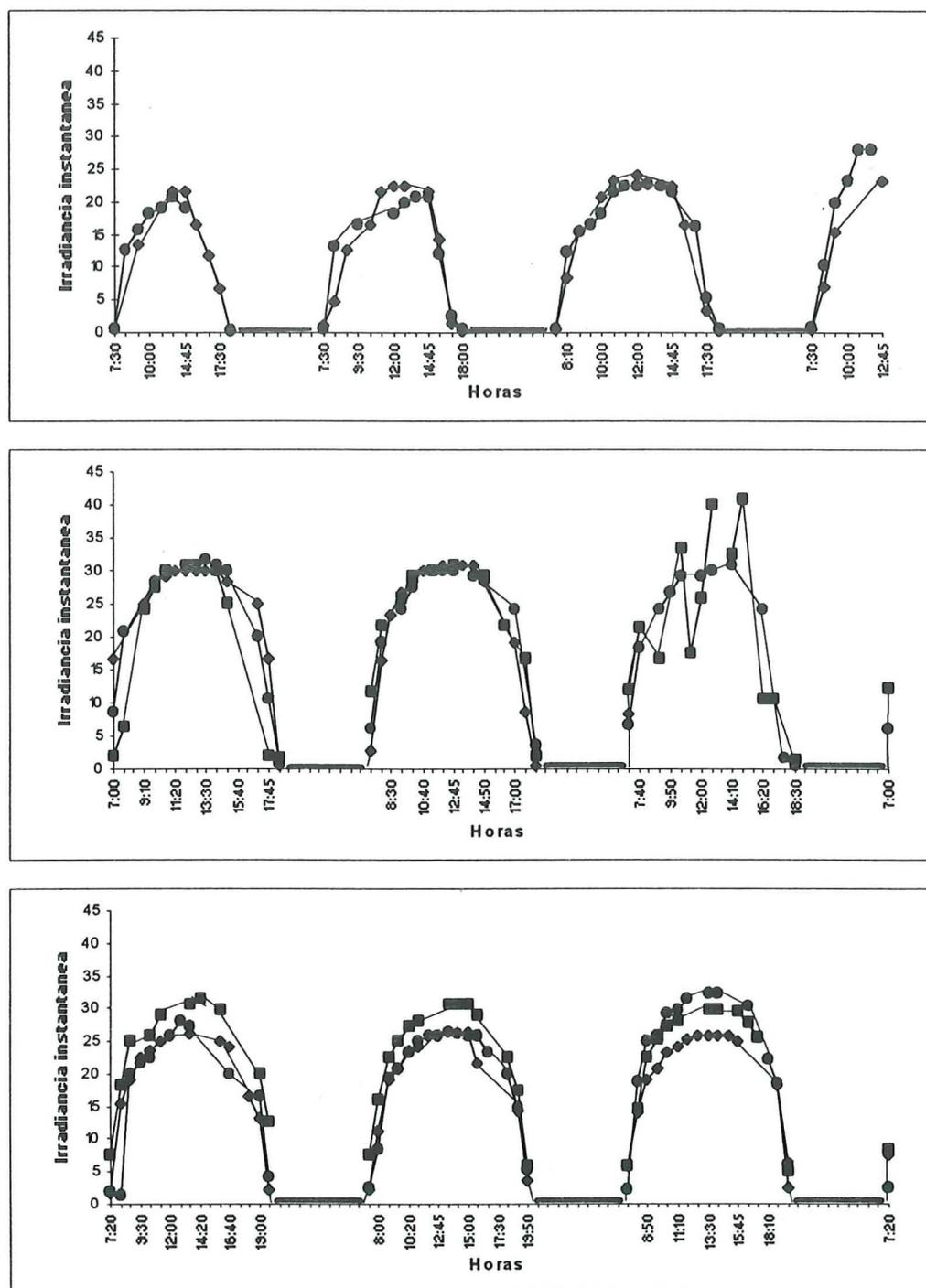


Figura 4. Variación de la irradiancia instantanea registrada ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en diferentes horas del día a través de cada uno de los experimentos en la estación de: a) invierno, b) primavera y c) verano. Experimento 1(♦); experimento 2(●) y experimento 3(■). Las líneas gruesas en el eje del tiempo indican períodos de obscuridad, ya que este eje no es continuo.

III . 2. CULTIVOS

En la estación de primavera se registraron los máximos valores de concentración celular promedio, seguida por el verano y finalizando con los valores de invierno, que fueron los de menor magnitud (Figura 5). Es posible observar que en los tres casos, a partir del primer período de obscuridad (24 horas de cultivo), las producciones celulares de los sistemas de cultivos con fotobiorreactor aumentan más rápidamente que en las columnas sencillas probablemente por efecto de la mayor exposición a la luz debido a su mayor área.

En los períodos de obscuridad, la diferencia en el número de células, tiende a decrecer o a permanecer constante, para volver a incrementarse durante el nuevo período de luz. Este efecto en el crecimiento es contrario al reportado por Borbón Muñoz y Victoria Gallardo (1996) y Tinoco Villa (1996), quienes no encontraron diferencias en la tasa de crecimiento entre período diurno y nocturno.

En lo que se refiere al peso seco orgánico, la producción final fue mayor en primavera que en verano y la mínima se obtuvo en invierno. En los sistemas con fotobiorreactor se notó un crecimiento discontinuo en la biomasa, con un notorio incremento durante los períodos de luz y con una tendencia más marcada a disminuir durante las noches del verano que en las de primavera, de forma tal que la producción en términos de biomasa resultó mayor alrededor de las 60 horas de cultivo, antes del comienzo del último período de obscuridad.

Por otro lado, la biomasa en los sistemas convencionales siguió aumentando durante el último período nocturno, lo que explica la pequeña diferencia entre la cantidad de biomasa final producida en ambos sistemas a las 72 horas de cultivo (Figura 6).

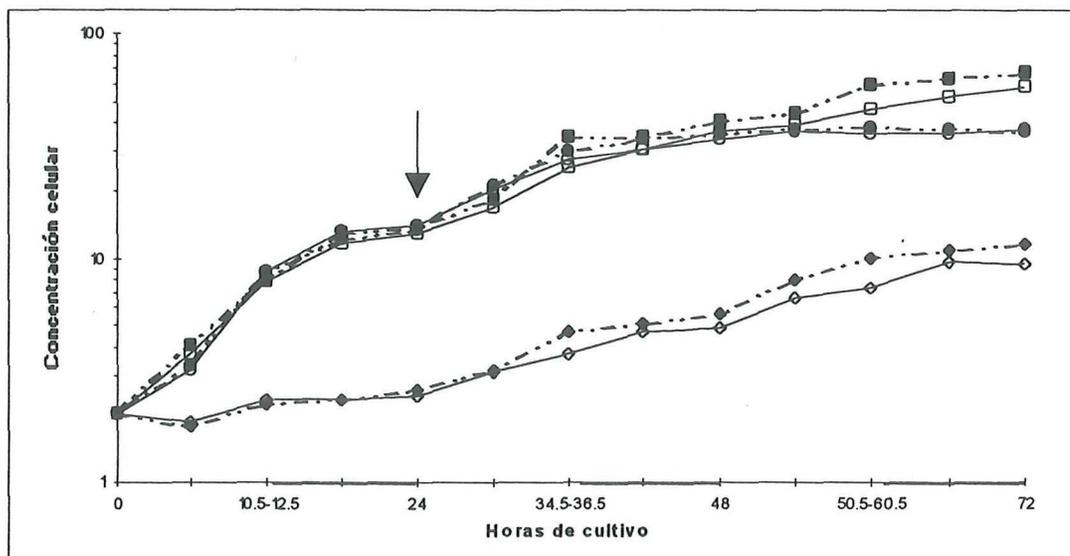


Figura 5. Curvas de crecimiento promedio (10^5 cel ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, usando el sistema en cultivos con fotobiorreactor (FBR) y tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V): I-S (\diamond); I-FBR (\blacklozenge); Pr-S (\square); Pr-FBR (\blacksquare); V-S (\circ) y V-FBR (\bullet). La flecha indica cuando se prendió la bomba del FBR. Las líneas gruesas indican períodos de obscuridad.

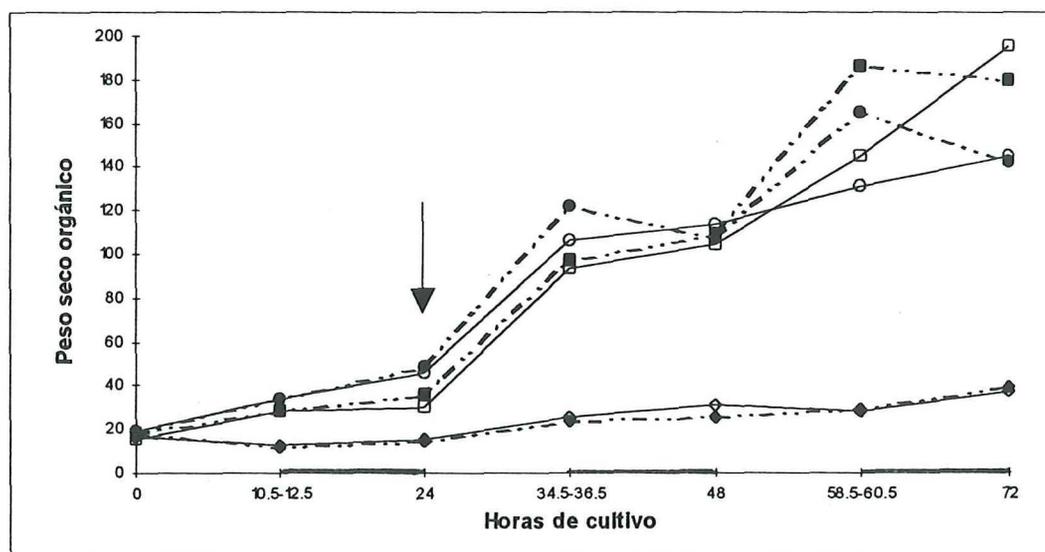


Figura 6. Curvas de crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri*, en mg l^{-1} de peso seco orgánico, en cultivos con fotobiorreactor (FBR) y tradicionales (S), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V): I-S (\diamond); I-FBR (\blacklozenge); Pr-S (\square); Pr-FBR (\blacksquare); V-S (\circ) y V-FBR (\bullet). La flecha indica cuando se prendió la bomba del FBR. Las líneas gruesas indican períodos de obscuridad.

III. 2. 1 CULTIVOS DE INVIERNO

La producción celular promedio final de ambos sistemas en número de células fue alrededor de 100×10^4 cel ml^{-1} (Tabla IV), concentración ligeramente menor a la reportada para invierno por Tinoco Villa (1996) en sistemas similares (sencillos) al exterior, cosechados a las 48 horas.

Las diferencias entre los sistemas de cultivo empezaron a observarse entre las 53.25-58.5 horas de cultivo, siendo confirmadas al final de los experimentos. En ambos casos las concentraciones fueron significativamente mayores ($P < 0.0001$) en el sistema con fotobiorreactor y de hecho no se observaron diferencias entre la producción final del sistema convencional y la obtenida de 13 a 20 horas antes con el sistema con fotobiorreactor (Tabla IV).

La hora de cultivo inicial no tuvo ningún efecto aparente sobre el crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en estos experimentos, ya que no se notaron diferencias entre las producciones celulares a las 48 y 72 horas desde el tiempo del inóculo, que tuvo lugar en horas diferentes en los dos experimentos realizados en este período (Tabla IV).

En términos de biomasa orgánica, la producción final varió entre los 38 y 39.7. mg l^{-1} con un promedio de 38.84mg l^{-1} (Tabla V), y el registrado a las 48 horas de cultivo (28.57mg l^{-1}) fue de cerca del 27% inferior al reportado por Tinoco Villa (1996). Cuando se compararon cultivos de la misma edad, las producciones de los sistemas fueron diferentes a las 48 horas de cultivo ($P < 0.0001$) y se pudo observar que el sistema con fotobiorreactor a las 53.25 y 58.5 horas de cultivo, no difiere del sistema tradicional.

Por otro lado, es necesario hacer notar que los resultados de este análisis pudieron ser sesgados por la diferencia en número de horas de luz desde el inóculo hasta los momentos de la cosecha intermedia y final y al diferente comportamiento del crecimiento en biomasa durante la noche en los sistemas convencionales y con fotobiorreactor; esta es la causa más probable de los altos valores de la desviación estandar calculados para la

Tabla IV. Valores promedio y promedio total de la concentración celular (10^4 cel ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, mantenido en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a < b < c < d$.

| No. de Exp | HORA | FOTOBIOREACTOR | | SENCILLO | |
|--------------|--------------|-----------------------------|----------|----------------------------|----------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | 49.4 ± (4.65) | | 49.5 ± (6.05) | |
| 2 | 48 | 62.9 ± (7.34) | | 49.3 ± (3.78) | |
| Prom. total. | 48 | 56.2 ± (9.21) ^a | | 49.4 ± (4.51) ^a | |
| 1 | 53.25 | 89.9 ± (11.28) | | 78.1 ± (3.45) | |
| 2 | 58.5 | 83.7 ± (8.29) | | 61.0 ± (9.26) | |
| Prom. total. | 53.25 y 58.5 | 86.8 ± (9.48) ^c | | 69.6 ± (11.2) ^b | |
| 1 | 72 | 123.0 ± (25.5) | | 92.0 ± (2.76) | |
| 2 | 72 | 111.0 ± (5.51) | | 96.8 ± (4.64) | |
| Prom. total. | 72 | 116.0 ± (14.9) ^d | | 94.8 ± (4.43) ^c | |

Tabla V. Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico ($mg\ l^{-1}$) de *Chaetoceros muelleri*, mantenidos en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Dunn, después de aplicar un análisis de varianza de de una vía por rangos (prueba de Kruskal Wallis) ($\alpha = 0.05$). $a < b$.

| Estación | Hora de cultivo | Fotobiorreactor | Sencillo | Promedio | Diferencia |
|----------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------|------------|
| Invierno | 48 | 25.6 ± (5.9) ^a | 31.5 ± (1.6) ^b | 28.57 | -5.86 |
| | 53.25 y 58.5 | 29.3 ± (9.2) ^b | 28.0 ± (9.2) ^b | 28.84 | 0.92 |
| | 72 | 39.7 ± (4.1) ^b | 38.0 ± (2.2) ^b | 38.84 | 1.69 |

cosecha intermedia, que resulta del haber combinado los dos experimentos de invierno que, como ya se ha mencionado, fueron iniciados a diferentes horas del día.

Los valores promedio finales del peso seco orgánico normalizado (P.S.O.N.) a un millón de células ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de ambos sistemas, fue de alrededor de $3.80 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$. El máximo valor se registró en el sistemas sencillo a las 48 horas, pero no se encontraron diferencias entre las producciones de ambos sistemas a una misma hora de cultivo. Además los P.S.O.N. en el sistema con el fotobiorreactor a las 48; 53.25 - 58.5 y 72 horas de cultivo no fueron significativamente diferentes al valor final del sistema convencional ($P = 0.1794$) (Tabla VI).

El porcentaje de ceniza promedio final (72 hrs) fluctuó alrededor de un 50% (Tabla VII), aún cuando los mayores porcentajes se obtuvieron a las 48 horas de cultivo y en las muestras inmediatamente sucesivas en el sistema sencillo; además los porcentajes del sistema convencional fueron en general mayores que los del fotobiorreactor.

Estos porcentajes, en especial los de las muestras intermedias, son relativamente elevados en comparación con los reportados para esta y otras especies cercanas (López Elías y Voltolina, 1993; Cordero Esquivel *et al.*, 1993 y Tinoco Villa, 1996), lo cual pudiera deberse a la presencia de material inorgánico acarreado por los vientos que prevalecen en esta región.

Tabla VI. Valores promedio del peso seco orgánico normalizado (10^{-2} mg \cdot 10^6 cel) de *Chaetoceros muelleri*, mantenido en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de invierno a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori deDunn, después de aplicar un análisis de varianza de una vía por rangos (prueba Kruskal Wallis) ($\alpha = 0.05$) a los datos transformados a logaritmo natural. $a \leq ab \leq b$.

| No. de Exp | HORA | FOTOBIORREACTOR. | SENCILLA |
|-------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | — | — |
| 2 | 48 | 4.15 \pm (0.72) | 6.37 \pm (0.59) |
| Prom. total | 48 | 4.15 \pm (0.72) ^{ab} | 6.37 \pm (0.59) ^b |
| 1 | 53.23 | 2.97 \pm (0.63) | 4.35 \pm (0.70) |
| 2 | 58.5 | 3.59 \pm (1.25) | 4.58 \pm (1.01) |
| Prom. total | 53.23 y 58.5 | 3.33 \pm (1.05) ^a | 4.47 \pm (0.84) ^{ab} |
| 1 | 72 | 3.48 \pm (0.26) | 4.11 \pm (0.43) |
| 2 | 72 | 3.38 \pm (0.17) | 3.99 \pm (0.21) |
| Prom. total | 72 | 3.43 \pm (0.22) ^a | 4.07 \pm (0.35) ^{ab} |

Tabla VII. Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para *Chaetoceros muelleri*, mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de invierno a diferente hora de cultivo.

| Estación | Hora de cultivo | FOTOBIORREACTOR | | SENCILLA | |
|----------|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. |
| Invierno | 0 | 44.59 \pm (8.51) | 55.40 \pm (8.53) | 46.10 \pm (13.44) | 53.93 \pm (13.41) |
| | 48 | 69.07 | 30.93 | 66.94 | 33.06 |
| | 53.25 y 58.5 | 50.62 \pm (17.0) | 49.40 \pm (17.02) | 67.24 \pm (2.32) | 32.78 \pm (2.35) |
| | 72 | 53.23 \pm (23.52) | 46.77 \pm (23.52) | 49.66 \pm (34.16) | 50.35 \pm (34.16) |

III. 2. 2. CULTIVOS DE PRIMAVERA

La concentración celular promedio final fue de entre 588 a 677 x 10⁴ cel ml⁻¹ (Tabla VIII); estos valores así como los obtenidos a las 48 horas, fueron superiores a los reportados por Tinoco Villa (1996) a las 48 horas de cultivo en esta misma estación del año.

Las producciones celulares de los sistemas empezaron a diferir significativamente a las 59.5 horas de cultivo y fueron superiores (133 x 10⁴ cel ml) en el sistema con fotobiorreactor; además, estas no resultaron diferentes en forma significativa de la obtenida en el sistema convencional 12.5 horas después (Tabla VIII).

En el caso del sistema con fotobiorreactor el aumento de la concentración celular durante el período nocturno fue de poco más de medio millón de células y la diferencia con los valores encontrados al finalizar el tercer período de luz no resultó significativa, indicando que los cultivos del fotobiorreactor estaban listos para la cosecha cerca de 12 horas antes de los mantenidos en los sistemas tradicionales.

La producción promedio final en P.S.O. fue aproximadamente de 190 mg l⁻¹ (Tabla IX), y al igual que la producción a las 48 horas de cultivo, fue mayor que los valores reportados para primavera por Tinoco Villa (1996).

No se encontró diferencia significativa entre ambos sistemas a una misma hora de cultivo; además como en el caso de la concentración celular no hubo diferencias significativas entre la producción del sistema con fotobiorreactor a las 59.5 horas, con la producción del sistema sencillo 12.5 horas después (Tabla IX).

El valor promedio final del peso seco orgánico normalizado de ambos sistemas fue alrededor de 2.95 X 10⁻² mg x10⁶ cel (Tabla X). La diferencia significativa que se encontró entre los P.S.O.N de ambos sistemas fue a la hora de la cosecha final, cuando el sistema sencillo presentó el valor más alto. Sin embargo no se encontraron diferencias entre este valor y el reportado en el sistema con fotobiorreactor 12.5 horas antes.

Tabla VIII. Valores promedio y promedio total de la concentración celular (10^4 cel ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de primavera a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b < c$.

| No. de Ex | HORA | FOTOBIORREACTOR | SENCILLO |
|-------------|------|----------------------------|---------------------------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | 485 ± (36.4) | 419 ± (34.9) |
| 2 | 48 | 327 ± (29.5) | 337 ± (31.4) |
| 3 | 48 | 418 ± (62.9) | 355 ± (44.9) |
| Prom. total | 48 | 410 ± (79.1) ^{ab} | 371 ± (49.5) ^a |
| 2 | 59.5 | 549 ± (79.8) | 461 ± (64.4) |
| 3 | 59.5 | 646 ± (48.6) | 467 ± (23.6) |
| Prom. total | 59.5 | 597 ± (79.6) ^c | 464 ± (43.5) ^b |
| 2 | 72 | 637 ± (113) | 574 ± (41.4) |
| 3 | 72 | 717 ± (33.7) | 601 ± (67.3) |
| Prom. total | 72 | 677 ± (86.6) ^c | 588 ± (52.1) ^c |

Tabla IX. Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico (mg l^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, mantenidos en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), en la estación de primavera a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Dunn, después de aplicar un análisis de varianza de una vía ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b$.

| Estación | Hora de cultivo | Fotobiorreactor | Sencillo | Promedio | Diferencia |
|-----------|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------|------------|
| Primavera | 48 | 109.6 ± (24) ^a | 104.0 ± (27) ^a | 106.5 | 5 |
| | 59.5 | 186.0 ± (21) ^b | 145.0 ± (16) ^{ab} | 165.5 | 41 |
| | 72 | 180.0 ± (23) ^b | 195.0 ± (33) ^b | 187.5 | -15 |

Tabla X. Valores promedio del peso seco orgánico normalizado (10^{-2} mg \cdot 10^6 cel) de *Chaetoceros muelleri*, en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de primavera a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b$.

| No. de Exp | HORA | FOTOBIORREACTOR | SENCILLA |
|-------------|------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | 2.81 \pm (0.16) | 3.20 \pm (0.25) |
| 2 | 48 | 2.30 \pm (0.16) | 2.14 \pm (0.30) |
| 3 | 48 | 2.83 \pm (0.27) | 3.08 \pm (0.37) |
| Prom. total | 48 | 2.67 \pm (0.33) ^a | 2.80 \pm (0.57) ^a |
| 2 | 59.5 | 3.14 \pm (0.27) | 2.86 \pm (0.35) |
| 3 | 59.5 | 2.84 \pm (0.34) | 3.40 \pm (0.36) |
| Prom. total | 59.5 | 2.95 \pm (0.34) ^{ab} | 3.11 \pm (0.44) ^{ab} |
| 2 | 72 | 2.88 \pm (0.18) | 3.89 \pm (0.36) |
| 3 | 72 | 2.33 \pm (0.34) | 2.89 \pm (0.59) |
| Prom. total | 72 | 2.55 \pm (0.39) ^a | 3.34 \pm (0.70) ^b |

El valor promedio final del porcentaje de cenizas en ambos sistemas fue de 46.7 % y de manera general, el sistema sencillo registró los valores mayores (Tabla XI). Como en el invierno, los porcentajes de sustancia inorgánica se encontraron cerca del límite superior del reportado para diatomeas céntricas (Brown, 1991), aunque se nota que los valores de primavera son ligeramente menores de los que se registraron en el invierno.

Tabla XI. Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para *Chaetoceros muelleri*, mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de primavera a diferentes horas de cultivo.

| Estación | Hora de cultivo | FOTOBIORREACTOR | | SENCILLO | |
|-----------|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. |
| Primavera | 0 | 63.74 ± (6.87) | 36.26 ±(23.52) | 63.08 ±(5.73) | 36.92 ±(5.73) |
| | 48 | 43.53 ±(17.02) | 56.47 ±(17.02) | 52.75 ±(7.00) | 47.25 ±(7.00) |
| | 59.5 | 46.61 ±(14.10) | 53.39 ±(14.01) | 48.05 ±(7.82) | 51.95 ±(7.82) |
| | 72 | 47.47 ±(1.47) | 52.53 ±(1.47) | 45.93 ±(13.09) | 54.08 ±(13.09) |

III. 2. 3. CULTIVOS DE VERANO

La concentración celular promedio final de ambos sistemas en el verano, estuvo alrededor de los 380×10^4 cél ml⁻¹ (Tabla XII) y tanto esta producción, como la registrada a las 48 horas de cultivo, fueron mayores que las reportadas por Borbón Muñoz y Victoria Gallardo (1996) en el verano de 1995.

La producción de células no fue diferente entre los sistemas al compararlos a una misma hora de cultivo y tampoco se observó diferencia entre los valores registrados en el sistema con fotobiorreactor y en el sistema convencional 11.5 y 24 horas después de las primeras 48 horas de cultivo.

El peso seco orgánico promedio al final del cultivo fue de poco más de 140 mg l⁻¹ (Tabla XIII) y, al igual que el valor obtenido a las 48 horas de cultivo, fue mayor al reportado por Borbón Muñoz y Victoria Gallardo (1996).

Contrariamente a lo que se observó en la primavera, cuando se notó una correspondencia entre las variaciones del peso seco por unidad de volumen y la concentración celular, que indicaba una relativa constancia del peso celular unitario, en el verano el número de células por unidad de volumen quedó aproximadamente constante pero fue acompañada por cambios de la cantidad de biomasa (P.S.O.) en ese mismo volumen, pero estos fueron poco evidentes y de hecho no significativos en el sistema convencional, pero claramente indicativos de un aumento del peso celular en los cultivos del fotobiorreactor en el período de luz transcurrido entre las 48 y 60 horas de cultivo, seguida por una leve disminución durante el último período nocturno (Tabla XIII).

Esto queda confirmado en la Tabla XIV, en la cual resulta evidente la relativa constancia del peso unitario de las células (P.S.O.N.) cultivadas en el sistema tradicional y los cambios que se mencionaron en el peso orgánico celular en el fotobiorreactor.

Tabla XII. Valores promedio y promedio total de la concentración celular (10^4 cél ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, en los diferentes sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para los experimentos de verano a diferentes horas de cultivo. Se aplicó un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). Las letras a indican la igualdad entre las producciones de los sistemas.

| No. de Exp | HORA | FOTOBIORREACTOR | SENCILLO |
|--------------|------|---------------------------|---------------------------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | 321 ± (12.2) | 299 ± (38.1) |
| 2 | 48 | 411 ± (7.51) | 352 ± (16.7) |
| 3 | 48 | 367 ± (16.2) | 380 ± (28.6) |
| Prom. total. | 48 | 366 ± (44.0) ^a | 343 ± (43.8) ^a |
| 1 | 60.5 | 431 ± (63.6) | 396 ± (41.9) |
| 2 | 60.5 | 401 ± (24.7) | 386 ± (27.6) |
| 3 | 60.5 | 334 ± (34.4) | 303 ± (29.7) |
| Prom. total. | 60.5 | 389 ± (57.3) ^a | 362 ± (53.1) ^a |
| 1 | 72 | 432 ± (33.7) | 451 ± (8.33) |
| 2 | 72 | 367 ± (34.7) | 367 ± (5.29) |
| 3 | 72 | 322 ± (18.8) | 328 ± (62.5) |
| Prom. total. | 72 | 374 ± (54.7) ^a | 382 ± (62.9) ^a |

Tabla XIII. Valores promedio, diferencia y promedio total del peso seco orgánico ($mg\ l^{-1}$) de *Chaetoceros muelleri*, mantenidos en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a distintas horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab \leq b \leq bc \leq c$.

| Estación | Hora de cultivo | Fotobiorreactor | Sencillo | Promedio | Diferencia |
|----------|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------|------------|
| Verano | 48 | 107.0 ± (38) ^a | 114.0 ± (40) ^a | 110.5 | -7 |
| | 60.5 | 165.0 ± (27) ^c | 131.0 ± (32) ^{ab} | 148.0 | 34 |
| | 72 | 142.0 ± (27) ^{bc} | 145.0 ± (32) ^{bc} | 143.5 | -3 |

Tabla XIV. Valores promedio del peso seco orgánico normalizado (10^{-2} mg \cdot 10^6 cel) de *Chaetoceros muelleri*, en los dos sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a diferentes horas de cultivo. Las letras indican diferencias significativas encontradas con la prueba a posteriori de Student Newman Keuls, después de aplicar un análisis de varianza de dos vías ($\alpha = 0.05$). $a \leq ab$ y $b \leq bc \leq c$.

| No. de Exp | HORA | FOTOBIORREACTOR. | SENCILLA |
|-------------|------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | PROMEDIO | PROMEDIO |
| 1 | 48 | 2.72 \pm (0.34) | 2.70 \pm (0.61) |
| 2 | 48 | 3.81 \pm (0.89) | 4.57 \pm (0.69) |
| 3 | 48 | 2.33 \pm (0.32) | 2.41 \pm (0.38) |
| Prom. total | 48 | 2.93 \pm (0.80) ^a | 3.31 \pm (1.15) ^{ab} |
| 1 | 60.5 | 4.37 \pm (0.75) | 4.04 \pm (0.38) |
| 2 | 60.5 | 4.51 \pm (0.59) | 4.06 \pm (0.38) |
| 3 | 60.5 | 4.14 \pm (0.53) | 3.25 \pm (0.52) |
| Prom. total | 60.5 | 4.46 \pm (0.61) ^c | 3.72 \pm (0.58) ^{bc} |
| 1 | 72 | 3.79 \pm (0.43) | 3.54 \pm (0.29) |
| 2 | 72 | 3.98 \pm (0.91) | 4.44 \pm (0.49) |
| 3 | 72 | 3.70 \pm (0.63) | 3.19 \pm (1.01) |
| Prom. total | 72 | 3.82 \pm (0.65) ^{bc} | 3.74 \pm (0.78) ^{bc} |

El porcentaje de la ceniza disminuyó en forma aproximadamente igual en el sistema tradicional, desde cerca del 55% al momento del inóculo hasta cerca del 38%. En el caso del fotobiorreactor, después de una disminución inicial de las cenizas, se observa un aumento en la última hora de cultivo, debido a que en el último período de oscuridad se registró una disminución del porcentaje de sustancia orgánica, con un consiguiente ligero aumento en el contenido inorgánico de la biomasa (Tabla XV).

Tabla XV. Valores promedio del porcentaje de cenizas y del peso seco orgánico para *Chaetoceros muelleri*, mantenido en los sistemas de cultivo (sencillo y con fotobiorreactor), para la estación de verano a distintas horas de cultivo.

| Estación | Hora de cultivo | FOTOBIORREACTOR | | SENCILLO | |
|----------|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. | % Promedio de Ceniza | % Promedio del P.S.O. |
| Verano | 0 | 54.76 ±(6.31) | 45.24 ±(6.31) | 55.71 ±(6.51) | 44.29 ±(6.51) |
| | 48 | 47.34 ±(10.81) | 52.66 ±(10.81) | 46.15 ±(12.55) | 53.85 ±(12.55) |
| | 60.5 | 39.70 ±(13.25) | 60.30 ±(13.25) | 42.71 ±(8.23) | 57.29 ±(8.23) |
| | 72 | 43.97 ±(11.16) | 56.03 ±(2.55) | 38.01 ±(13.93) | 61.99 ±(13.93) |

III. 2.4. DIFERENCIAS ESTACIONALES

En las secciones anteriores se hicieron notar repetidamente las diferencias de la producción, tanto en el número de células y en la cantidad de la biomasa orgánica cosechable, en las tres situaciones estacionales en las que se realizaron nuestros experimentos. A la vez se hizo notar que, aún cuando por lo general el uso del fotobiorreactor no representa una ventaja significativa o importante en términos de producción con los ciclos de tres días que son los utilizados rutinariamente en varios de los laboratorios comerciales, el fotobiorreactor puede considerarse de toda forma más productivo que el sistema convencional, debido a que alcanza la máxima producción celular y de biomasa en un menor tiempo.

Las diferencias entre los sistemas se hicieron más notorias cuando la producción fue normalizada por la irradiancia acumulada durante el desarrollo de cada cultivo y por unidad de tiempo, expresada como número de células producidas en ambos sistemas, por unidad de irradiancia (mol) y por la edad del cultivo (hora).

En la tabla XVI, se resumen los resultados de estos cálculos, referidos a el número de células producidas en promedio en una de estas unidades de cultivo (columna de 300 l con 270 litros de cultivo), por mol por hora, durante cada uno de los intervalos de tiempo utilizado para el cálculo de la producción de los dos sistemas.

En esta tabla se observa que durante la estación de invierno, la producción normalizada de esta manera fue la más baja que se registró en las tres estaciones consideradas. Según esta normalización y considerando que la poca diferencia en la duración de exposición a la luz y en la cantidad de energía radiante recibida en el invierno con respecto a las otras estaciones no puede ser un factor decisivo, pero se puede considerar que el motivo más probable de la baja productividad de ambos sistemas fue la baja temperatura ambiental y de los cultivos, que está relacionada a una baja eficiencia en la utilización de la energía luminosa (Darley, 1987), y a que la cantidad de irradiancia acumulada tiene una importancia menor. Sin embargo, se puede observar que según esta normalización, en esta estación es cuando se encuentran las mayores diferencias de producción entre sistemas.

En la primavera y en el verano, la producción celular por cada molécula de luz recibida durante el período de cultivo hasta el momento de la cosecha, fue de cerca de un orden de magnitud mayor que en invierno, probablemente debido a que las temperaturas fueron más favorables para una mejor utilización de la energía radiante capturada. El hecho de que en verano la producción no haya sido superior refleja en parte que la irradiancia acumulada no fue muy diferente en las dos situaciones estacionales. Al contrario, la producción final en verano fue ligeramente inferior, posiblemente debido a una aceleración de los procesos metabólicos por el aumento de la temperatura durante ese período, causando un descenso en la eficiencia de utilización de la energía radiante (Darley, 1987).

Tabla XVI. Valores promedio de la irradiancia acumulada (mol m^{-2}), valores promedio normalizados ($10^{13} \text{ cel} \cdot 270 \text{ l} \cdot \text{mol} \cdot \text{horas}$) y el porcentaje de la diferencia entre los sistemas de cultivo de *Chaetoceros muelleri*, mantenido en diferentes estaciones y horas de cultivo.

| Estación | Horas de luz al día | Edad de cultivo | mol m^{-2} | FOTOBIOREACTOR | | SENCILLO | DIFERENCIA % |
|-----------|---------------------|-----------------|---------------------|--|--|--|--------------|
| | | | | $10^{13} \text{ cel}/270 \text{ l}/\text{mol}/\text{hr}$ | $10^{13} \text{ cel}/270 \text{ l}/\text{mol}/\text{hr}$ | $10^{13} \text{ cel}/270 \text{ l}/\text{mol}/\text{hr}$ | |
| Invierno | 10.5 | 48 | 118 | 2.79 | | 2.02 | 27.60 |
| | 10.5 | 72 | 182 | 11.62 | | 7.96 | 31.50 |
| Primavera | 11.5 | 48 | 196 | 44.43 | | 37.79 | 14.94 |
| | 11.5 | 72 | 287 | 124.34 | | 94.96 | 23.63 |
| Verano | 12.5 | 48 | 200 | 45.73 | | 38.01 | 16.88 |
| | 12.5 | 72 | 315 | 75.82 | | 66.19 | 12.70 |

III.3. CONSIDERACIONES GENERALES

En algunas granjas acuícolas la producción de microalgas es realizada tradicionalmente en cultivos masivos bajo condiciones controladas, pero recientemente se está haciendo común el cultivo en condiciones semicontroladas en invernaderos o en solarios y hasta al exterior, en donde por lo general no existe la posibilidad de controlar las distintas variables que influyen de forma directa o indirecta sobre los procesos fisiológicos de las microalgas (Dubinsky *et al.*, 1996).

La luz es una de las variables medio ambientales de importancia fundamental para el fitoplancton, ya que dependiendo de la intensidad de la luz, de su calidad y del período de exposición, se producen modificaciones substanciales en la velocidad de crecimiento y en la composición proximal de las algas.

El autosombreado es uno de los principales factores de limitación que se presenta en los cultivos de microalgas, cuyo efecto se incrementa al mismo ritmo que la concentración celular, resultando en una limitación de luz, la cual a su vez reduce la tasa de crecimiento de estos organismos (Vonshak y Richmond, 1985).

Debido al autosombreado dentro de un cultivo de fitoplancton, el crecimiento de las microalgas y la productividad de un sistema son directamente dependientes de la cantidad de luz que llega a la superficie de los cultivos. Este efecto directo depende hasta cierto punto del régimen de luz, el cual relaciona la frecuencia de exposición de las células presentes en el cultivo, al máximo flujo de fotones disponible en la zona fótica del bioreactor, así como a la duración o tiempo de dicha exposición (Quiang y Richmond, 1994).

Por lo anterior, el objetivo en los sistemas masivos al exterior debe ser la utilización eficiente de la irradiancia y para esto se han buscado diferentes métodos y técnicas, con la finalidad de aumentar la concentraciones celular, mejorando su régimen de exposición a la luz.

En los cultivos abiertos, algunas soluciones que han permitido una disminución del efecto del autosombreado, han sido el disminuir el espesor de la columna de agua para lograr una mejor penetración de la luz, así como el mejoramiento de los procesos de

mezcla del cultivo, para aumentar la frecuencia de exposición a la luz en la zona fótica (Oswald, 1988 y Richmond, 1987).

Aún cuando estas soluciones han ayudado en menor o mayor grado a incrementar la producción en dichos sistemas, éstos no igualan las altas producciones que se han reportado en sistemas cerrados, específicamente en los fotobiorreactores (Tredici y Materassi, 1992; Torzillo *et al.*, 1986; Tredici *et al.*, 1993), en los cuales generalmente se manejan las densidades de cultivo con diluciones continual o periódicas, con la finalidad de obtener tasas máximas de crecimiento a una determinada cantidad de luz y así disminuir el efecto del autosombreado (Vonshak y Richmond, 1985; Oswald, 1988). Esto generalmente no ocurre en los sistemas abiertos tradicionales, que consisten en cultivos de tipo estático, en los cuales no existe control de los factores limitantes. Además, los sistemas cerrados se diseñan para aumentar el régimen de luz, principalmente mejorando la relación área - volumen y promoviendo la circulación del cultivo, que puede ser continua o semicontinua y lo cual no se alcanza fácilmente en cultivos de tipo estático (Tredici y Materassi, 1992).

Las características del sistema con fotobiorreactor empleado en Bahía Kino tratan de combinar y disminuir algunos factores que limitan el eficiente uso de la cantidad de luz solar por las microalgas cultivadas en sistemas abiertos al exterior.

Como ya se hizo mención, el sistema con fotobiorreactor empleado en estos experimentos se considera un sistema cerrado, con un aumento de su relación área - volumen y con una mejor circulación del sistema, a semejanza de los otros fotobiorreactores; sin embargo, el sistema permite un intercambio de gases con la atmósfera, lo cual es una enorme ventaja con respecto a los sistemas totalmente cerrados.

En este caso el aumento del área de exposición del sistema con fotobiorreactor, aunque puede considerarse relativamente pequeño con respecto a la del área del sistema convencional (13.23%), consigue un incremento en la cantidad de energía recibida, que repercutió en el aumento de la producción, en células y en mg l^{-1} , sobre todo después de las 24 hrs del uso del fotobiorreactor. La mayor disponibilidad de luz a las células se da cuando estas pasan a través del fotobiorreactor, dándoles oportunidad de tener una mayor cantidad de luz por algún tiempo (1 minuto) varias veces al día (en

promedio 51.1 veces al día), favoreciendo al régimen de luz y disminuyendo por lo tanto el fenómeno del autosombreado dentro del fotobiorreactor, lo cual ofrece una ventaja sobre el sistema de columna convencional.

En cuanto a la circulación del cultivo, el sistema con fotobiorreactor facilita una mejor mezcla dentro de la columna, ayudando a una mejor distribución de las células en el cultivo y por lo tanto reduciendo el efecto de la limitación de la luz, lo cual en un cultivo tiene un mayor efecto sobre el crecimiento de las células, que aquellas variaciones causadas por el cubrimiento de nubes o por las estaciones del año (Uncles y Join, 1983).

Hay que recordar que la especie cultivada, *Chaetoceros muelleri*, es un organismo costero, adaptado para utilizar lo más eficientemente posible la luz disponible en breves períodos de tiempo, debido a los continuos procesos turbulentos en la columna de agua que existen en estos sistemas naturales (Brand y Guillard, 1981). Por lo tanto el sistema con fotobiorreactor, al aumentar la exposición a la luz, aunque por breves períodos de tiempo, favorece el crecimiento de este organismo.

Otro factor que limita de manera importante el crecimiento y producción de los cultivos es la temperatura, debido a la fuerte relación existente entre ésta y la actividad biológica de los organismos, así como por la no menos importante interacción de ésta con la cantidad de irradiancia y el fotoperíodo (Richmond, 1986; Darley, 1987; South y Whittick, 1987).

Las variaciones diarias y estacionales que registra la temperatura (sin contar las latitudinales), ha sido uno de los mayores problemas con los que se enfrenta la producción de cultivos al exterior en sistemas abiertos y cerrados, pues en ambos se presenta un amplio intervalo de variación en el transcurso del día y del año, siendo más amplia en los sistemas abiertos y menor en los sistemas cerrados y este cambio también depende del volumen de cultivo utilizado. Aunque la variación de temperatura en los fotobiorreactores sea menor, las producciones de estos sistemas se ven afectadas principalmente por las altas temperaturas que se pueden llegar a registrar en los cultivos, sobre todo en los meses más cálidos del año. Otro problema que se observa en los fotobiorreactores, es que en estos se presenta una acumulación de oxígeno formado fotosintéticamente, la cual constituye el problema principal de estos sistemas (Tredici y Materassi, 1992).

En nuestro sistema con fotobiorreactor se presentó el mismo problema que se presenta en un sistema abierto, en cuanto a la amplia variación de temperatura, debido al pequeño incremento del área que permite el intercambio de calor con la atmósfera, que no es muy diferente de la superficie de un sistema tradicional.

El principal efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa en el sistema con fotobiorreactor se registró estacionalmente, observándose que el uso del fotobiorreactor tuvo un efecto positivo en el incremento de la concentración celular durante el invierno y la primavera y que con las temperaturas elevadas no se obtuvieron diferencias en la producción.

En la primavera el uso de ese sistema, pudo elevar la producción en un 50% (a las 48 horas de cultivo) en comparación a las concentraciones reportadas por Tinoco Villa (1996) para cultivos de la misma edad y en un 20 % con respecto a las obtenidas en este trabajo con el sistemas tradicional a las 58.5 horas de cultivo. Este aumento en los valores de la producción del sistema con fotobiorreactor fueron el resultado de la interacción de varios factores, entre los cuales la temperatura, el régimen de iluminación y la circulación o mezcla del cultivo, se combinaron para dar condiciones adecuadas para el buen desarrollo de *Chaetoceros muelleri*.

Aún cuando las producciones en invierno fueron aproximadamente un 20 % mayores en el sistema con fotobiorreactor con respecto a las del sistema tradicional (a las 58.5 y 72 horas de cultivo), las producciones fueron de todas maneras muy bajas, lo cual se puede atribuir a la baja temperatura de esta estación y a una baja eficiencia en la utilización de la intensidad luminosa. Lo anterior indica que en este caso el uso del fotobiorreactor es útil pero no es suficiente para aumentar las producciones de este sistema con respecto a las concentraciones deseables, como las que se obtienen en otros períodos del año con las columnas sencillas.

El uso del fotobiorreactor en verano, no proporcionó un beneficio en el aumento de la concentración celular con respecto al sistema sencillo, lo que en principio es probablemente debido a los altos valores de la temperatura que a un efecto de fotoinhibición, ya que según Uncles y Joint (1983) el fitoplancton no experimenta este efecto, debido a la rápida mezcla en la columna de agua que tiene como resultado que

las células estén expuestas a altas intensidades de luz solo por períodos cortos de tiempo.

El uso del fotobiorreactor en las estaciones de invierno y primavera favoreció también la reducción en los tiempos de producción con respecto a los del sistema convencional, los cuales disminuyen aproximadamente de 11 a 14 horas de cultivo según la estación del año. Esto último solo se puede considerar una ventaja desde el aspecto de los costos de producción, pero no desde el punto de vista práctico, pues las cosechas de estos sistemas se vendrían realizando por la tarde, mientras que en un laboratorio de producción de esta región del país las cosechas se realizan en la mañana, pero pudiera resultar interesante en cultivos en los cuales se acostumbra alimentar a los organismos en diferentes horas del día.

El patrón general de crecimiento diario que estuvo regido por el fotoperíodo, fue semejante en las tres estaciones. Aún cuando algunos autores (Chuel *et al.*, 1984; Hamma *et al.*, 1988), mencionan que ciertas especies necesitan de un fotoperíodo para sostener su crecimiento, como es el caso de *Dunaliella tertiolecta*, que continua su división celular en la noche (Cuhel *et al.*, 1984), el patrón de crecimiento de estos experimentos sugiere que *Chaetoceros muelleri* no mantiene un crecimiento sostenido bajo los fotoperíodos que se registraron en estas estaciones, aunque esto no concuerda con el patrón de crecimiento de esta misma especie registrado por Borbón Muñoz y Victoria Gallardo (1996) y Tinoco Villa (1996) en cultivos al exterior, que posiblemente se debe a la mayor frecuencia con la cual se realizaron los conteos y filtraciones durante esos experimentos, que pudieran haber puesto en evidencia tendencias no cuantificables en este trabajo.

Varios autores (Falkowski y Owens, 1980; Richmond, 1986; Ferris y Christian, 1991) han mencionado que una de las respuestas al fotoperíodo o adaptación a la luz y a la sombra, en algunos grupos de microalgas, puede manifestarse con un cambio en el volumen celular, que en este caso se vió reflejado en los valores promedio del peso seco orgánico normalizado de las tres estaciones. Aún cuando la tendencia al cambio de los valores de P.S.O.N. durante el cultivo no fue tan evidente como la que se presentó en la concentración celular y en el peso seco orgánico por unidad de volúmen, se puede observar un patrón semejante al registrado por los anteriores, debido a que en los

períodos de obscuridad o después de ellos, los valores del P.S.O.N. se incrementaban, lo que puede significar una baja tasa de división celular, ya que el P.S.O.N. está directamente relacionado con el volumen celular, el cual a su vez tiene una correlación negativa con la tasa de crecimiento (Fábregas *et al.*, 1996).

La falta de protección tuvo como consecuencia la introducción a los sistemas de material ajeno como polvo, polen e insectos, entre otros que se reflejó de manera particular en los altos porcentajes de cenizas obtenidos en las tres estaciones con respecto a los valores reportados para *Chaetoceros muelleri* o para especies similares en cultivos protegidos o de laboratorio (Brown, 1991; López Elías, 1990; López Elías y Voltolina 1996). La introducción de este material pudiera afectar las tasas de crecimiento, pues puede interferir con la transmisión de luz al cultivo aumentando su turbidez (Borowitzka, 1988).

IV. CONCLUSIONES

El uso del sistema con fotobiorreactor favoreció el crecimiento de las microalgas, con menores tiempos de producción en las estaciones de invierno y primavera en comparación con las producciones obtenidas con el sistema tradicional, lo cual puede repercutir en una disminución del costo de producción.

La mayor producción obtenida por el sistema con fotobiorreactor, se registró en primavera, seguida por la de verano y la de invierno.

Las producciones de invierno con el sistema con fotobiorreactor, fueron limitadas y la causa más probable fueron las bajas temperaturas de los cultivos, más que la cantidad de irradiancia y el fotoperíodo registrado en esa temporada. Esto no impidió que la producción del sistema con fotobiorreactor fuera mayor a la del sistema tradicional.

Las producciones del sistema con fotobiorreactor en el verano fueron probablemente limitadas por los altos valores de temperatura ya que no se midieron diferencias importantes entre los valores de irradiancia registrados en esas dos temporadas. Esto tuvo como consecuencia que los valores de producción de los fotobiorreactores fueran similares a los del sistema tradicional.

Existe una disminución del efecto de autosombreado, debido a un mejor régimen de luz con el sistema de fotobiorreactor, lo cual se reflejó en un aumento significativo en la producción de células y de peso seco orgánico en el período de las 53.5-59.5 horas de cultivo, en la producción de invierno y primavera.

Se observó que *Chaetoceros muelleri* no presenta un crecimiento constante con los fotoperíodos a los que estuvo expuesto en ambos sistemas de cultivo.

Con los datos disponibles no es todavía posible calcular si la inversión representada por el dispositivo empleado para este estudio pudiera ser económicamente rentable. En particular, sería importante ensayar con un sistema de mayores dimensiones, para aumentar la frecuencia y/o la duración de exposición a la luz en la espiral.

Con todas estas reservas, es indudable que esta modificación representa una innovación con buenas posibilidades de rentabilidad, que merece ser estudiada con

mayor detenimiento a mayor escala, a niveles compatibles con las necesidades de un laboratorio de producción comercial.

Una de las sugerencias a este trabajo es que en el sistema con fotobioreactor el suministro de CO₂ se haga directamente a la entrada de la manguera, lo cual facilitaría su mezcla y disminuiría el costo representado por este tipo de enriquecimiento.

Asimismo, se sugiere que se realicen nuevos ensayos con este sistema en otros períodos del año y experimentando con otras cepas de microalgas de interés comercial, analizando y comparando también la calidad de la biomasa que se produce con ambos sistemas.

LITERATURA CITADA

- Andersen, A. R., D. M. Jacobson y J. P. Sexton. 1991. Catalog of Strains. Provasoli - Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton. West Boothbay Harbour, Maine U.S.A. 98 pp.
- Benemann, J. R. 1989. The future of microalgal biotechnology. En: Cresswell R.C, T.A.V. Rees y N. Shah (eds.). Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Longman Scientific & Technical Press, Harlow. 317-337 p.
- Brand, L.E. y R. R. L. Guillard. 1981. The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 50: 119-132.
- Borbón Muñoz, R.E. y A. Victoria Gallardo. 1996. Producción masiva de microalgas marinas (*Chaetoceros muelleri*) en condiciones controladas y a la intemperie, durante otoño de 1994 y verano de 1995 en Bahía Kino, Sonora. Tesis Profesional. Universidad de Sonora, Depto de Ciencias Químico - Biológicas, Hermosillo, Sonora, México. 100 pp.
- Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemicals from microalgae. En: Borowitzka M. A. y L. Borowitzka. (eds.). Microalgal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 153-196 p.
- Brown, M. R. 1991. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J. Mar. Biol. Ecol. 165: 79 -99.
- Bustillos, Hurtado. C. A. y J. A. López Elías. 1994. Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento, cultivadas en medios simplificados. Oceanología. México. 1: 133-148.
- Cañizares Villanueva, R.O., C. Casas Campillo, A. R. Domínguez Bocanegra y D. Voltolina Lobina. 1994. Las microalgas en la acuicultura. Cuadernos sobre Biotecnología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México, D. F., 44 pp.
- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. J. Appl. Phycol. 5: 393-604.

- Chu, F.E., K. L.. Webb, D. A. Hepworth y M. Roberts. 1982. The acceptability and digestibility of microcapsules by larvae of *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 2: 29-34.
- Chu, F. E., K. L.. Webb, D. A. Hepworth y B. B. Casey. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. Aquaculture. 64: 185-197.
- Chuel, R. L., P. B. Ortner y D. R. S. Lean. 1984. Night synthesis of protein by algae. Limnol. Oceanogr. 29 (4): 731 - 744.
- Cordero Esquivel, B., D. Voltolina Lobina y F. Correa Sandoval. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. Comp. Biochem. Physiol. 105B: 369-373.
- Coutteau, P., P. Lavens, P. Leger y P. Sorgeloos. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. J. World Aquac. Soc. 21:1-9.
- Coutteau, P., N. Hadley, J. Manzi y P. Sorgeloos. 1991. Manipulated yeast diets as a partial algal substitute for the nursery culture of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. En: De Pauw N., J. Joyce (eds.). Aquaculture and The Environment. Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc. No. 14. 10-12 p.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. J. Shellfish Res. 11: 467-476.
- Darley, W. M. 1987. Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico. Cap. 3: 37-79. Ed. Limusa. 236 pp.
- De la Peña Nettel, G. 1991. Influencia de la turbidez sobre la producción orgánica en la región del delta del Río Colorado. U.A.B.C. Ensenada B. C. Mex. 80 pp.
- Dhert, P., R. B. Bomboe, P. Lavens y P. Sorgeloos. 1992. A simple semi flow-through culture technique for the controlled super-intensive production of *Artemia* juveniles and adults. Aquac. Eng. 11: 107-119.
- Dobbeleir, J., N. Adam y E. Bossuyt. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. En: Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels, y E. Jaspers (eds.). The Brine Shrimp *Artemia*: Ecology, Culturing. Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgica. 3: 165-174 p.

- Donaldson, J. 1991. Commercial production of microalgae at Coast Oyster Company. En: Fulks W. y K. L. Main (eds.). Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.- Asia Workshop. Argent Laboratories. Redmond, Washington. 229-236 p.
- Douillet, P. 1987. Effects of bacteria on the nutrition of brine shrimp *Artemia*, fed on dried diets. En: Sorgeloos P., D. A. Bengston, W. Declair, y E. Jaspers (eds.). *Artemia* Research and Its Applications. Universa Press. Wetteren, Belgica. 3: 295-308 p.
- Dubinsky, Z., K. Matsukawa e I. Karube. 1996. Photobiological aspects of algal mass culture. J. Mar. Biotech. (en prensa).
- Edmund, T., Y. Lee y M. J. Bazin. 1990. A laboratory scale air-lift helical photobioreactor to increase biomass output rate of photosynthetic algal cultures. New Phytol. 116:331-335.
- Fábregas, J., A. Cid, E. Morales, B. Cordero y A. Otero. 1996. Discrepancies between cell volume and organic content in semi-continuous culture of a marine microalga. Letters in Appl. Microbiol. 22: 206-208.
- Falkowski, P. G. y T. G. Owens. 1980. Light - shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. Plant Physiol. 66: 592-595.
- Ferris, J. M. y R. Christian. 1991, Aquatic primary production in relation to microalgal responses to changing light: a review. Aquatic Sciences. 53 (2,3): 189 - 213.
- Figueroa Soto, C. G. y A. S. Tapia Díaz. 1991. Efectos de medios alternativos simplificados en el crecimiento de tres especies de microalgas, comparado con un medio control. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora (UNISON), Hermosillo, Sonora. México
- Fogg, G. E. y B. Thake. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press. 269 pp.
- Fry, J. C. 1993. Biological Data Analysis: A Practical Approach. Oxford University Press. Oxford. 418 pp.
- Fulks, W. y K. L. Main. 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.- Asia Workshop. Argent Laboratories. Redmond, Washington. 364 pp.

- Geldenhuys, D. J., R. D. Walmsley y D. F. Toerin. 1988. Quality of algal material produced on fertilizer-tap water medium in outdoor plastic enclosed systems. *Aquaculture* 68: 157-164.
- Gonzalez Rodríguez, E. y Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. *Aquaculture* 36: 245-256.
- Grobbelaar, J. U. 1989. Do light-dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity?. *J. Appl. Phycol.* 1: 333-340.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Hama, T., K. Matsunaga, N. Handa y M. Takahashi. 1988. Day-night changes in production of carbohydrate and protein by natural phytoplankton population from Lake Biwa, Japan. *J. Plankton Res.* 10: 941-955.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. En: J. R. Stein (ed.). *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press. New York. 255-273 p.
- Horstmann, U. 1985. The use of microalgae in aquaculture. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 20: 153-156.
- Quiang, H. y A. Richmond. 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6: 391-396.
- Iqbal, M., D. Grey, F. Stepan-Sarkissian y M. W. Fowler. 1993. A flat-sided photobioreactor for culturing microalgae. *Aquac. Eng.* 12: 183 -190.
- James, C. M. y A. M. Al-Khars. 1990. An intensive continuous culture system using tubular photobioreactors for producing microalgae. *Aquaculture.* 87: 381-393.
- Jones, D. A., D. L. Holland y S. S. Jabboire. 1984. Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Appl. Biochem. Technol.* 10: 275-288.
- Laing, I., A. R. Child y A. Janke. 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. mar. biol. Ass. U.K.* 70: 1-12.
- Laing, I. y P. F. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture.* 102: 231-243.

- López Elías, J. A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, México. 163 pp.
- López Elías, J. A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*. 19: 169-180.
- López Elías, J. A. y D. Voltolina Lobina. 1996. Producción masiva de microalgas en cultivos al exterior en un centro de producción acuícola. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Reporte de proyecto FOMES. Universidad de Sonora. 89 pp.
- 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.
- Oswald, W. J. 1988. Large - scale algal culture systems (engineering aspects). En: Borowitzka M. A. y L. Borowitzka. (eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge Press, Cambridge. 357 - 394 p.
- Paniagua Michel, J. J., B. C. Farfán y L. F. Bückle Ramírez. 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Aquaculture*. 64: 249-256.
- Pushparaj, B., E. Pelosi, G. Torzillo, P. Carlozzi, A. Sacchi y R. Materassi. 1994. Growth physiology of a marine nitrogen-fixing cyanobacterium (*Nodularia harveyana*) in outdoor culture. *J. Appl. Phycol.* 6 : 533-537.
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. En: Richmond A. (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. 69-90 p.
- Richmond, A. 1987. A prerequisite for industrial microalgaculture: efficient utilization of solar irradiance. En: Stadler T., J. Mollion, M. C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan y D. Christiaen (ed.). *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science. London and New York. 237 -244 p.
- Rodríguez Ortega, I., A. Ortega Vidal, A. Mendez y H. Dominguez Guedea. 1994. Desarrollo científico y tecnológico para el cultivo de pargo (*Lutjanus sp.*) en jaulas flotantes. Instituto de Acuicultura del Gobierno del Estado de Sonora. Primera edición. Sonora, Hermosillo. 52 pp.

- Sánchez Saavedra, M. P. 1989. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de nutrientes producidos para el cultivo de microalgas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 120 pp.
- Sánchez Saavedra, M. P. y L. F. Bückle Ramírez. 1993. A periodically loaded aerobic biodigester. *Rev. Int. Cont. Amb.* 9: 11-20.
- Sánchez Saavedra, M. P. y D. Voltolina. 1994. Culture of *Pavlova lutheri* (Droop) Green (Prymnesiophyta) in diluted wastewater. *J. Appl. Phycol.* 6: 285-288.
- Sánchez Saavedra, M. P. y D. Voltolina. 1996. The effect of different photon fluence rates of blue-green light on the biomass quality of a costal diatom in pilot scale semicontinuous cultures. *Scientia Marina.* 60: 267-272.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1979. *Biometría, Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica.* H. Blume ediciones. Madrid, España. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein J. (ed.). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurement.* Cambridge University Press, New York. 321-343 p.
- South, G. R. y A. Whittick. 1987. *Introducción to Phycology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne. 331 pp.
- Tinoco Villa, O.D. 1996. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la producción de cultivos masivos al exterior de la microalga marina *Chaetoceros muelleri* en invierno y primavera. Tesis Profesional. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico - Biológicas, Hermosillo, Sonora, México. 86 pp.
- Torzillo, G., B. Pushparaj, F. Bocci, W. Balloni, R. Materassi y G. Florenzano. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass.* 11: 61-74.
- Torzillo, G., A. Sacchi, R. Materassi y A. Richmond. 1991. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 3 (2): 103-109.
- Tredici, M. R. y R. Materassi. 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: The Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4: 221-231.

- Tredici, M. R., G. Chinizzelli, S. Biagiolini y R. Materassi. 1993. Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina* spp. Bull. Inst. Ocean. Monaco, n° special 12. 89-96.
- Trujillo Valle, M. L. 1993. La Colección de Microalgas del C.I.C.E.S.E. Comunicaciones Académicas. Series Acuicultura. CIACT 9301. C.I.C.E.S.E. 103 pp.
- Trujillo Valle, M. L. y D. Voltolina. 1994. Cultivos de microalgas para la acuicultura. Serie Científica. Área de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México. 2 (1): 73-85.
- Uncles, R. J. y I. R. Join. 1993. Vertical mixing and its effects on phytoplankton growth in a turbid estuary. 221-228. En: Dela Peña Nettel G. 1991. Influencia de la turbidez sobre la producción orgánica en la región del delta del Río Colorado. U.A.B.C. Ensenada B.C. Mex. 80 pp.
- Vonskák, A. y A. Richmond. 1985. Problems in developing the biotechnology of algal mass production. 129-135. En: Chrismandha T. y M. A. Borowitzka. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in a tubular photobioreactor. J. Appl. Phycol. 6: 67-74.

A N E X O S

Tabla XVII. Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de producción expresado como número celular (cel ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|--------------------------|--|--|--|
| cel ml^{-1} | 32 | P=0.8526 | P=0.2522 | interacciones istema (0.1483) (<0.0001) hora (<0.0001) | no tiene se rechaza se rechaza | S F S-48 F-48 S-53.25-58 F-53.25-58 S-72 F-72 a b a a b c c d |

Tabla XVIII. Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de producción expresada como número celular (cel ml^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|--------------------------|---|--|---|
| cel ml^{-1} | 40 | P=0.5844 | P=0.6115 | interacciones istema (0.1806) (0.0002) hora (<0.0001) | no tiene se rechaza se rechaza | S F S-48 F-48 S-59.5 F-59.5 S-72 F-72 a b a ab b c c c |

Tabla XX. Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$; P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Estadístico | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|--------------------------|---|------------------------------------|------------|--|
| mg l^{-1} | 41 | P=0.0046 | P=0.0128 | H=0.00012 (con 5 grados de libertad) | P=0.0011 | se rechaza | S-48 b F-48 a S-59.5 b F-59.5 b S-72 b F-72 b |

Tabla XXI. Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Estadístico | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------|---|
| mg l^{-1} | 80 | P=0.0046 | P=0.0128 | H=62.68 (con 5 grados de libertad) | P=0.0001 | se rechaza | S-48 a F-48 a S-59.5 ab F-59.5 b S-72 b F-72 b |

Tabla XXII. Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico (mg l^{-1}) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de verano. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|-----|------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
| mg l^{-1} | 102 | P=0.3636 | P=0.1691 | interacciones isterna | si tiene se acepta | S a F a |
| | | | | hora | se rechaza | S-48 a F-48 a S-605 ab F-60.5 c S-72 bc F-72 bc |

Tabla XXIII. Resumen del análisis de varianza de una vía por rangos, caso no paramétrico (Kruskal Wallis), con los valores de la producción expresados como peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6$ cel) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de invierno. La prueba a posteriori utilizada fue la de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Estadístico | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|--------------------------|----|------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------|---|
| mg por millón de células | 52 | P=0.1531 | P=0.0057 | H=29.42 (con 5 grados de libertad) | P=0.0001 | se rechaza | S-48 b F-48 ab S-59.5 ab F-59.5 a S-72 ab F-72 a |

Tabla XXIV. Resumen del análisis de varianza de dos vías con los valores de peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6$ cel) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de primavera. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|--------------------------|----|------------|--------------------------|---|--------------------------------------|--|
| mg por millón de células | 80 | P=0.0518 | P=0.1930 | interacciones sistema hora (0.0343) (0.0015) (0.0580) | si tiene se rechaza se rechaza | S b F a S-48 a F-48 a S-59.5 ab F-59.5 ab S-72 b F-72 a |

Tabla XXV. Resumen del análisis de varianza de dos vías, con los valores de peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columnas sencillas (S) y columnas con fotobiorreactor (F), a diferentes horas en la estación de verano. La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, donde "a" corresponde al menor valor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianza | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|--------------------------|-----|------------|--------------------------|--|-------------------------------------|--|
| mg por millón de células | 102 | P=0.0603 | P=0.2163 | interacciones istema hora (0.0494) (0.5440) (<0.0001) | si tiene se acepta se rechaza | S F S-48 F-48 S-60. F-60. S-72 F-72 a a ab a bc c bc bc |

Tabla XXVI. Resumen de los análisis de dos vías, con los valores de producción expresada como número celular (cel ml⁻¹) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ♦ marca la transformación de los datos a logaritmo natural (ln). La prueba a posteriori utilizada fue la de Student Newman Keuls. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores de los valores, "a" corresponde al menor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianzas | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|---------------------------|--|-----------------------------------|--|
| ♦48 | 46 | P=0.8447 | P=0.2341 | interacción sistema hora (0.8762) (0.0316) (<0.0001) | no tiene se rechaza se rechaza | S a F b I-S a I-F a Pr-S b Pr-F b V-S b V-F b |
| ♦53.25-60.5 | 40 | P=0.3845 | P=0.8308 | interacción sistema hora (0.1781) (0.0002) (<0.0001) | no tiene se rechaza se rechaza | S a F b I-S a I-F b Pr-S d Pr-F e V-S c V-F c |
| 72 | 38 | P=0.1583 | P=0.1822 | interacción sistema hora (0.0802) (0.0671) (<0.0001) | no tiene se acepta se rechaza | S a F a I-S a I-F a Pr-S c Pr-F d V-S b V-F b |

Tabla XXVII. Resumen de los análisis de dos vías (♦) y de una vía por rangos caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis) (◆), con los valores de producción expresada como peso seco orgánico (mg l⁻¹) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ■ marca la transformación de los datos a raíz cuadrada. La prueba a posteriori utilizada en el ANOVA de dos vías fue la de Student Newman Keuls y en la de una vía por rangos, se usó la prueba de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores, "a" corresponde al menor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianzas | Estadístico | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|---------------------------|--|---|---|---|
| ♦ ● 48 | 79 | P=0.2261 | P=0.0010 | H=28.69 (con 5 grados de libertad) | P <0.0001 | se rechaza | I-S a I-F a Pr-S b Pr-F b V-S b V-F b |
| ◆ ■ 53.25-60.5 | 67 | P=0.1287 | P=0.2951 | F= 2.35 F=13.64 F=24.17 | interacción sistema (0.1040) (0.0005) hora (<0.0001) | si tiene se rechaza se rechaza se rechaza | S a F b I-S a I-F a Pr-S bc Pr-F d V-S b V-F c |
| ♦ ● 72 | 75 | P=<0.0001 | P=0.0003 | H= 51.94 (con 5 grados de libertad) | P <0.0001 | se rechaza | I-S a I-F a Pr-S c Pr-F bc V-S bc V-F b |

NOTA: Los datos con el símbolo (◆) indica que no fueron normales aún después de las transformaciones usuales, por lo cual las comparaciones fueron realizadas por medio de un ANOVA de una vía por rangos, caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis).

Tabla XXVIII. Resumen de los análisis de dos vías (♦) y de una vía por rangos caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis) (◆), con los valores de producción expresada como peso seco orgánico normalizado ($\text{mg} \cdot 10^6 \text{ cel}$) de *Chaetoceros muelleri*, cultivado en los sistemas de columna sencilla (S) y columna con fotobiorreactor (F), en invierno (I), primavera (Pr) y verano (V), a diferentes horas de cultivo. El símbolo ◆ marca la transformación de los datos a logaritmo natural (ln). La prueba a posteriori utilizada en el ANOVA de dos vías fue la de Student Newman Keuls y en el ANOVA de una vía por rangos, se usó la prueba de Dunn. Todos los análisis se realizaron con un $\alpha = 0.05$, P indica el valor de la probabilidad. Las letras indican la magnitud de los valores de los valores, "a" corresponde al menor.

| Variable considerada | n | Normalidad | Homogeneidad de varianzas | Estadístico | Valor de P calculada para el ANOVA | Decisión | Resumen de las pruebas a posteriori |
|----------------------|----|------------|---------------------------|---|--|---------------------|--|
| ♦ 48 | 79 | P=0.2512 | P=0.0254 | H=0.26.72 (con 5 grados de libertad) | P < 0.0001 | se rechaza | I-S b I-F ab Pr-S a Pr-F a V-S a V-F a |
| ◆ 53.25 a 60.5 | 80 | P=0.61150 | P=0.0503 | F=11.54 F= 3.18 | interacción sistema (<0.0001) (0.0787) | si tiene se acepta | S a F a I-S c I-F a Pr-S a Pr-F a V-S b V-F c |
| ◆ 72 | 75 | P=0.0644 | P=0.0635 | F= 4.10 F= 9.09 | interacción sistema (0.0208) (0.0036) | si tiene se rechaza | S b F a I-S b I-F b Pr-S b Pr-F a V-S b V-F b |
| | | | | F=13.75 | hora (<0.0001) | se rechaza | |

NOTA: Los datos con el símbolo (◆) indica que no fueron normales aún después de las transformaciones usuales, por lo cual las comparaciones fueron realizadas por medio de un ANOVA de una vía por rangos, caso no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis).