

Trabajo Fin de Máster

Influencia de la comunidad fitoplanctónica en un experimento de acuicultura mediante sistema de bioflóculos

Intensificación: *TRATAMIENTOS DE AGUAS*

Autor:

María José Escrivà Escrivà

Director:

Dra. María Teresa Sebastiá Frasquet

Codirector/es:

Dr. Jesús Mengual Cuquerella

Marzo, 2017



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

máster en ingeniería
hidráulica y medio ambiente
mihma

En el present Treball Fi de Máster (TFM) va a realitzar-se el seguiment de la qualitat de l'aigua d'un experiment d'aqüicultura d'alta densitat. Aquest experiment consisteix en un sistema de bioflòculs capaç d'augmentar la productivitat i disminuir l'impacte ambiental de l'aqüicultura. Açò és possible gràcies a un sistema tancat sense renovació d'aigua, en el qual és essencial el seguiment de diferents paràmetres de qualitat d'aigua. El principal objectiu del TFM es analitzar el paper de la comunitat fitoplanctònica en la qualitat de l'aigua del sistema. A l'aigua es vigilen les següents variables: pH, sòlids suspesos, temperatura, oxigen dissolt, amoni, nitrats i fòsfor soluble reactiu. A més, es realitza un seguiment de la comunitat fitoplanctònica a través de l'anàlisi de pigments fotosintètics mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i el software CHEMTAX. Els resultats mostren una predominança de diatomees i cianobacteris al llarg de tot el període d'estudi. A més, s'observa una major abundància de dinoflagel·lats al principi de l'estudi, quan es detecta un pic d'amoni. Posteriorment, es produeix una substitució dels dinoflagel·lats per euglenofícies. En els nou tancs de cultiu s'afegeixen diferents dosis d'un probiòtic (100% de la dosi recomanada, 10% i sense probiòtic). L'adició d'una dosi del 100% va produir un descens significatiu en la abundància de diatomees y criptofícies.

En el presente Trabajo Final de Máster (TFM) se va a realizar el seguimiento de la calidad del agua de un experimento de acuicultura de alta densidad. Este experimento consiste en un sistema de bioflóculos cuyas ventajas es su capacidad de aumentar la productividad y disminuir el impacto ambiental de la acuicultura. Esto es posible gracias a un sistema cerrado sin renovación del agua, en el cual el seguimiento de distintos parámetros de calidad de aguas es esencial. El principal objetivo del TFM es analizar el papel de la comunidad fitoplanctónica en la calidad del agua del sistema. En el agua se vigilan las siguientes variables: pH, sólidos suspendidos, temperatura, oxígeno disuelto, amonio, nitritos, nitratos y fósforo soluble reactivo. Además, se realiza un seguimiento de la comunidad fitoplanctónica a través del análisis de pigmentos fotosintéticos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y el software CHEMTAX. Los resultados muestran una predominancia de diatomeas y cianobacterias generalizada a lo largo de todo el período de estudio. Además, se observa una mayor abundancia de dinoflagelados al principio del estudio, cuando se detecta un pico de amonio. Posteriormente, se produce una sustitución de los dinoflagelados por euglenofíceas. En los 9 tanques de cultivo se añadieron distintas dosis de un probiótico (100% de la dosis recomendada, 10% y sin probiótico). La adición de una dosis del 100% produjo un descenso significativo en la abundancia de diatomeas y criptofíceas.

On this master thesis the water quality from an high density aquiculture experiment is going to be monitored. This experiment consists on one biofcls sistem which advantages are the capacity to increase its own productivity and reduce its own environmental impact. It can be possible due to a closed sistem without water renewal, in which the monitoring of different quality parameters is vital. The main objective is to analyze the role of the phytoplanktonic community on the water quality. The parameters that are taken into consideration are: pH, total suspended solids, temperature, dissolved oxigen, ammonia, nitrite, nitrate and soluble phosphorus. Moreover, the phytoplanktonic community is monitored by analyzing the photosintetic pigments which can be done using high performance liquid cromatofraphy (HPLC) and the CHEMTAX software. The results show that diatoms and cianobacters predominate during all the study period. Furthermore, a large number of dinoflagellates at the beginning of the study is observed, when a peak on the amonia is detected. Afterwards, the dinoflagellates are replaced by euglenophites. In the 9 crops ponds different dose of a probiotic (100% of the recommended dose, 10% and without probiotic) were added. The addition of the 100% recommended dosis meant a significant reduction of diatoms and cryptophytes population.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	7
3. Legislación	9
4. Caso estudiado.....	11
5. Material y métodos.....	13
5.1. Obtención de parámetros físico-químicos.....	13
5.2. Obtención y procesado de muestras para análisis de fitoplancton	15
5.2.1. Recolección	15
5.2.2. Procesado de muestras para el análisis de pigmentos con HPLC	15
5.2.3. Extracción de las muestras.....	17
5.3. Análisis de las muestras mediante el uso de HPLC.....	18
5.4. Obtención de la información de pigmentos fotosintéticos.	22
5.5. Cálculo de las concentraciones de pigmentos.....	23
5.6. Cálculo de la composición fitoplanctónica	24
5.7. Análisis estadístico.	30
5.7.1. Análisis univariado	30
5.7.2. Análisis multivariado.	31
6. Resultados y discusión.....	33
6.1. Cálculo de las concentraciones de pigmentos.....	33
6.2. Análisis de la composición fitoplanctónica.	33
6.3. Análisis univariado.	34
6.4. Análisis multivariado.	45
6.4.1. Análisis de correlaciones.....	45
6.4.2. Análisis de diferencias significativas	52
7. Conclusiones	63
8. Campos futuros de estudio	65
9. Bibliografía	67
Anexo 1. Concentraciones de pigmentos por muestra, tanque y día	73
Anexo 2. Matrices de ratios de pigmentos para cada conglomerado	83
Anexo 3. Composición fitoplanctónica.....	85
Anexo 4. Resultados estudio de normalidad de las variables presentes en el Trabajo	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente protocolo de inicio. FUENTE: (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997).....	21
Tabla 2. Gradiente utilizado en el análisis de muestras.	21
Tabla 3. Gradiente de apagado utilizado. FUENTE: (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997)	22
Tabla 4. Factores y tiempos de respuesta.....	23
Tabla 5. Identificación de pigmentos presentes en grupos fitoplanctónicos.	26
Tabla 6. Resultado análisis estadístico univariado en variables físico-químicas	34
Tabla 7. Resultado análisis estadístico univariado para variables biológicas.....	36
Tabla 8. Resultado estudio normalidad en parámetros físico-químicos.	43
Tabla 9. Resumen estudio de Normalidad en grupos de fitoplancton.....	43
Tabla 10. Resultado Levene's Test.....	44
Tabla 11. Análisis de correlación de variables físico-químicas versus grupos fitoplanctónicos.	46
Tabla 12. Análisis de correlaciones entre grupos fitoplanctónicos ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	47
Tabla 13. Análisis de correlaciones de las variables físico químicas	50
Tabla 14 Análisis de correlación entre grupos fitoplanctónicos y el tipo de tratamiento con probiótico.....	52
Tabla 15. Elección del método estadístico a utilizar.....	53
Tabla 16. Resultado análisis de diferencias significativas. Parámetros físico- químicos	54
Tabla 17. Resultados del análisis de diferencias significativas para abundancia absoluta de grupos fitoplanctónicos.....	56
Tabla 18. Resultado análisis de diferencias significativas en la abundancia relativa de grupos fitoplanctónicos	59
Tabla 19. Concentraciones de pigmentos por muestra.	73
Tabla 20. Matriz de Ratios obtenida para el grupo o clúster 1	83
Tabla 21. Matriz de Ratios obtenida para el grupo o clúster 2	84
Tabla 22. Composición fitoplanctónica de las muestras.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Invernadero con los tanques experimentales	12
Figura 2. Coloración de los filtros después del filtrado de las muestras	16
Figura 3. Ejemplo de cromatograma obtenido.	22
Figura 4. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Carga datos'	28
Figura 5. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Ejecución'	28
Figura 6. Ejemplo gráfico de ratios que convergen	29
Figura 7. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Ejecución final'	30
Figura 8. Dendograma de agrupación de muestras por su semejanza	33
Figura 9. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 1	37
Figura 10. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 2	38
Figura 11. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 3	38
Figura 12. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 4	39
Figura 13. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 5	39
Figura 14. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 6	40
Figura 15. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 8	40
Figura 16. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 9	41
Figura 17. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 10	41
Figura 18. Gráfico de caja y bigotes para los sólidos suspendidos totales según la dosis de tratamiento aplicada	55
Figura 19. Gráfico de caja y bigotes para las diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>) según el tanque	56
Figura 20. Gráfico de caja y bigotes para las diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>) según el tratamiento aplicado	57
Figura 21. Gráfico de caja y bigotes para clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>) según el tanque	58
Figura 22. Gráfico de caja y bigotes para criptofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>) según el tratamiento aplicado	58
Figura 23. Gráfico LSD de Fisher para diatomeas (Tanto por uno) por tanque	60
Figura 24. Gráfico LSD de Fisher para diatomeas (Tanto por uno) por tratamiento	60
Figura 25. Gráfico caja y bigotes para clorofíceas (Tanto por uno) por tanque	61
Figura 26. Gráfico caja y bigotes para primnesiofíceas (Tanto por uno) por tanque	62
Figura 27. Gráfico de caja y bigotes para cianofíceas (Tanto por uno) por tanque	62
Figura 28. Estudio normalidad pH día muestreo	91
Figura 29. Estudio normalidad pH media semanal	91
Figura 30. Estudio normalidad amonio día muestreo	91
Figura 31. Estudio normalidad amonio media semanal	91
Figura 32. Estudio normalidad fosfato día muestreo	92
Figura 33. Estudio normalidad fosfato media semanal	92
Figura 34. Estudio normalidad nitrito día muestreo	92
Figura 35. Estudio normalidad nitrito media semanal	92
Figura 36. Estudio normalidad nitrato día muestreo	93
Figura 37. Estudio normalidad nitrato media semanal	93
Figura 38. Estudio normalidad temperatura día muestreo	93
Figura 39. Estudio normalidad temperatura media semanal	93

Figura 40. Estudio normalidad diatomeas (Tanto por uno)	94
Figura 41. Estudio normalidad dinoflagelados (Tanto por uno)	94
Figura 42. Estudio normalidad euglenofíceas. (Tanto por uno).....	94
Figura 43. Estudio normalidad clorofíceas (Tanto por uno).....	94
Figura 44. Estudio normalidad criptofíceas. (Tanto por uno)	95
Figura 45. Estudio normalidad prasinofíceas. (Tanto por uno).....	95
Figura 46. Estudio normalidad primnesiofíceas. (Tanto por uno)	95
Figura 47. Estudio normalidad cianobacterias. (Tanto por uno)	95
Figura 48. Estudio normalidad diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	96
Figura 49. Estudio normalidad dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	96
Figura 50. Estudio normalidad euglenofíceas. ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	96
Figura 51. Estudio normalidad clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	96
Figura 52. Estudio normalidad criptofíceas. ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	97
Figura 53. Estudio normalidad prasinofíceas. ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	97
Figura 54. Estudio normalidad primnesiofíceas. ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	97
Figura 55. Estudio normalidad cianobacterias. ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>).....	97

1. Introducción

La acuicultura engloba la reproducción, el desarrollo y la cosecha de plantas y animales de todo tipo característicos de medios acuáticos, incluyendo embalses, ríos, lagos y océanos. Se considera acuicultura la producción de pescado para la alimentación, pescado para pesca deportiva, cebos, peces ornamentales, crustáceos, moluscos, algas, plantas acuáticas y huevos de pescado (National Oceanic and Atmospheric Administration FISHERIES, 2017).

La definición de acuicultura marina está desarrollada en la Ley 23/1984 (Jefatura del Estado, 1984) de Cultivos Marinos, que dispone que *'se entiende por cultivos marinos la realización de las acciones y labores apropiadas para la reproducción o crecimiento de alguna o varias especies de la fauna y flora marinas o asociadas a ellas.'*

Ante la estabilidad de la producción de la pesca de captura desde finales de la década de 1980, la acuicultura ha sido, a nivel mundial, el desencadenante del impresionante crecimiento del suministro de pescado para el consumo humano (FAO, 2016).

A nivel global, el peso de la acuicultura se ha ido incrementando con el tiempo. La acuicultura proporcionó el 7% del pescado para consumo humano en 1974, el 26% en 1994 y 39% en 2004. En 2014 se alcanzó un hito cuando la contribución del sector acuícola al suministro de pescado para consumo humano superó por primera vez la de pescado capturado en el medio natural (FAO, 2016).

Este crecimiento conlleva consecuencias negativas para el medio ambiente. Por un lado, da lugar al deterioro de los ecosistemas litorales y por otro lado, afecta a las poblaciones de las especies salvajes que son utilizadas para la fabricación de harinas de pescado introducidas en sistemas de acuicultura como aporte alimentario a la población cultivada (Labarta, 2007). El desarrollo en mayor medida de la acuicultura y su capacidad para satisfacer la demanda mundial de alimentos en una población creciente dependerán de la capacidad de la sociedad para desarrollar modelos de acuicultura sostenibles que minimicen su impacto ambiental.

El año 2011 se produjeron, en la Unión Europea, 1.26 millones de toneladas de productos de acuicultura. Este dato supone una reducción del 0.3% respecto a lo puesto en el mercado en 2010, y un descenso acumulado del 12.7% desde el pico de producción acuícola europea que se produjo en el año 1999. En cambio, desde el 2011 hasta el 2014 esta producción aumentó constantemente (4.9% entre 2013 y 2014) (APROMAR, 2016). Pese a ello, la Unión Europea

importa cada año un saldo neto de 7.7 millones de toneladas de pescado, ya que el decrecimiento de la producción primaria se une a un aumento de consumo de los mismos por la sociedad europea (Fundación Observatorio español de Acuicultura, 2015).

Por su parte, España es el Estado miembro de la UE con un mayor volumen de producción en acuicultura en 2014, con 282242 t, seguido por el Reino Unido (204617 t) y Francia (204300 t) (APROMAR, 2016).

El rápido crecimiento de la acuicultura a nivel mundial ha hecho emerger la problemática de la limitación de emplazamientos disponibles con la capacidad ecológica de acoger esta actividad. Por ello, la acuicultura fuera del mar está siendo desarrollada como alternativa para satisfacer la demanda futura de estos productos (Troell *et al.*, 2009).

En este Trabajo Final de Máster (TFM) se analiza un experimento de acuicultura de langostinos. En el campo de cultivo del langostino, el sistema de trabajo se ha ido modificando, dándose, principalmente tres estrategias distintas (Wasielesky Jr., Atwood, Stokes, & Browdy, 2006). Durante los 80, la producción de langostino se realizaba en grandes superficies en balsas de baja densidad. Posteriormente, en los 90, se inició el cultivo de alta densidad sin renovación del agua, con lo que se consigue reducir el consumo de agua, las descargas de agua de desecho, así como el impacto de las descargas de agua con alta densidad de nutrientes. Además, este sistema sin renovación de agua reduce el riesgo de introducción de enfermedades al sistema (Wasielesky *et al.*, 2006). Finalmente, desde el inicio del siglo XXI se han desarrollado sistemas de producción en invernaderos, estos permiten trabajar en niveles de mayor bioseguridad, así como proteger el sistema de las variaciones climáticas eventuales y alargar los períodos de cosecha en las zonas con climas templados.

Desde la implantación del cultivo en invernadero, se han realizado múltiples estudios con el objetivo de determinar la metodología que da lugar a una mayor producción con unos costes económicos y ambientales menores. Wasielesky *et al.* (2006) ha estudiado de manera detallada el efecto de la producción primaria (que se da de manera natural en los tanques) en el consumo de alimento por parte de los langostinos. Se determina que el tener en cuenta la producción primaria de sistema puede suponer una reducción en los costes de alimentación, ya que parte de esta producción será utilizada por los langostinos como fuente de proteína.

Una variante de estos sistemas de cultivo son los sistemas de tecnología de bioflóculo o BFT. Los procesos de acuicultura tradicional se caracterizan por la introducción de altas cantidades de materia orgánica en forma de alimento, alrededor de un 70 u 80% de este alimento permanece en el agua o en el sedimento sin ser consumido por lo que los tanques contienen altas cantidades de nutrientes. Esto conlleva altos costes de alimentación, la acumulación de compuestos tóxicos como el amonio y la limitación de las poblaciones que se pueden cultivar. Para combatir esta problemática se puede reducir la densidad de cultivo (con una reducción de los beneficios), utilizar sistemas de depuración (con un sobrecoste económico) o utilizar sistemas de tratamiento con bioflóculos (BFT).

El sistema BFT se caracteriza por limitar los cambios de agua, reduciéndolos solo a controles puntuales de tóxicos y reducción de materia orgánica solo ante una gran acumulación de residuos orgánicos en el medio. Se llevan a cabo en tanques de mezcla completa con aireación continua. Estos sistemas son el medio de cultivo perfecto para las bacterias, las cuales, con su desarrollo, controlan la calidad del agua.

Concretamente, en estos sistemas se busca el desarrollo de bacterias heterotróficas que se alimenten de la materia orgánica procedente de los desechos del organismo cultivado, en este caso langostinos, así como de los restos de pienso no consumidos.

Estas bacterias son capaces de oxidar los compuestos amoniacales, procedentes de las excreciones y la materia orgánica en descomposición, en nitritos, y a su vez los nitritos a nitratos, tendiendo estos últimos a acumularse en el sistema. El trabajo de las bacterias permite disminuir e incluso eliminar los recambios de agua durante uno o más cultivos (Crab *et al.* 2012), además durante la eliminación de los compuestos nitrogenados se genera una gran cantidad de proteína microbiana, las cuales pueden ser aprovechadas por los langostinos mejorando su rendimiento de engorde (De Schyrve *et al.* 2008). Al mismo tiempo la gran cantidad de bacterias heterotróficas en los sistemas de bioflóculos dificulta la entrada de otras bacterias patógenas evitando así la proliferación de enfermedades. (Crab *et al.* 2012).

Cuando crece la masa bacteriana, al alcanzar altas densidades, tienden a formar flóculos que pueden ser consumidos por la especie cultivada como fuente natural de alimento. (Nootong & Pavasant, 2011)

En 2014, el cultivo del langostino *Litopenaeus vannamei* se situó en décimo lugar en el ranking de especies cultivadas en acuicultura a nivel mundial con 3668682 toneladas producidas. Aun así, esta fue la especie que produjo un mayor valor económico, generando 14768 millones de euros (APROMAR, 2016).

En este trabajo se analizará la relación existente entre la calidad del agua de un sistema de cultivo de alta densidad en invernadero de *Litopenaeus vannamei* y los grupos fitoplanctónicos que se desarrollan en él.

El plancton incluye todos los organismos, plantas y animales que se encuentran en suspensión en el agua. La fracción vegetal del plancton, el fitoplancton, está formado por algas unicelulares solitarias o formando colonias. Los organismos fitoplanctónicos son autótrofos aunque algunas especies pueden ser, temporalmente heterótrofas (UNESCO, 1978).

Si las condiciones lo permiten, pueden crecer y reproducirse rápidamente, pudiendo llegar a causar problemas por el alto consumo de nutrientes del agua, pueden consumir el oxígeno presente en el medio y causar la muerte de organismos superiores como los peces, así como liberar al medio grandes cantidades de tóxicos que se transfieren a través de la cadena trófica y tener efectos letales (National Institute of Oceanography, 2004).

El interés por estudiar los grupos o especies fitoplanctónicas presentes en una zona de reproducción acuícola se repite en un elevado número de estudios. En 2004, Burford, *et al.*, publicó un experimento cuyo objetivo era conocer la retención de nitrógeno realizada por la biota natural en un ambiente dominado por material particulado, en un sistema de alta densidad sin renovación del agua en América Central.

Poco tiempo después, ya en el campo del cultivo de langostinos, se presenta un estudio en el que se analiza la supervivencia de langostinos en función de la alimentación facilitada y el uso inicial de agua limpia o agua con una alta carga de fitoplancton (Wasielesky Jr., Atwood, Stokes, & Browdy, 2006). En este mismo sector se sigue trabajando con pigmentos con el objetivo de investigar la aportación en proteínas a los langostinos por los bioflóculos, usando para el estudio distintas alimentaciones en tanques sin renovación de agua (Xu, Pan, Zhao, & Huang, 2012).

Finalmente, mencionaremos el estudio en que se analizan las consecuencias derivadas de la aplicación de un probiótico concreto en un sistema de cultivo de langostino en tanques con

sistemas de bioflóculos sin renovación de agua (de Paiva-Maia, Alves-Modesto, Otavio-Brito, Olivera , & Vasconcelos-Gesteira, 2013).

Existen diversas técnicas para identificar y cuantificar grupos fitoplanctónicos. Una de las técnicas más habituales es la microscopia. Sin embargo, esta técnica requiere personal muy cualificado, reviste cierta subjetividad y un elevado consumo de tiempo. La varianza de este método es muy elevada y no permite detectar pequeñas variaciones en la composición fitoplanctónica (Schlüter, Mohlenberg, Havskum, & Larsen, 2000).

El desarrollo del análisis de pigmentos fotosintéticos utilizando cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromathography, HPLC), permitió la identificación y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos presentes en muestras de agua. Estos pigmentos, conocidos como pigmentos marcadores, son característicos en distintos grupos fitoplanctónicos, lo que permite determinar la abundancia de los distintos grupos fitoplanctónicos presentes en la muestra (Schlüter, Mohlenberg, Havskum, & Larsen, 2000). En contraposición al análisis microscópico, los resultados obtenidos con HPLC, son reproducibles y presentan una varianza muy baja.

El uso de métodos HPLC han sido promovidos por la Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS), concretamente la metodología de Wright *et al.* (1991) es una de las más utilizadas (Claustre, et al., 2003). En este caso, se utilizará esta metodología pero aplicando la modificación propuesta por Targa, van Der Linde & Berthon (2000). Con esta metodología obtendremos la concentración de pigmentos fotosintéticos presentes en cada muestra estudiada.

Posteriormente, la concentración y composición de estos pigmentos marcadores deberá ser convertida a composición de los principales grupos fitoplanctónicos. Este paso desde los pigmentos marcadores a abundancia de grupos fitoplanctónicos es importante y deberá utilizarse metodología adecuada para ello (Latasa M. 2007). En este trabajo, para realizar esta conversión, se va a utilizar el software CHEMTAX (CHEMical TAXonomy).

Este experimento incluye el estudio de la influencia de un tratamiento con probiótico a distintas concentraciones en el medio de cultivo de los langostinos. Los probióticos son preparaciones con células vivas que tienen efectos beneficiosos en la salud de su huésped mejorando su funcionamiento intestinal a través del mayor aprovechamiento de la comida, aportando enzimas que ayuden a digerir, inhibiendo microorganismos patógenos, reduciendo actividades

mutagénicas o cancerígenas, ayudando al desarrollo del huésped y mejorando su respuesta inmunológica (Liu, Chiu, Shiu, Cheng, & Liu, 2010).

2. Objetivos

El principal objetivo de este TFM es analizar el papel de la comunidad fitoplanctónica en la calidad del agua del sistema.

Para la consecución de este objetivo principal se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Obtener muestras de agua de los tanques de acuicultura en sistema de bioflóculos con una periodicidad semanal.
- 2) Filtrar las muestras de agua y preservarlas en ultracongelador hasta su posterior análisis.
- 3) Analizar los pigmentos fotosintéticos por HPLC.
- 4) Determinar la composición de la comunidad fitoplanctónica mediante el software CHEMTAX.
- 5) Colaborar en el seguimiento de los parámetros de calidad de agua.
- 6) Analizar estadísticamente los datos de calidad de agua y composición fitoplanctónica.
- 7) Analizar la influencia del fitoplancton en la calidad de agua del sistema de acuicultura por bioflóculos.

3. Legislación

En la regulación de este sector existe una amplia legislación dentro de la Unión Europea. En la actualidad existen diversas directivas cuya intención es regular este núcleo productivo. Desde la Directiva 82/894/CEE, de 21 de diciembre de 1982, relativa a la notificación de las enfermedades de los animales en la Comunidad Europea, la primera directiva creada con este fin, hasta la más reciente, la DIRECTIVA 2014/89/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de julio de 2014 por la que se establece un marco para la ordenación del espacio marítimo (MAPAMA, 2017)

A nivel nacional, existe un gran número de leyes que tienen un efecto en la acuicultura. Se citan, a continuación, algunas de las más importantes:

- Ley 23/1984 de Cultivos Marinos, que regula y ordena los cultivos marinos en territorio nacional.
- Ley 22/1988 de Costas, protege, determina los usos y ejerce la función de policía del dominio público marítimo-terrestre.
- Ley 7/1992 de Fomento y conservación de la Pesca Fluvial, que tiene por objeto la conservación, el fomento y el aprovechamiento de los peces y otros seres útiles que, en modo permanente o transitorio, habitan las aguas continentales, públicas o privadas.
- Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
- Ley 21/2013, de 9 de diciembre, de evaluación ambiental. Incluye solamente instalaciones para la acuicultura intensiva que tengan una capacidad de producción superior a 500 t al año.

A nivel autonómico, en la Comunidad Valenciana las leyes que regulan este campo son las siguientes:

- Ley 2/1989, de 3 de marzo, de la Generalitat Valenciana, de Impacto Ambiental.
- Ley 2/1994, de 18 de abril, de la Generalitat Valenciana, sobre defensa de los recursos pesqueros.
- Ley 9/1998, de 15 de diciembre, de Pesca Marítima de la Comunitat Valenciana.
- Ley 6/2003, de 4 de marzo de Ganadería de la Comunitat Valenciana
- Ley 2/2014, de 13 de junio, de Puertos de la Generalitat.

- Ley 6/2014, de 25 de julio, de Prevención, Calidad y Control ambiental de Actividades en la Comunitat Valenciana.

4. Caso estudiado

Este TFM se desarrolla en el seguimiento de un sistema experimental de cultivo de langostinos de la especie *Litopenaus vannamei*, en tanques sin renovación del agua, conocido como sistema de bioflóculos. Para el estudio se introdujeron larvas con un peso de 0.068 ± 0.032 gramos en 9 tanques de 3.2 m^2 y un volumen de 2.250 m^3 con una densidad de población de 200 langostinos/ m^2 . Se les alimentó mediante pienso, variando la cantidad suministrada en función del tamaño de los langostinos y la temperatura. El objetivo principal del experimento seguido es mostrar la posibilidad de obtener un rendimiento real de este sistema de acuicultura de alta densidad de organismos, reduciendo al máximo el consumo de agua y por ende, la contaminación de la fuente receptora de las aguas de deshecho.

Este tipo de cultivo súper intensivo y de mínimo rechazo, se caracteriza por un gran control de la entrada de nutrientes procedentes de la alimentación, altas concentraciones de langostinos, limitación o reducción de las descargas de agua de desecho, una intensa aireación así como una acumulación de bioflóculos en el medio (Ray, Lewis, Browdy, & Leffer, 2010).

El sistema de bioflóculos busca alcanzar un estado estacionario en el agua en el que los microorganismos presentes sean capaces de degradar los restos de materia orgánica que se encuentran en el medio, tanto restos de comida y heces, como mudas de los langostinos o los restos de organismos en degradación. Durante el proceso se llevan a cabo controles de aquellos parámetros que pueden influir en la eficacia o eficiencia del sistema, como la presencia de nutrientes, que puede inhibir el crecimiento del fitoplancton, la presencia de amonio, altamente tóxico, así como, la presencia de oxígeno en el agua, sólidos en suspensión e intensidad lumínica que alcanza el tanque. El presente TFM se centra en analizar la composición y abundancia de los principales grupos fitoplanctónicos presentes en los tanques.

En el experimento se incluye el estudio de la afección de distintas dosificaciones de un tratamiento con probióticos al desarrollo de la población de langostinos. En este TFM se analizará si el uso de este probiótico tiene una afección directa sobre el fitoplancton. El experimento está compuesto por tres dosificaciones distintas, una dosis de tratamiento control, en el que no se aplica probiótico, una segunda dosificación de tratamiento en el que se realiza un tratamiento con $2.8 \cdot 10^{10}$ UFC/ m^3 de *Bacillus amyloliquefaciens*. La tercera dosificación de tratamiento aplicó el 10% de esta dosis. Cada uno de estos tratamientos se

realizó por triplicado, es decir, se aplicó cada una de estas dosis de tratamientos a tres tanques distintos.

El experimento se inició con tanques llenos de agua clara con una salinidad de 22.5‰ que fue desinfectada previamente. El objetivo del sistema es reducir al mínimo los recambios de agua, por lo que solo se realizan cuando los niveles de nitrito son superiores a 15.2 mg/L, debido a que con una salinidad de 22.5‰, niveles superiores de este compuesto pueden dar lugar a problemas de mortalidad en la especie con la que se trabaja (Lin & Chen, 2001).



Figura 1. Invernadero con los tanques experimentales

Con el objetivo de mantener los bioflóculos, cuando la concentración de amonio se encontraba en valores superiores a 1 mg/L, se adicionó azúcar al medio debido a su alto contenido en carbono rápidamente asimilable por las bacterias, siguiendo la metodología propuesta por Avnimelech (2007) y Ebeling, Timmons, & Bisogni (2006), manteniendo una relación carbono: nitrógeno de 6:1.

5. Material y métodos

Este estudio forma parte de una tesis doctoral que se está llevando a cabo en el Instituto de Investigación para la Gestión Integrada de zonas Costeras (IGIC) de la Universitat Politècnica de València. El estudio tuvo lugar entre mayo y octubre de 2016.

5.1. Obtención de parámetros físico-químicos

Los langostinos son invertebrados marinos de ciclo de vida anual. Son recursos altamente sensibles a variaciones del ambiente, especialmente a las condiciones oceanográficas. Estas últimas pueden ser una de las causas de mortalidad durante las fases iniciales del desarrollo de cada clase anual (Secretaría de pesca y acuicultura, 2007).

Con el objetivo de mantener un medio adecuado para el desarrollo de los organismos liberados en las balsas y reducir la mortalidad a valores mínimos se precisa información de los distintos parámetros físico-químicos que van a influir de manera directa en los organismos presentes en éstas.

Los parámetros analizados directamente en la zona de balsas son:

- Salinidad. Este parámetro será imprescindible para mantener las balsas en los niveles de salinidad que aseguren un desarrollo adecuado para la especie que se está produciendo en éstas. La modificación de este parámetro se realiza con aportes de agua dulce o salada, según necesidad.
- Temperatura (tanto del agua como del aire). Pese a situar las balsas en un espacio cerrado que mantiene la temperatura en valores menos oscilantes, se ha de asegurar que la temperatura se encuentra siempre en los rangos adecuados para la supervivencia de los organismos que deseamos mantener en el medio. La temperatura óptima del agua para un mejor desarrollo del cultivo es 28-30°C (Lin & Chen, 2003).

Los análisis de salinidad y temperatura se realizaron dos veces al día, utilizando para ello, una sonda multiparamétrica Multi 340i de WTW.

- Niveles de oxígeno en el agua. Este parámetro condicionará la supervivencia y la calidad de vida de los organismos del sistema. Se recogió información del oxígeno disuelto dos veces al día, utilizando para ello una sonda ProOD de YSI. Este parámetro se controla mediante la regulación de los aireadores para que se mantenga siempre alrededor de 6 mg O₂/L.

- Intensidad lumínica. La presencia de fitoplancton, base de la cadena alimentaria en el medio marino, va a estar limitada, entre otros parámetros, por la cantidad de energía en forma de luz que sea capaz de alcanzar la columna de agua.

Semanalmente se midió la intensidad lumínica mediante un luxómetro HD 9221 de DELTE OHM.

Por otro lado, se extraen muestras de agua del tanque que se llevan inmediatamente al laboratorio con el objetivo de determinar los siguientes parámetros:

- pH. Cambios en el pH de aguas naturales dan lugar a efectos indirectos sobre el fitoplancton ya que se altera el equilibrio entre las fracciones disueltas y adsorbidas de los metales. Si se producen cambios en este parámetro, las células han de utilizar energía manteniendo el pH interno adecuado para el correcto funcionamiento de esta (Hinga, 2002).

El pH del sistema se analizó diariamente utilizando para ello un pH-metro Basic 20+ de Cryson.

- Amonio. En un sistema de cultivo intensivo, el amonio es el tóxico más común, procedente de las excreciones de los animales y la mineralización de restos orgánicos como comida o heces.

Cuatro veces por semana se analizó el nitrógeno amoniacal (N-AT mg/L), mediante la metodología de Koroleff (1972) (Baumgarten, de Barros Rocha, & Niencheski, 1996).

- Fosfato. Utilizado como nutriente principal, puede llegar a ser un elemento limitante para el desarrollo de las distintas especies de fitoplancton.

Los fosfatos ($P-PO_4^{3-}$ mg/L) se analizaron tres veces por semana siguiendo la reacción colorimétrica de Murphy & Riley (1962).

- Nitrito. Evitaremos la acumulación de este compuesto, ya que en concentraciones bajas puede provocar escenarios de mortandad en microorganismos y esto desestabilizaría el ecosistema del que disponemos.

Los nitritos ($N-NO_2^-$ mg/L) se analizaron mediante la metodología de Bendschneider e Robinson (1952) (Baumgarten, de Barros Rocha, & Niencheski, 1996).

- Nitrato. Forma del nitrógeno que es principalmente asimilado por el fitoplancton como nutriente.

Los nitratos (N-NO_3^- mg/L) se analizaron dos veces por semana mediante la diferencia de nitritos más nitratos (Grasshoff, 1976).

- Sólidos suspendidos totales. Como indicador de la cantidad de materia orgánica que tenemos en el agua, la cual estará formada principalmente por el fitoplancton, bacterias, heces, y restos de alimentos y otros organismos. El material suspendido estará formado principalmente por flóculos de bacterias, microalgas y fango.

Estos se determinaron una vez por semana, pasando la muestra de agua por un filtro de $0.5 \mu\text{m}$ y midiendo su diferencia de peso previo secado, según describe la metodología de Baumgarten *et al.* (2010). Además, se monitoreó el volumen de bioflóculos (mL/L) utilizando conos Imhoff, según la metodología utilizada por Avinmelech (2007).

- La alcalinidad total se controló con el objetivo de garantizar la presencia de cantidades suficientes de carbonatos en el agua para que los langostinos puedan desarrollar su exoesqueleto sin problemas.

Los análisis se realizaron a partir del día 31 de estudio, cada quince días mediante el método descrito por APHA (1998).

5.2. Obtención y procesado de muestras para análisis de fitoplancton

5.2.1. Recolección

Se tomaron muestras de agua para analizar la composición y abundancia de fitoplancton durante el periodo comprendido entre el 25 de mayo y el 21 de octubre de 2016. Las muestras se tomaron con una periodicidad semanal, coincidiendo con la medida del resto de parámetros físico-químicos analizados.

5.2.2. Procesado de muestras para el análisis de pigmentos con HPLC

Una vez recolectada una muestra de cada tanque se procede a la filtración de éstas. La filtración se debe realizar siempre en el menor tiempo posible, teniendo en cuenta que no se debe superar las 5 horas desde la obtención de la muestra. Se realizará a través de filtros GF/F Whatman de 25 mm de diámetro y $0.7 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Las muestras se filtran utilizando una presión menor de 0.5 atm para evitar que las células se vean dañadas y pierdan su contenido, perdiendo así los pigmentos al atravesar el tamaño de poro del filtro (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997).

Se ha de tener en cuenta que para el análisis con HPLC, se necesita filtrar el mayor volumen posible con el objetivo de poder determinar el mayor número de pigmentos presentes. Una verificación cualitativa para determinar si se está filtrando un volumen suficiente consiste en comprobar que el número de pigmentos que son determinados con HPLC es mayor que 4, ya que la mayoría de los grupos de fitoplancton contienen al menos cuatro pigmentos accesorios medibles con este sistema. Las muestras que no cumplan con este número mínimo de pigmentos pueden tener problemas relacionados con bajos ratios de señal o ruido y/o técnicas de dilución inadecuadas (Ansio, 2008).

Una vez realizada la filtración se disponen los filtros sobre papel con el objetivo de que se elimine el exceso de humedad y no se produzca una dilución del extracto al preparar la muestra para su análisis en HPLC (Latasa *et al.*, 2001).



Figura 2. Coloración de los filtros después del filtrado de las muestras

Se mantienen las muestras en todo momento protegidas de la luz directa, para que no se alteren los pigmentos antes de su análisis. Una vez realizada la filtración y eliminada la humedad los filtros se almacenan en paquetes de papel de aluminio y son llevados a ultracongelador, donde serán almacenados hasta su análisis a -80°C . El almacenamiento de los filtros en ultracongelador (-80°C) ofrece excelentes resultados, con una degradación mínima (menor del 6% de la clorofila *a*) durante, como mínimo 60 días (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997). De hecho, los filtros de muestras almacenadas en nitrógeno líquido o a -80°C permanecen estables

durante periodos superiores a un año, pero no se puede asegurar su conservación para periodos más largos. (Pinckney, Millie, & Van Heukelem, 2011; Sosik, 1999)

5.2.3. Extracción de las muestras

Se utilizó acetona como disolvente para la extracción, ya que se ha demostrado que la muestra se mantiene estable hasta 48 horas en acetona, y además, tiene una toxicidad menor que el metanol (Latasa *et al.*, 2001).

Determinado el disolvente con el que trabajar, se procede a decidir el volumen utilizado. Por un lado, minimizar el volumen a utilizar permitirá que sean detectados aquellos pigmentos que por encontrarse en pequeñas cantidades podrían quedar por debajo del límite de detección si trabajamos con diluciones elevadas. Pero, el uso de volúmenes muy bajos puede dar lugar a problemas de concentración por evaporación al usar componentes con una alta volatilidad (Latasa *et al.*, 2001) y queda la limitación que se ha de empapar completamente el filtro para que la extracción sea adecuada. Finalmente se decide utilizar un volumen de 4 mL de acetona para la extracción.

La extracción se realiza en jeringas de plástico de 10 mL de capacidad. En cada una de ellas es acoplado un filtro de jeringa PTFE de 17 mm y 0.2 μm de poro, así como una válvula que nos permite cerrar la salida de la jeringa para utilizarla como recipiente de extracción, evitando así trasvase. Se introduce en cada jeringa un filtro de una muestra, y 4 mL de acetona de calidad HPLC para la extracción. En este punto se procede a la disrupción mecánica, proceso en el que se busca la ruptura de las células para que el contenido en pigmentos de ésta se libere al medio y pueda ser analizado. En este caso se utilizó un sistema de ultrasonidos que nos permite realizar la disrupción directamente en la jeringa de plástico utilizada para la extracción y la filtración de la muestra lo que evita el trasvase innecesario de la muestra que puede dar lugar a pérdidas o contaminación. La disrupción se realizó durante 40 segundos a una potencia aproximada de 200 W con un sonicador (homogeneizador de ultrasonidos) modelo SONOPULS HD200 con una micro punta de 6 mm de diámetro. Cada muestra se sella con Parafilm para evitar que se contamine la muestra o que se den pérdidas por evaporación del disolvente y se identifica correctamente. Preparadas las jeringas se mantienen durante 6 horas a temperatura constante de 4°C. Pasado este tiempo se filtran los extractos a través del filtro de jeringa y se recogen en viales de vidrio ámbar y se mantienen a -20°C hasta su análisis (siempre menos de 24 horas).

Debido a la diferencia de polaridad entre la acetona utilizada como disolvente y el metanol utilizado por el HPLC como fase móvil, se produce una distorsión en la obtención de algunos picos (Latasa *et al.*, 2001). Este error se ve compensado añadiendo una cantidad adecuada de agua Milli-Q® a la muestra a inyectar (Latasa, *et al.*, 2001). En este caso, se realiza una dilución 1:0.2 muestra: agua Milli-Q® inmediatamente antes de introducir la muestra para su análisis, para evitar así, que se inicie la degradación de pigmentos (Wright *et al.*, 1991).

5.3. Análisis de las muestras mediante el uso de HPLC

En el análisis de pigmentos con HPLC, se utilizó el método detallado en Wright *et al.* (1991) y modificado por Hooker *et al.*, 2000.

La separación de los pigmentos se realizó en una columna ODS-2 Spherisorb C18, 250 x 4.6 mm y 5 µm tamaño de partícula, para prolongar la vida útil de la columna se utilizó una pre columna ODS-2 Spherisorb C18, 50 x 4.6 mm y 5 µm tamaño de partícula.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido de Agilent HP Serie 1100, equipado con:

- Bomba cuaternaria.
- Compartimento termostataado columna.
- Loop de muestra, acero inoxidable, 200 µL.
- Detector de diodos (DAD Diode Array Detector).
- Programa de adquisición e integración de datos ChemStation.
- Módulo de programa espectral de la ChemStation LC.

El sistema de inyección utilizado es manual. Para asegurar un llenado del loop superior al 95% se ha de inyectar un volumen de muestra que sea entre dos y tres veces la capacidad de éste, y entre 4 y 5 veces para asegurar el llenado del loop por valores superiores a 99% (Ansio, 2008). Por ello, en este trabajo se ha realizado la introducción de la muestra al equipo mediante una jeringa de 500 µL de capacidad, llenando el loop de 200 µL de capacidad dos veces como mínimo.

Los parámetros de detección seleccionados fueron los siguientes:

- El detector de diodos (DAD) recogía el espectro de absorción entre 350-750 nm, franja de absorción de clorofilas y carotenoides.

- Se obtiene el cromatograma para la longitud de onda de 436 ± 4 nm.

- Rendija (slit) 4 nm. Se fija una rendija igual al ancho de banda.

- Ancho de pico (tiempo de respuesta) 0.05 min (1 s): la elección de este parámetro es muy importante, de él depende en buena medida que seamos capaces de observar los picos en el cromatograma. Este valor debe de ser del orden del pico más estrecho que se vaya a observar.

Inicialmente los picos se integraron automáticamente según las siguientes condiciones:

- Área de rechazo 1 mAU.

- Altura de rechazo 0.05 mAU.

- Ancho de pico 0.05 min.

La elección de estos parámetros viene determinada por las características de los picos observados y su finalidad es distinguir entre picos y línea base.

En nuestras muestras, esperamos encontrar ciertos pigmentos características de grupos fitoplanctónicos con escasa presencia o pigmentos minoritarios, en bajas cantidades o concentraciones tanto en altura como en área, por ello, se van a fijar estos parámetros en valores muy pequeños, así se evitará perder los picos menos marcados.

Posteriormente, todos los resultados se inspeccionaban visualmente, y en aquellos cromatogramas en que las condiciones iniciales de integración no se ajustaban correctamente a la línea base, se ajustaron gráficamente y se comprobaron los análisis cromatográficos con el objetivo de determinar si la lectura se ajustaba adecuadamente a un pigmento estudiado.

La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30°C durante los análisis gracias al horno de la columna, esto nos permitió estabilizar los tiempos de retención, lo que facilita la identificación de los picos, ya que la temperatura afecta seriamente a la elución de los compuestos; un cambio diurno de la temperatura ambiente de 5°C (típico de la mayoría de laboratorios) puede producir un cambio de hasta el 10% de los tiempos de retención. La elección de la temperatura se realizó en base a que es altamente recomendable mantener la

columna termostataada, al menos, entre 5 y 8°C por encima de la temperatura ambiente (Sebastià, 2006).

Antes de iniciar el análisis se ha de dotar al equipo con las distintas fases móviles que van a ser utilizadas. A continuación, se detalla la composición de las distintas fases.

Las fases móviles utilizadas fueron:

- Fase A: metanol: acetato de amonio (pH = 7.2) 80:20 (V: V).
- Fase B: acetonitrilo: agua Milli-Q® 90:10 (V: V).
- Fase C: acetato de etilo 100%.

Todos los disolventes utilizados en la preparación de las fases móviles eran de grado HPLC (Baker), una vez preparadas las fases móviles se filtraban a través de filtros de membrana PTFE de 47 mm y 0.45 µm de poro para, con ello, evitar la entrada de impurezas en la columna y aumentar su vida útil, así como para reducir la posibilidad de que se introduzcan burbujas que puedan alterar la presión alcanzada en el sistema.

Introducidas las distintas fases en el equipo se procede a realizar la purga para eliminar cualquier resto de aire que quede en el sistema.

Realizada la purga se procede a iniciar el programa de iniciado del sistema, en el que se cambia la fase en la que se encuentra la columna que ha sido reservada en un medio 100% Fase C y se cambia completamente a un medio 100% Fase A, para asegurar una buena separación al iniciar el programa de análisis. En la Tabla 1 vemos el protocolo de inicio con un flujo constante de 1 mL/min:

Tabla 1. Gradiente protocolo de inicio. FUENTE: (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997)

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
0	0	0	100
10	0	0	100
13	0	100	0
16	100	0	0
17	100	0	0

Preparado el equipo para iniciar los análisis, se procede a la introducción de las muestras. En este caso, el gradiente analítico utilizado se detalla a continuación en la Tabla 2 y se corresponde con el propuesto en la modificación de Hooker *et al.* 2000.

Tabla 2. Gradiente utilizado en el análisis de muestras.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
0.0	100	0	0
2.0	0	100	0
2.6	0	90	10
13.6	0	65	35
18.0	0	31	69
23	0	31	69
25.0	0	100	0
26.0	100	0	0
34.0	100	0	0

Analizadas las muestras, se procede a iniciar el gradiente de apagado con el objetivo de mantener la columna en Fase C, evitando así que se depositen impurezas y se vea reducida su vida útil. El gradiente de apagado utilizado es el presentado por Jeffrey, Mantoura, & Wright, (1997) y presentado en la Tabla 3, a un flujo constante de 1 mL/min.

Tabla 3. Gradiente de apagado utilizado. FUENTE: (Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997)

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
0	100	0	0
3	0	100	0
6	0	0	100
16	0	0	100
17	0	0	100

La importancia de los protocolos de apagado y encendido radica en la conservación de la columna en Fase C, y en el hecho de que, debido a que la diferencia de polaridad entre la Fase A y C son inmiscibles, y por tanto no se puede cambiar de una a otra directamente.

5.4. Obtención de la información de pigmentos fotosintéticos.

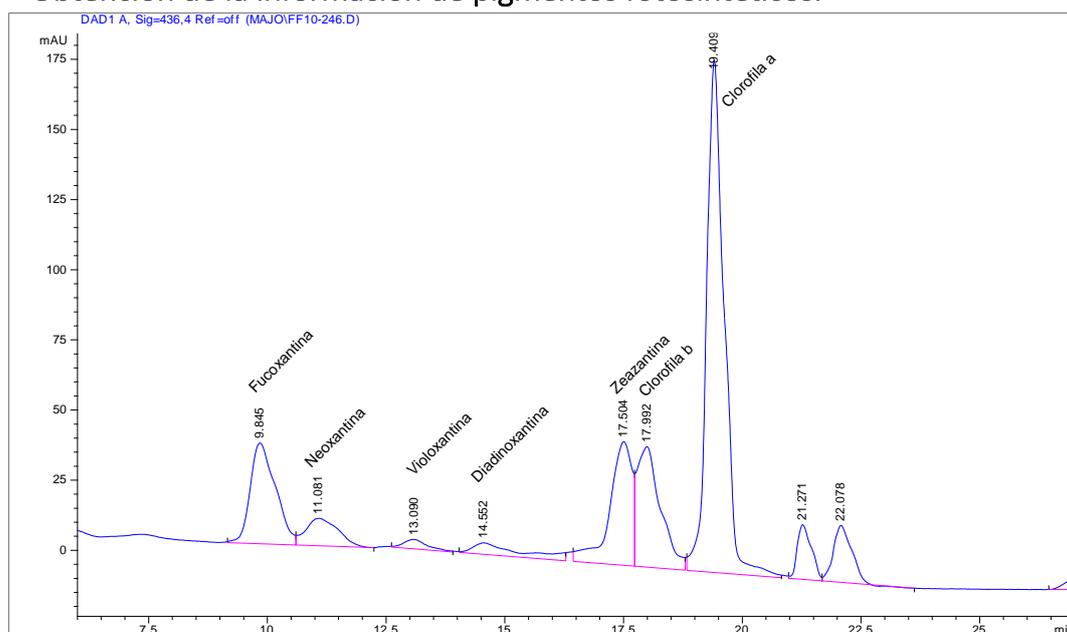


Figura 3. Ejemplo de cromatograma obtenido.

Al analizar la muestra, el programa nos facilita un cromatograma como el que podemos observar en la Figura 3 con la respuesta obtenida por el sistema de la muestra analizada.

Obtenido el cromatograma, se procede a la identificación de los pigmentos que dan lugar a los distintos picos. Para ello se usa una librería creada con anterioridad que nos permite comparar el tiempo de retención y el espectro de cada pico con los tiempos de retención y los espectros característicos de cada pigmento almacenado en el software Chemstation, los cuales aparecen en la publicación Jeffrey, Mantoura, & Wright (1997), en que se facilita información sobre el

orden, el tiempo de elución y los espectros de más de 50 pigmentos. En la Tabla 4 se pueden observar los pigmentos identificados.

5.5. Cálculo de las concentraciones de pigmentos

Identificados los pigmentos, con este programa obtenemos el área de cada pico. Para transformar esta área en valores de concentración se ha obtenido los factores de respuesta de cada uno de los pigmentos a partir del análisis con patrones obtenidos del DHI Institute (Dinamarca). Este valor se obtiene a partir de la pendiente de la recta de regresión de las áreas del pico obtenido, frente a la masa de los patrones en microgramos por litro. La metodología se encuentra detallada en Sebastià (2006). En la siguiente tabla se muestran los factores de respuesta utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Factores y tiempos de respuesta

Pigmento	Factor de respuesta	Tiempo de respuesta (min)
Peridinina	5432.9	7.8
19'butanoyloxyfucoxantina	9094.5	8.1
Fucoxantina	7842.9	8.8
19'hexanoyloxyfucoxantina	8298.0	9.3
Neoxantina	7963.3	9.7
Prasinoxantina	7120.1	10.8
Violoxantina	10079.0	11.6
Diadinoxantina	9048.5	13
Aloxantina	9664.4	14.4
Luteína	7741.9	16
Zeaxantina	8811.7	16.5
Clorofila <i>b</i>	3307.5	18.4
Clorofila <i>a</i>	4305.1	19.6

Como se ha comentado con anterioridad, se procede al cálculo de las distintas concentraciones de pigmento partiendo del área de cada pico obtenida con la Chemstation. Para ello se utilizará la ecuación (1).

$$(1) \quad C_{pi} = \frac{A_{pi} \cdot V_{extracción}}{F_i \cdot V_{iny} \cdot V_{Filt}}$$

Siendo:

- C_{pi} : La concentración del pigmento buscado (i) para la muestra analizada, en microgramos por litro.
- A_{pi} : Área del pico obtenido para el pigmento i en la muestra analizada. En unidades de área.
- $V_{extracción}$: Volumen de disolvente utilizado en el proceso de extracción, en este trabajo 4, en mililitros.
- F_i : Factor de respuesta de cada pigmento concreto, determinado con anterioridad. Los valores del factor de respuesta para cada pigmento están reflejados en la Tabla 4. Factores y tiempos de respuesta
- V_{iny} : Volumen de muestra analizada, coincidente en este trabajo con la capacidad máxima del loop (0.2 mililitros).
- V_{Filt} : Volumen de agua problema filtrada inicialmente, en litros.

5.6. Cálculo de la composición fitoplanctónica

Determinados los pigmentos que encontramos en cada muestra y sus concentraciones, procedemos a transformar la información de la que disponemos en grupos fitoplanctónicos presentes en el medio. Para ello, utilizaremos el software CHEMTAX versión 1.95 (Cedida por S. Wright, comunicación personal).

Antes de introducir los datos en este programa, se realizará un análisis estadístico de las concentraciones de pigmentos obtenidas para poder, con ello, decidir si se agrupan las muestras en distintos grupos por su similitud y así aumentar la precisión del estudio. Para ello, se utiliza el software Statgraphics®, con el que se realiza un análisis de conglomerados que nos agrupa las muestras de las que disponemos según las semejanzas en la composición de pigmentos fitoplanctónicos. Este análisis se ha realizado utilizando el método de conglomeración de *Ward* utilizado en trabajos similares (Sebastià, 2006; Pérez, 2014; Ansio, 2008) y con el que se han obtenido mejores resultados, y el método de medición de distancias Euclidiana cuadrada.

Obtenidos los grupos de muestras, se ejecuta el software CHEMTAX por separado para cada uno de los grupos creados.

Para obtener unos datos de calidad con CHEMTAX se ha de seleccionar cuidadosamente los taxones que se espera encontrar en la muestra, así como los ratios utilizados para la conversión de los datos de concentración de pigmentos a concentración de grupos de fitoplancton.

El programa parte de una matriz inicial de ratios de pigmentos presentes en cada uno de los grupos fitoplanctónicos esperados en las muestras. Es por esta razón que se necesitaría realizar con anterioridad un estudio previo utilizando la metodología tradicional de microscopia o partir de estudios realizados con anterioridad en la misma zona.

Por un lado se preseleccionan aquellos grupos de fitoplancton que se espera se encuentren en este estudio. Para ello, se realizó un estudio microscópico previo en el que se seleccionan los siguientes grupos fitoplanctónicos: Diatomeas, Dinoflagelados, Euglenofíceas, Clorofíceas, Criptofíceas, Prasinofíceas, Primnesiofíceas y Cianobacterias.

Una vez determinados los grupos de fitoplancton que aparecerán en el medio, se necesita conocer que pigmentos se encontraran en cada uno de estos grupos, con el objetivo de crear una matriz de composición inicial que se introduzca al programa. La elección de la matriz utilizada va a determinar los resultados obtenidos (Latasa M. , 2007).

Para mejorar los resultados obtenidos, en este trabajo se utiliza la metodología propuesta por Latasa M. (2007) y avalada por los desarrolladores del software (Mackey, Higgins, Mackey, & Wright, 1997) consistente en repetir la ejecución del programa utilizando una matriz inicial aleatoria y realizar distintas ejecuciones del programa utilizando como matriz inicial la obtenida en la ejecución anterior. Las sucesivas ejecuciones del programa convergen en unos valores de ratio reales para la mayor parte del fitoplancton (Latasa M. , 2007).

Por tanto, se parte de una matriz generada en el Excel, en la cual a aquellos pigmentos que no aparezcan en un grupo de fitoplancton se les otorgará un valor de cero y a aquellos que si se encuentren se les otorgará un valor aleatorio comprendido entre 0 y 1 como ratio pigmento: clorofila a , excepto a la clorofila a , ya que por ser utilizada como referencia se le otorgará el valor 1. En la Tabla 5 vemos los pigmentos esperados en cada grupo de fitoplancton, aquellos que queremos llegar a determinar para el cálculo de la composición final de la muestra.

Tabla 5. Identificación de pigmentos presentes en grupos fitoplanctónicos.

Clase/Pigmento	Peridina	19'ButanoyloxyFucoxantina	Fucoxantina	19'Hexanoyloxyfucoxantina	Neoxantina	Prasincoxantina	Violoxantina	Alloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>
Diatomeas			X		X							1
Dinoflagelados	X			X								1
Euglenofíceas					X						X	1
Clorofíceas					X		X		X	X	X	1
Criptofíceas								X				1
Prasinofíceas					X	X	X		X	X	X	1
Primnesiofíceas		X	X	X								1
Cianobacterias										X		1

El programa CHEMTAX (CHEMical TAXonomy) es utilizado para calcular la abundancia de todos aquellos grupos de fitoplancton que se encuentren en cantidad suficiente para ser determinados químicamente (Mackey, Higgins, Mackey, & Wright, 1997). Esta herramienta aplica matrices de factorización con el objetivo de estimar la contribución de los distintos grupos fitoplanctónicos al total de clorofila *a* (Latasa M. , 2007). El programa consiste en la resolución de un problema de análisis de factores con el objetivo de encontrar el ratio óptimo pigmento *i*: Clorofila *a*, asignando el total de clorofila *a* obtenido a los distintos grupos de fitoplancton que se encuentren en la muestra.

La versión del CHEMTAX utilizada parte de un documento Excel en que se ha de introducir la información que necesitará el programa para su adecuado funcionamiento. A continuación, se procederá a la explicación de este documento así como la introducción de datos.

- Hoja de Datos: En esta hoja se deberá incluir la información recopilada de pigmentos (en $\mu\text{g/L}$) así como la diferenciación de cada muestra en los distintos conglomerados creados con anterioridad.

- Hoja de Ratios: En esta hoja se incluyen las matrices que van a ser utilizadas por el programa como matrices de entrada.
- Límites de ratios: Se definen, en esta hoja, la medida o porcentaje en que los ratios de entrada pueden ser modificados.
- Hoja de configuración: En esta hoja se introducen los parámetros que va a utilizar el programa y se detalla el cálculo que va a realizar este.

Se procede, a continuación a ejecutar CHEMTAX con una colección inicial de 10 matrices generadas de manera aleatoria. Al trabajar con estas matrices el programa genera un fichero de salida con otras 10 matrices de salida o matrices finales. Las matrices finales obtenidas se introducen en la hoja de entrada y se repite el proceso tantas veces como se estime necesario. En este trabajo, se ha repetido el proceso en 5 ocasiones, con lo que se trabajará con 60 matrices para la obtención de los ratios pigmento i: clorofila a que se utilizaran para el cálculo de la concentración final de los distintos grupos de fitoplancton por muestra. El proceso completo de trabajo con CHEMTAX se realizará tantas veces como grupos de muestras hayan sido creados con anterioridad en el análisis de conglomerados.

En la Figura 4 se muestra la pantalla inicial del programa una vez han sido cargados los datos con que se trabajará. Vemos como el programa refleja los parámetros introducidos en el Excel para la ejecución del sistema de cálculo. Podemos ver en la Figura 5 esta misma interfaz una vez se ha realizado el proceso. Ejecutado el software, los resultados son generados directamente sobre el Excel con el que trabajamos.

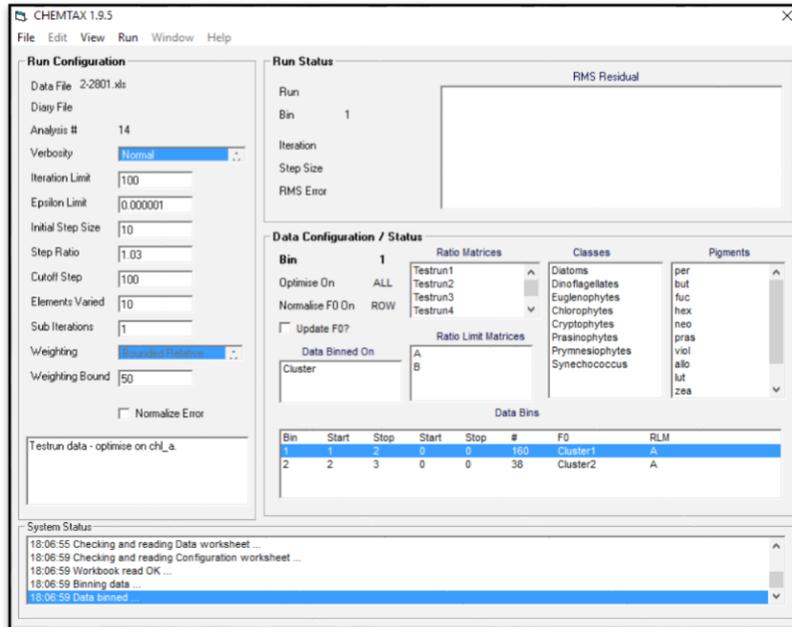


Figura 4. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Carga datos'

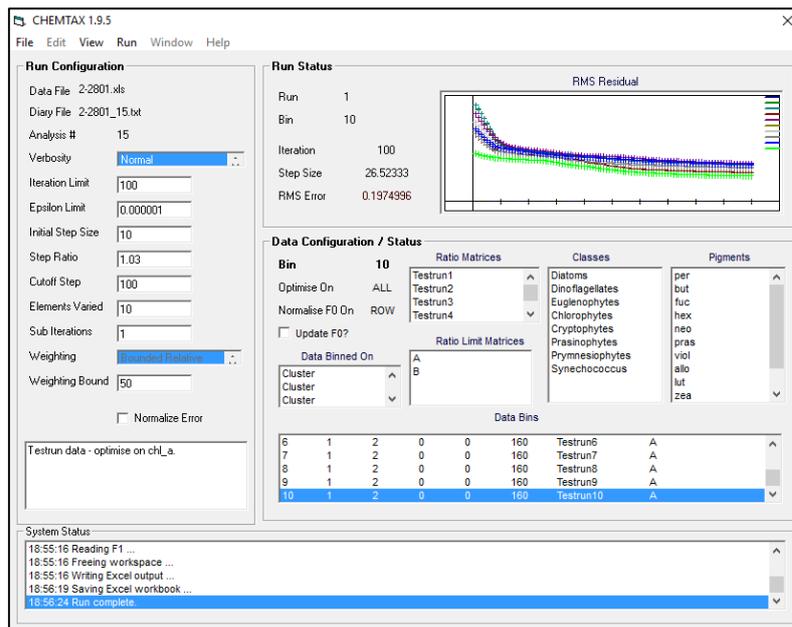


Figura 5. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Ejecución'

Realizadas las 5 ejecuciones y disponiendo de las 60 matrices de ratios pigmento i: clorofila α , se procede al cálculo de la matriz final que se utilizará para la determinación de las concentraciones finales de los distintos grupos fitoplanctónicos a partir de las concentraciones de los pigmentos encontrados.

Para ello, se estudia la convergencia de los ratios de pigmentos para cada grupo de fitoplancton. En aquellos pigmentos en los que se observa convergencia Figura 6 de los ratios se construye la matriz final de los ratios con los valores medios de las últimas 10 ejecuciones, mientras que en aquellos pigmentos en los que no se observa se utiliza el valor medio de los 60 ratios obtenidos.

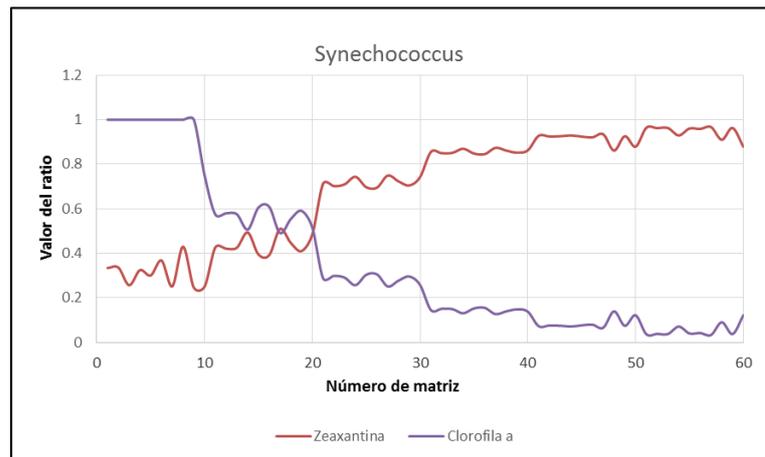


Figura 6. Ejemplo gráfico de ratios que convergen

Obtenida la matriz de ratios final, adquiriendo para cada uno de los pigmentos en cada grupo el valor que se ha estimado como más adecuado, se procede a ejecutar por última vez el programa para obtener la composición relativa y absoluta de cada grupo de fitoplancton en cada una de las muestras analizadas. La composición absoluta se expresa en mg/m^3 o $\mu\text{g}/\text{L}$ de clorofila *a* que están formando parte de un determinado grupo fitoplanctónico. En cambio, la composición relativa se expresa en tanto por uno de clorofila *a* sobre el total de esta.

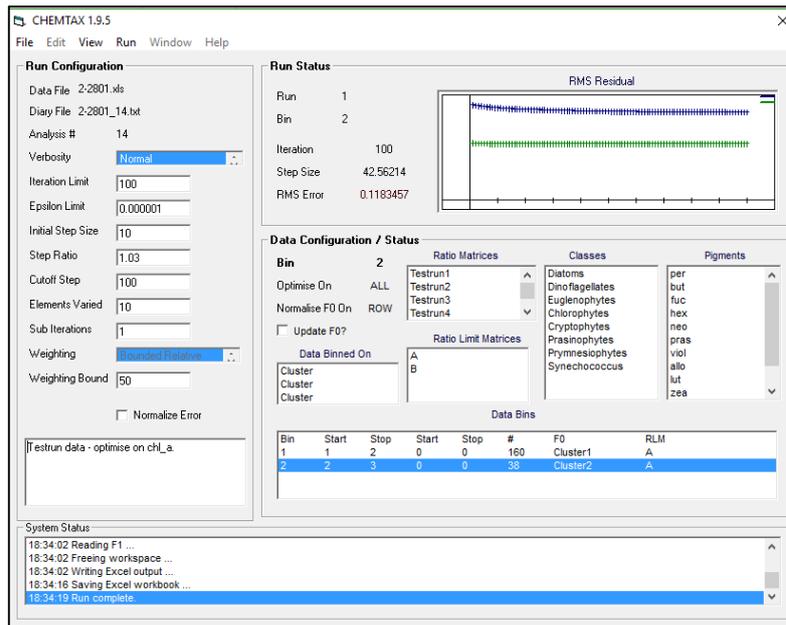


Figura 7. Interfaz del programa CHEMTAX. 'Ejecución final'

En esta figura (Figura 7) vemos como se están graficando dos procesos de minimización del error, esto se debe a que la imagen se corresponde con el último proceso de cálculo, en el que se han introducido los dos grupos de muestra o conglomerados para la determinación final de las concentraciones de grupos de fitoplancton.

Una vez ejecutado el programa se crea una hoja "Analysis history" que detalla el procedimiento realizado.

5.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realiza utilizando el software Statgraphics Centurión XVI®, del cual tiene licencia la Universitat Politècnica de València para el estudio de diferencias significativas. Por otro lado, para el estudio de correlaciones se ha utilizado el software SPSS®.

5.7.1. Análisis univariado

Se realiza un análisis univariado de aquellos parámetros que puedan condicionar el correcto funcionamiento del sistema, así como el desarrollo del fitoplancton en el medio. Se realiza sobre las variables: pH, amonio, fosfato, nitrito, nitrato, sólidos suspendidos totales, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto e intensidad lumínica, tanto con el valor obtenido de estos parámetros al recoger la muestra de fitoplancton, como con la media de estos parámetros en los 7 días anteriores a la recogida de estas muestras. Se realiza este análisis estadístico, además, sobre la abundancia de los grupos fitoplanctónicos.

En primer lugar se realiza un análisis descriptivo: media, desviación estándar, varianza, máximo y mínimo para cada uno de estos parámetros. A continuación, se comprueba si las distintas variables analizadas siguen una distribución normal. Seguir una distribución normal o no condicionará el análisis multivariado a realizar. Se comprueba la normalidad de la distribución con los coeficientes de asimetría y curtosis.

Se considerará que las variables siguen una distribución normal cuando cumplan las siguientes características:

- El gráfico de probabilidad normal debe de contener todos los datos de las variables sobre la línea de tendencia.
- El histograma deberá ajustarse a una campana de Gauss.
- Los valores de asimetría y curtosis deberán comprenderse entre -2 y 2.

Por último, se analiza si se cumple la hipótesis de homocedasticidad de las varianzas en tanques distintos para cada variable. Se aplica el Test de Levene o prueba de la homogeneidad de las varianzas.

5.7.2. Análisis multivariado.

En primer lugar, se realiza un análisis de correlación entre las variables que se han analizado en el trabajo. Inicialmente, se presenta el resultado del estudio de las correlaciones existentes entre los parámetros físico-químicos, posteriormente se estudian las correlaciones entre los parámetros físico químicos y los grupos fitoplanctónicos (en concentraciones absolutas) para terminar analizando las correlaciones existentes entre los propios grupos de fitoplancton (en concentraciones absolutas).

Para este análisis, en aquellos casos en que los dos parámetros analizados sigan una distribución normal se aplica el análisis de correlación de Pearson, en cambio, si alguno de los parámetros o ambos no siguen este tipo de distribución, se utiliza el análisis de correlación de Spearman. A diferencia del método de Pearson, el método de Spearman analiza la correlación entre dos variables ordenando previamente los valores obtenidos en orden creciente, mejora los resultados obtenidos en series que no siguen una distribución normal o aquellos con valores extremos.

A continuación, se procede a la búsqueda de diferencias significativas en las medias de las variables estudiadas entre tanques o tratamientos. En este estudio, para aquellas variables que

presenten una distribución normal y cumplan la condición de homocedasticidad de la varianza se aplicará el método ANOVA, y cuando no se den ambas condiciones, se aplicará el test no paramétrico de Kruskal- Wallis. En el test de Kruskal-Wallis se comparan las medianas.

6. Resultados y discusión

6.1. Cálculo de las concentraciones de pigmentos.

Se presentan en el Anexo 1 los resultados obtenidos en el análisis de pigmentos para cada una de las muestras.

6.2. Análisis de la composición fitoplanctónica.

En este apartado se muestran, en primer lugar, los resultados del análisis de conglomerados. De las 198 muestras analizadas, se definen dos conglomerados, uno de 142 muestras y el otro de 56 muestras, tal y como se puede observar en la Figura 8.

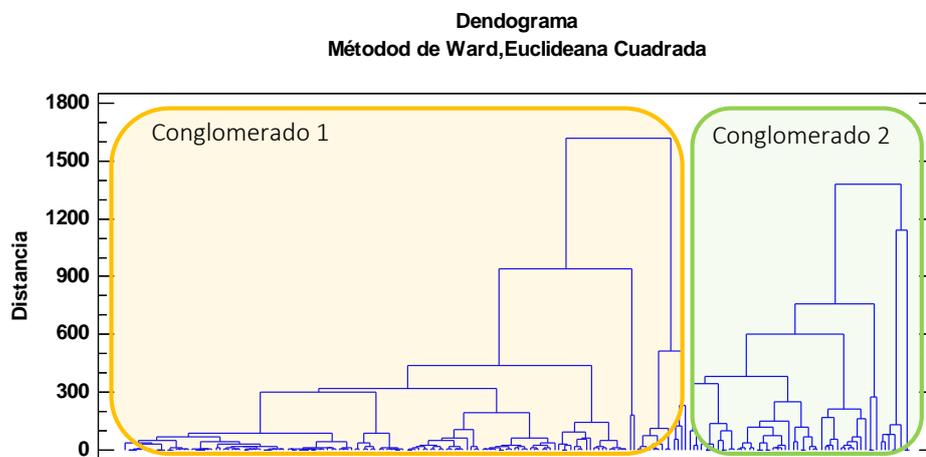


Figura 8. Dendograma de agrupación de muestras por su semejanza

En segundo lugar, se muestran en el Anexo 2 las matrices utilizadas para obtener las concentraciones de los distintos grupos fitoplanctónicos para cada uno de los conglomerados identificados.

A continuación, se presentan en el Anexo 3 los resultados obtenidos en la composición fitoplanctónica para los dos conglomerados identificados con el programa CHEMTAX, en composición absoluta ($\mu\text{g/L}$ de clorofila *a*) y relativa (Tanto por uno).

6.3. Análisis univariado.

Se presentan en este apartado los resultados del análisis univariado tanto de las variables físico-químicas analizadas durante el estudio, facilitadas por el laboratorio de Oceanografía Costera del Instituto de Investigación para la Gestión Integrada de las zonas Costeras (IGIC) de la Universitat Politècnica de València como de los grupos fitoplanctónicos determinados en este TFM. Se presentan en la Tabla 6 (físico-químicos) y la Tabla 7 (grupos fitoplanctónicos) los principales estadísticos descriptivos de estos parámetros.

Tabla 6. Resultado análisis estadístico univariado en variables físico-químicas

	Promedio	Desviación Estándar	Varianza	Mínimo	Máximo
pH día recogida muestra	7.77	0.36	4.58	6.41	8.38
pH media semanal	7.73	0.34	4.34	6.77	8.57
NH ₄ ⁺ día recogida muestra (mg/L)	0.15	0.36	243.81	< L.D.	3.44
NH ₄ ⁺ media semanal (mg/L)	0.16	0.30	193.63	< L.D.	3.33
PO ₄ ³⁻ día recogida muestra (mg/L)	3.21	4.03	125.69	0.02	20.30
PO ₄ ³⁻ media semanal (mg/L)	3.32	3.63	109.38	0.01	17.43
NO ₂ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	7.39	7.61	102.96	0.04	25.22
NO ₂ ⁻ media semanal (mg/L)	6.65	7.25	109.02	0.03	20.82
NO ₃ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	14.61	22.28	152.48	< L.D.	72.14
NO ₃ ⁻ media semanal (mg/L)	15.93	21.49	134.89	< L.D.	73.80
Tª día recogida muestra (°C)	27.60	1.80	6.51	22.50	30.75
Tª media semanal (°C)	27.83	1.61	5.77	23.24	30.52
Luminosidad (Lux)	2351.77	1773.70	75.42	102.30	5487.70
Sólidos Suspendidos Totales (g/L)	0.31	0.24	77.43	0.01	1.31

L.D.: Límite de detección del método.

Se puede observar en la Tabla 6 como los valores de los parámetros físico-químicos se encuentran generalmente dentro de los rangos aceptables para el desarrollo de los langostinos, de hecho, se realiza el seguimiento de estos valores para realizar los ajustes necesarios para que no se produzcan problemas en el cultivo.

Se observa como el valor del nitrógeno en forma de amonio tiene su máximo puntual en 3.44 mg/L de N-NH₄⁺, valor que se encuentra por debajo del valor de “seguridad” en la especie *L. vannamei* de 3.55 mg/L de N-NH₄⁺ en agua con una salinidad de 25‰ (Lin & Chen, 2001).

Se ve además como el valor máximo de nitrato en el medio se encuentra por debajo de los 80 mg/L de nitrógeno en forma de nitrato, valor que queda muy por debajo del valor de seguridad para nitrato en la especie *L. vannamei* situado en 177 mg/L a una salinidad del 23‰ (Furtado *et al.*, 2015).

El valor de seguridad establecido para nitrito en la especie *L. vannamei* es de 15.2 mg/L (Lin & Chen, 2003). Este valor sí se ha visto superado de forma puntual, ya que como se observa en la Tabla 6 el valor máximo observado es de 25.22 mg/L. Este valor se ha controlado con cambios puntuales y parciales de agua (aproximadamente el 25% cada vez que se detectaban estos valores), y reducciones en la introducción de pienso al 40% para garantizar la supervivencia de los langostinos y evitar en la medida de lo posible el aumento de los nitritos, hasta observar su restablecimiento.

Vemos como los valores de los principales nutrientes utilizados por el fitoplancton tienen el registro mínimo por debajo del límite de detección del método utilizado. En el caso del amonio, estos valores bajos se han presentado a partir de la segunda semana de julio, cuando las bacterias encargadas de la oxidación del amonio a nitrito se han desarrollado en el sistema. A partir de este punto, los valores de amonio son muy bajos o no detectables. En el caso del nitrito, en cambio, los valores inferiores al límite de detección del método se han encontrado a partir de septiembre. El valor de sólidos suspendidos ha estado, en todo caso por debajo de 1.5 g/L.

Tabla 7. Resultado análisis estadístico univariado para variables biológicas

		Promedio	Mediana	D.E:	Varianza	Mínimo	Máximo
Diatomeas	µg/L de chl <i>a</i>	59.99	39.94	57.99	96.66	< L.D.	249.88
	Tanto por uno	34.30	0.34	0.24	70.84	< L.D.	91.40
Dinoflagelados	µg/L de chl <i>a</i>	4.42	0.11	16.46	372.36	< L.D.	142.51
	Tanto por uno	4.00	0.00	0.13	312.98	< L.D.	56.80
Euglenofíceas	µg/L de chl <i>a</i>	38.28	2.36	67.91	177.42	< L.D.	351.55
	Tanto por uno	10.10	0.02	0.14	135.44	< L.D.	73.40
Clorofíceas	µg/L de chl <i>a</i>	17.93	1.89	40.51	225.98	< L.D.	298.78
	Tanto por uno	6.50	0.02	0.11	173.31	< L.D.	59.70
Criptofíceas	µg/L de chl <i>a</i>	3.22	1.33	5.17	160.31	< L.D.	45.65
	Tanto por uno	1.90	0.01	0.03	127.92	< L.D.	15.60
Prasinofíceas	µg/L de chl <i>a</i>	4.12	2.97	4.96	120.43	< L.D.	25.20
	Tanto por uno	3.90	0.03	0.05	133.74	< L.D.	31.90
Primnesiofí-ceas	µg/L de chl <i>a</i>	7.58	3.19	11.16	147.28	< L.D.	59.28
	Tanto por uno	3.00	0.03	0.03	94.49	< L.D.	15.70
Cianobacterias	µg/L de chl <i>a</i>	87.97	54.11	113.68	129.23	< L.D.	671.20
	Tanto por uno	36.30	0.38	0.20	54.88	< L.D.	91.40

L.D.: Límite de detección del método.

Chl *a*: Clorofila *a*.

D.E.: Desviación Estándar

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en el estudio univariado de los grupos fitoplanctónicos que se presentan en este estudio. Como vemos se analiza la composición de la comunidad fitoplanctónica, por un lado en función de la concentración absoluta de cada grupo, medida en microgramos del total de clorofila *a* que encontramos en la muestra y por otro lado en porcentaje en el que se presenta sobre el total de grupos fitoplanctónicos.

Se observa como aquellos grupos de fitoplancton más abundantes en el estudio son las diatomeas y las cianobacterias, siendo estas últimas las que alcanzan unas abundancias absolutas más elevadas (concentraciones de clorofila *a* más elevadas). Cada uno de estos grupos en promedio constituye aproximadamente el 35% del total del fitoplancton presente. Además, presentan valores máximos superiores al 90%. El resto de grupos presentes tienen abundancias medias igual o inferiores al 10%, si bien puntualmente algunos grupos como euglenofíceas (73%), clorofíceas (60%) y dinoflagelados (57%) presentan abundancias superiores al 50%. Otros autores como Lemonnier *et al.* (2016) observan también una

dominancia de diatomeas y cianobacterias en cultivo de langostinos, según datos obtenidos con CHEMTAX. Las diatomeas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados importantes para la nutrición de larvas de peces y crustáceos (Brown, Jeffrey, Volkman , & Dunstan, 1997).

Para explicar mejor la variación en la composición del fitoplancton se presentan a continuación los siguientes gráficos de barras acumuladas en los que se representa la evolución temporal del fitoplancton. Así se observa una mayor similitud entre los tanques 1 y 3 en los que en general a lo largo de todo el experimento predominan las diatomeas, y entre los tanques restantes (2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10) en los que predominan las cianobacterias. En el siguiente apartado, análisis estadístico multivariado, se analizará si estas diferencias observadas son estadísticamente significativas.

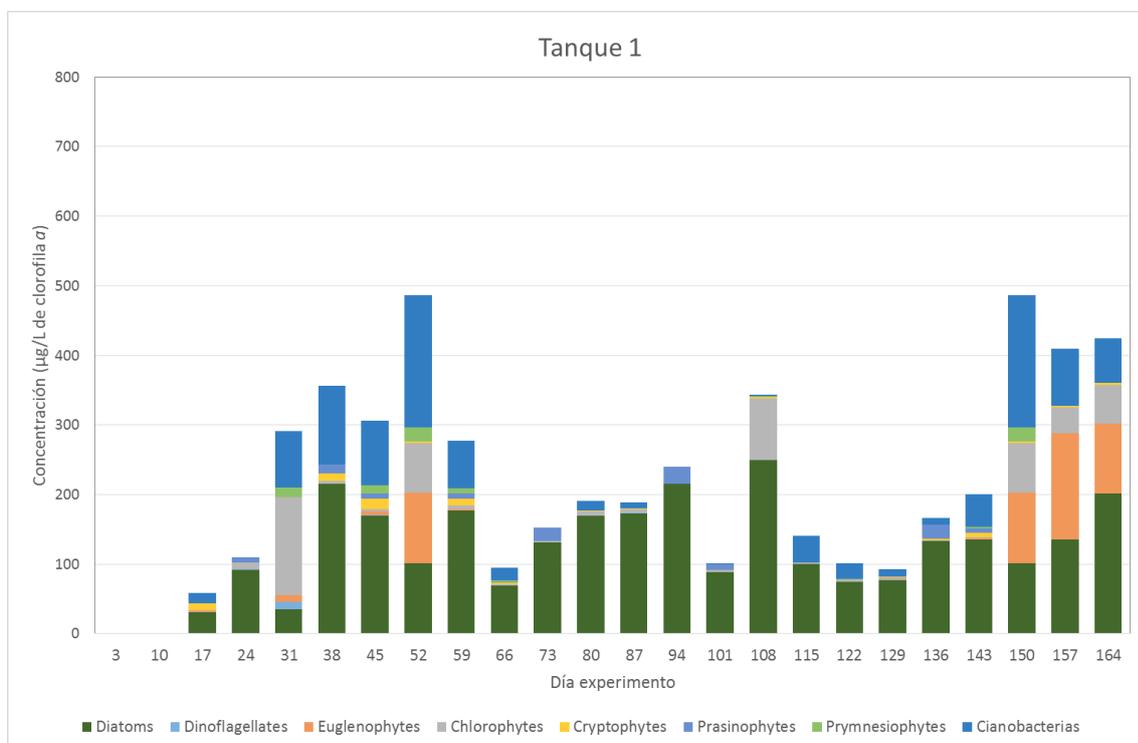


Figura 9. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 1

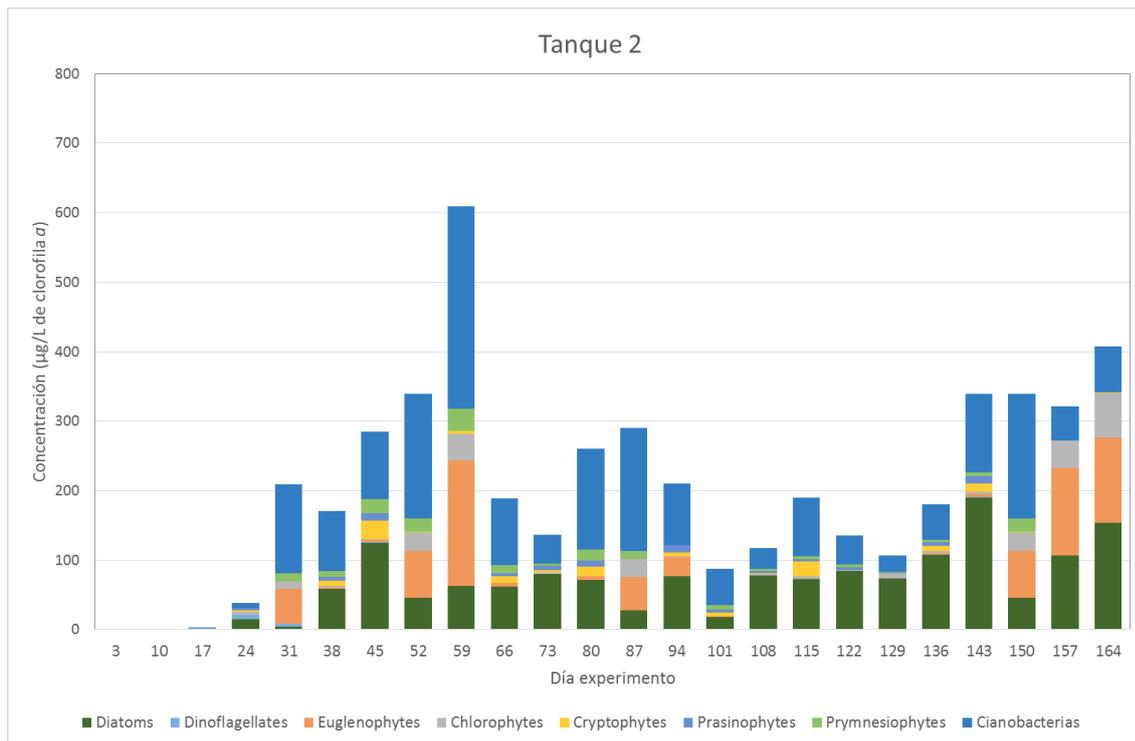


Figura 10. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 2

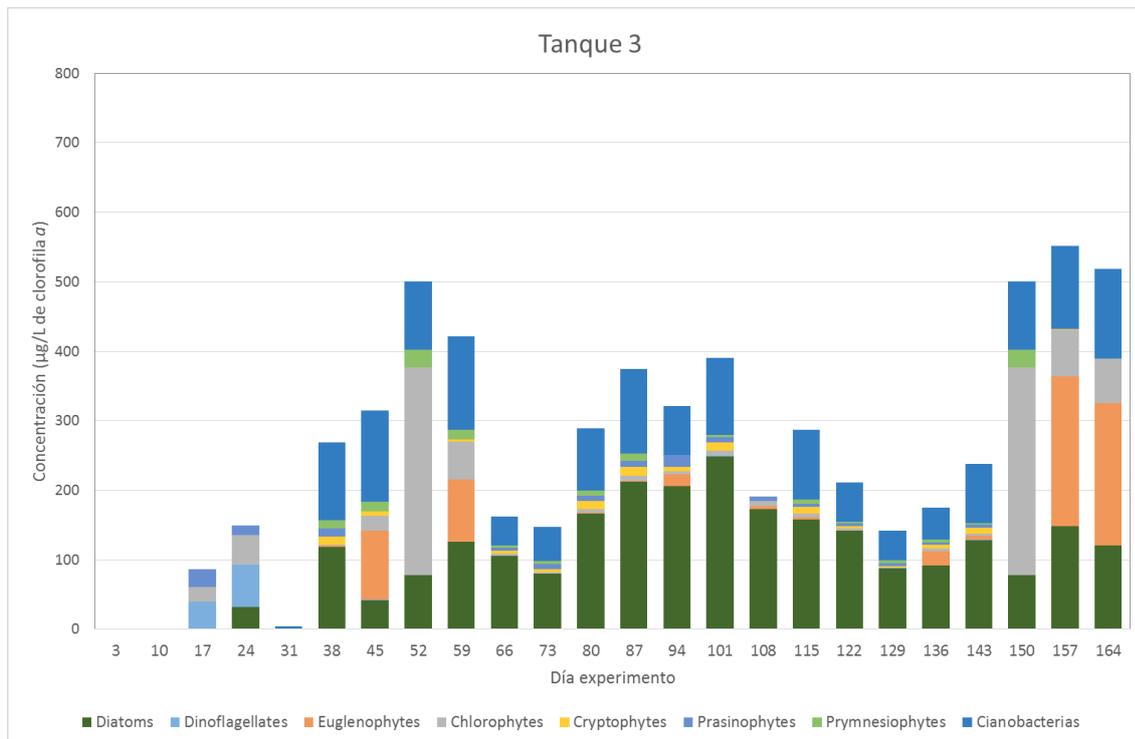


Figura 11. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 3

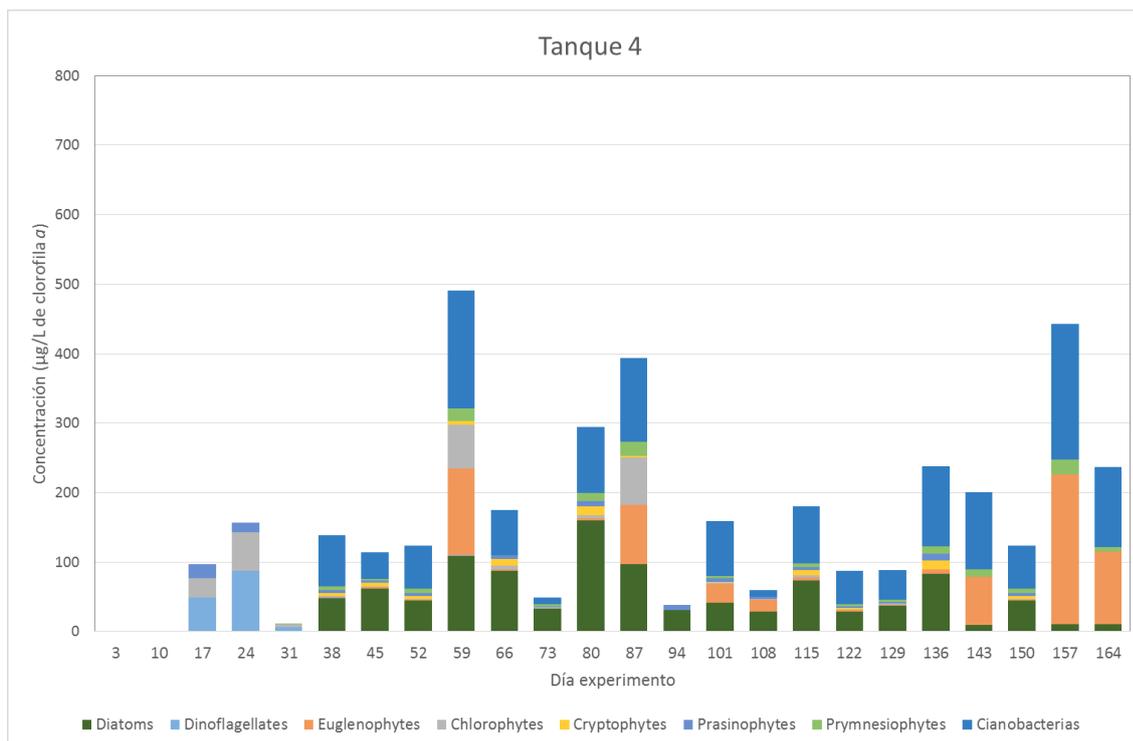


Figura 12. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 4

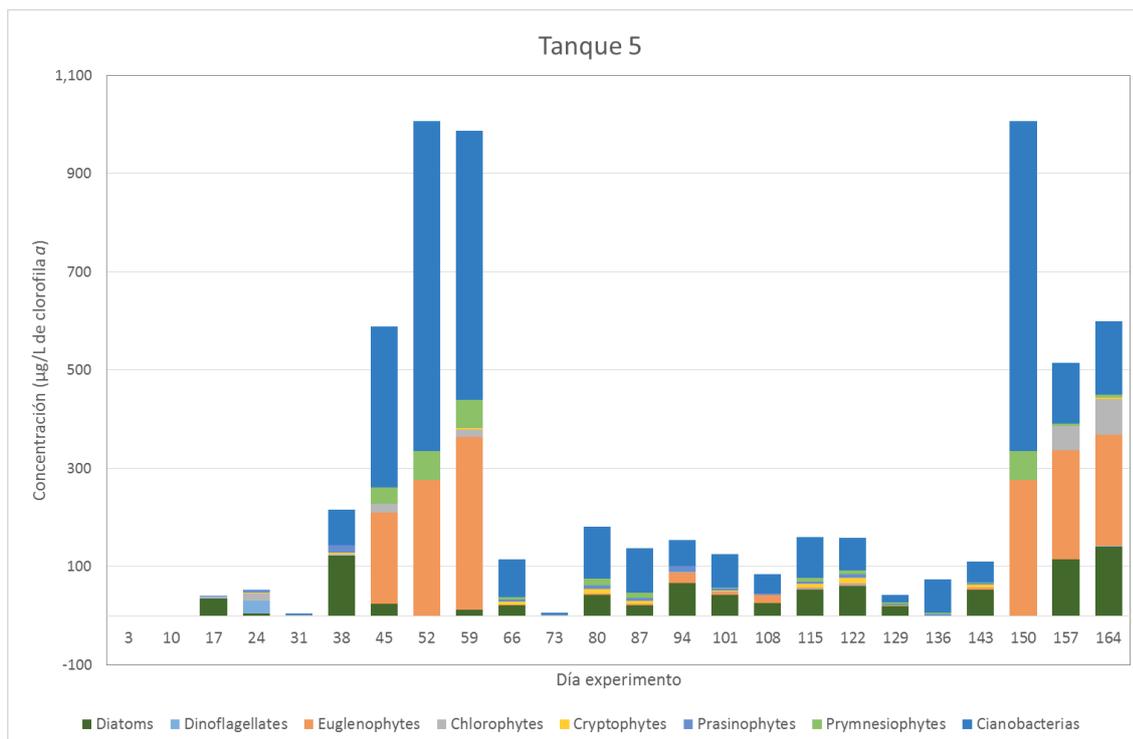


Figura 13. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 5

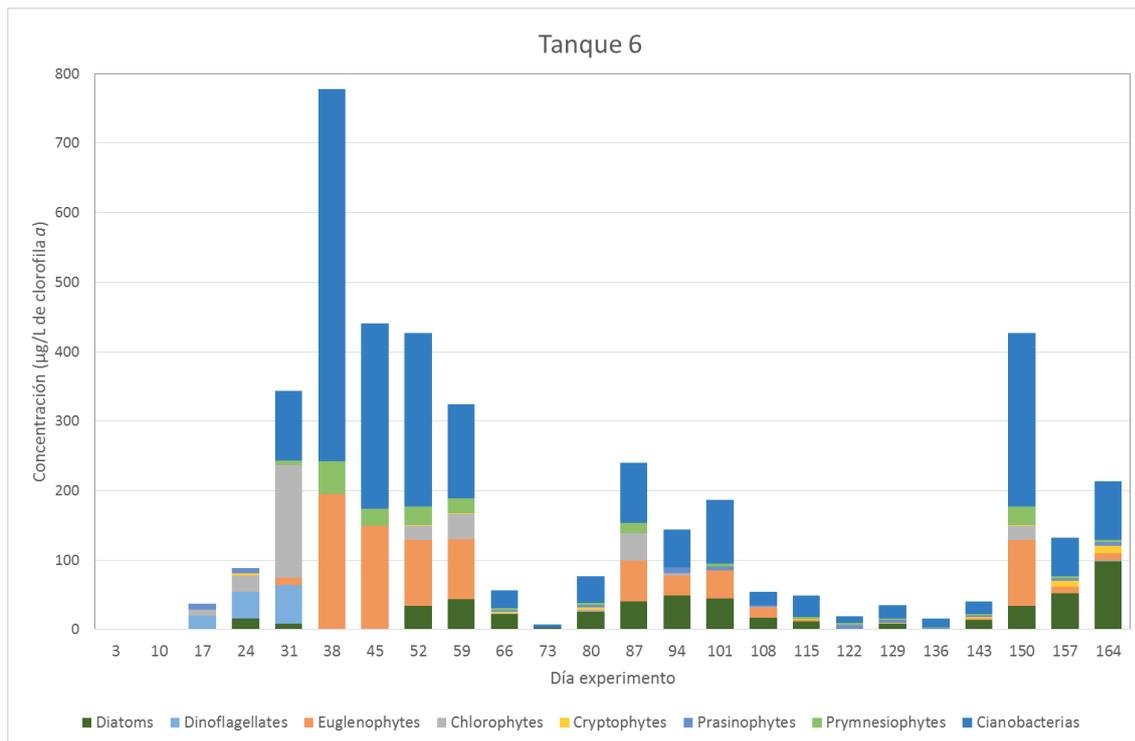


Figura 14. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 6

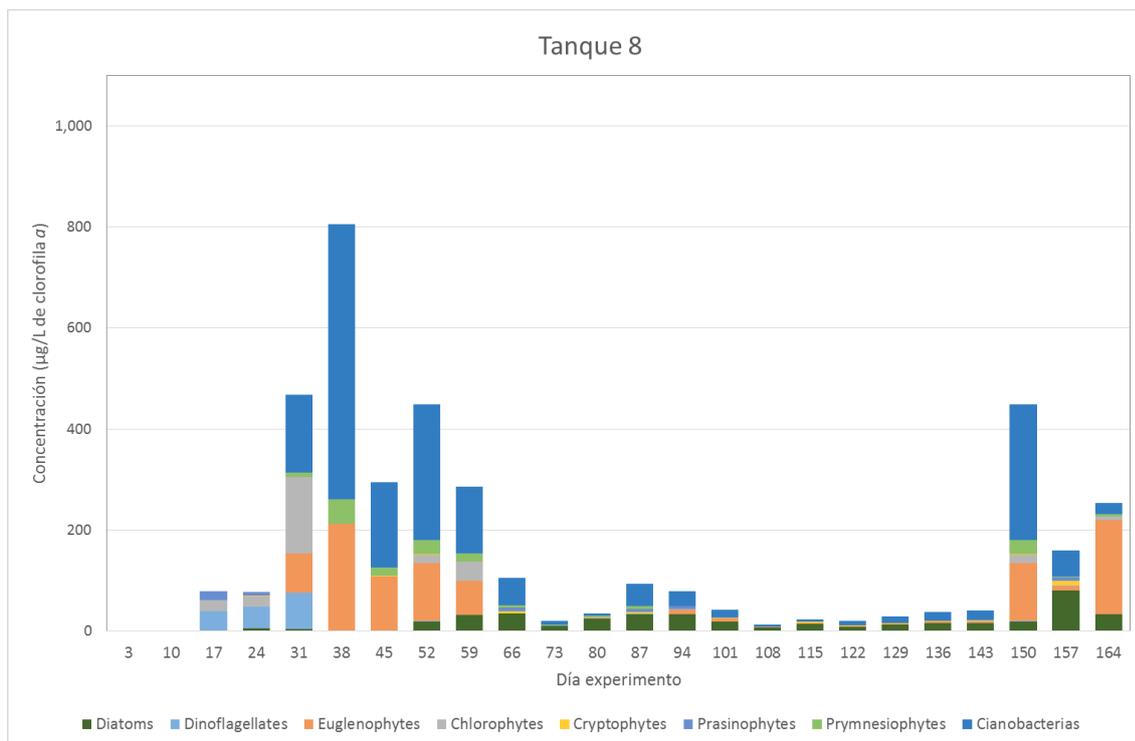


Figura 15. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 8

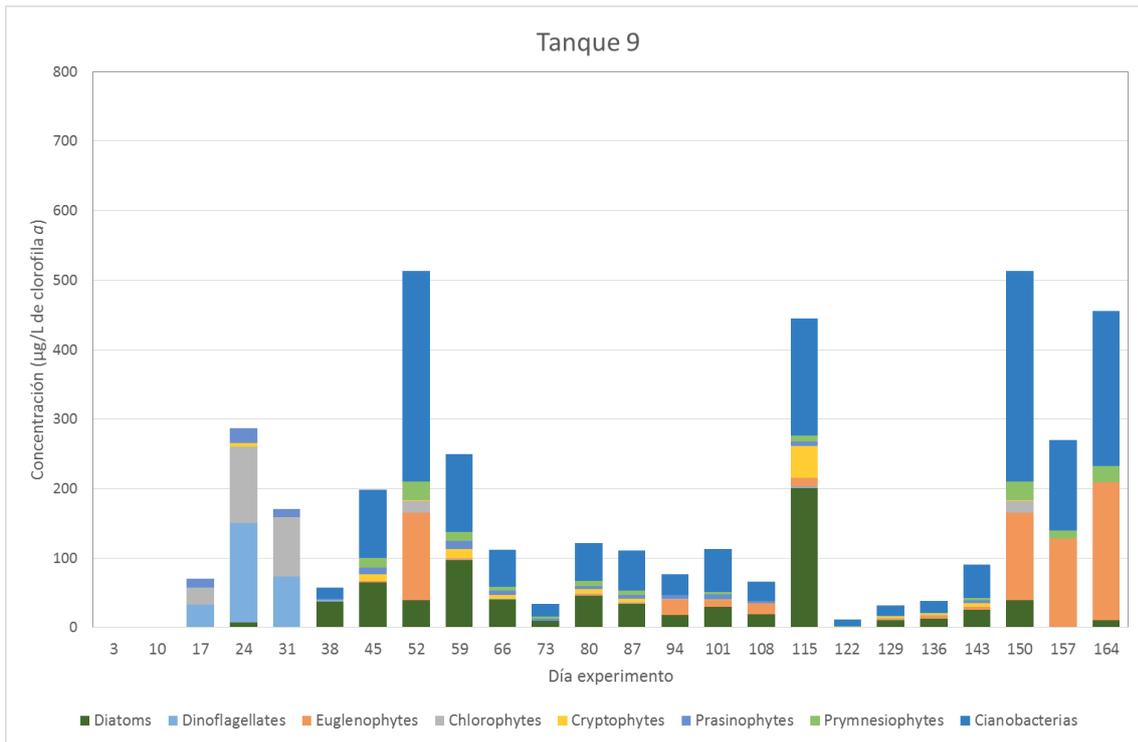


Figura 16. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 9

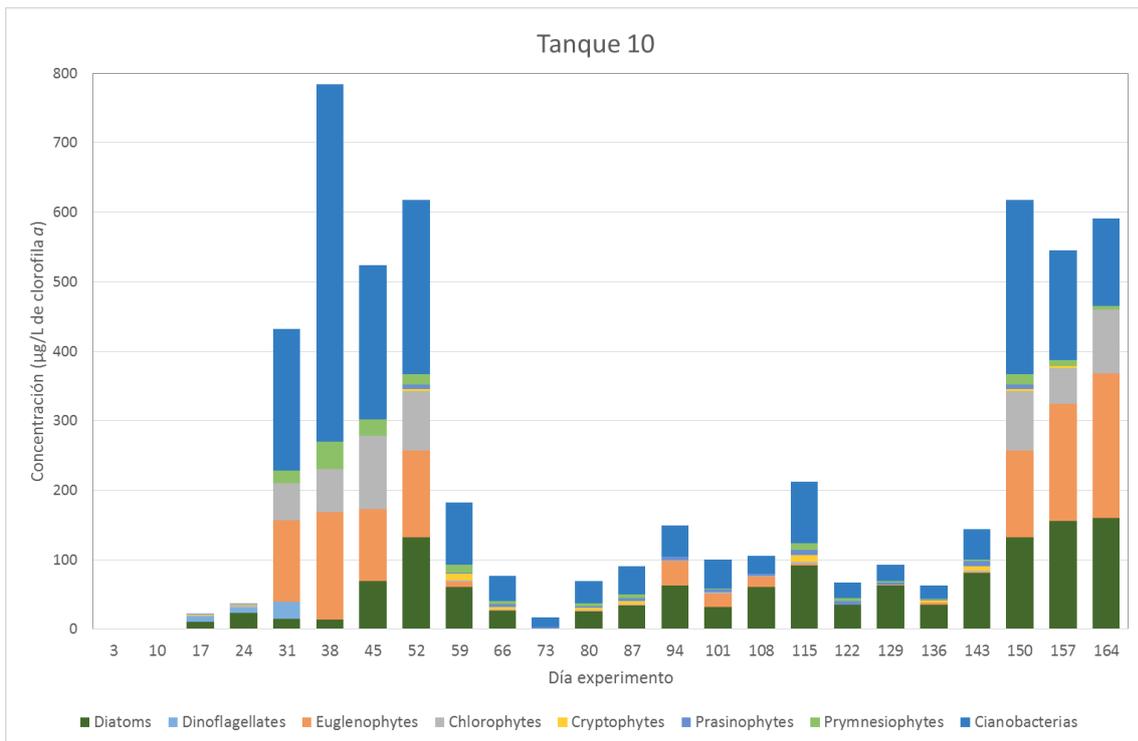


Figura 17. Evolución de los grupos fitoplanctónicos. Tanque 10

El rango de variación de los niveles de clorofila *a* se encuentra por encima de los valores obtenidos en estudios similares como Yussof *et al.* (2002) en el que se alcanzan valores de 243 $\mu\text{g/L}$.

Las variaciones de biomasa observadas son habituales en este tipo de sistemas y se ven influidas entre otros parámetros por la temperatura (Lemonnier *et al.*, 2016), tal y como se analiza a continuación.

En segundo lugar, se procede a comprobar si las variables estudiadas siguen una distribución normal. Se presenta en la Tabla 8 el análisis de la normalidad de las variables físico-químicas y en la Tabla 9 el de los grupos fitoplanctónicos, según los coeficientes de asimetría y curtosis. En el *Anexo 3* se incluyen los histogramas para poder observar la distribución de estos datos.

Tabla 8. Resultado estudio normalidad en parámetros físico-químicos.

	Asimetría	Curtosis	Distribución normal
pH día recogida muestra	-6.450	4.172	No
pH media semanal	0.686	-0.314	Sí
NH ₄ ⁺ día recogida muestra (mg/L)	31.999	133.015	No
NH ₄ ⁺ media semanal (mg/L)	41.552	194.005	No
PO ₄ ³⁻ día recogida muestra (mg/L)	10.656	9.737	No
PO ₄ ³⁻ media semanal (mg/L)	8.442	4.732	No
NO ₂ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	2.563	-3.733	No
NO ₂ ⁻ media semanal (mg/L)	3.252	-3.826	No
NO ₃ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	7.274	0.942	No
NO ₃ ⁻ media semanal (mg/L)	6.07	-0.786	No
Tª día recogida muestra (°C)	-5.473	1.149	No
Tª media semanal (°C)	-4.619	0.254	No
Intensidad lumínica (Lux)	2.07	-2.17	No
Sólidos Suspendidos Totales (g/L)	8.562	8.469	No

Tabla 9. Resumen estudio de Normalidad en grupos de fitoplancton.

	Asimetría	Curtosis	Distribución normal
Diatomeas (µg/L de chl <i>a</i>)	6.76	2.16	No
Diatomeas (Tanto por uno)	1.99	-1.78	Sí
Dinoflagelados (µg/L de chl <i>a</i>)	29.50	90.42	No
Dinoflagelados (Tanto por uno)	18.66	26.38	No
Euglenofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	11.56	10.49	No
Euglenofíceas (Tanto por uno)	8.29	5.35	No
Clorofíceas(µg/L de chl <i>a</i>)	24.55	67.91	No
Clorofíceas (Tanto por uno)	15.00	20.59	No
Criptofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	22.44	70.87	No
Criptofíceas (Tanto por uno)	10.14	14.24	No
Prasinofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	10.32	11.27	No
Prasinofíceas (Tanto por uno)	15.31	25.71	No
Primnesiofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	13.93	19.77	No
Primnesiofíceas (Tanto por uno)	5.39	4.91	No
Cianobacterias (µg/L de chl <i>a</i>)	16.26	28.37	No
Cianobacterias (Tanto por uno)	-1.00	-0.70	Sí

Como se observa en estas dos tablas, solo el porcentajes de diatomeas y de cianobacterias, y el pH medio de la semana, se comportan siguiendo una distribución normal.

A continuación, se analizará la homocedasticidad de la varianza. Para ello se ha realizado el Test de Levene para cada una de las variables, comparando las varianzas de los distintos tanques que se presentan en el estudio. Se ha creado una columna en la Tabla 10, en que se especifica si la variable analizada cumple la condición de homocedasticidad de la varianza.

Tabla 10. Resultado Levene's Test

	P-Valor	Cumplimiento
pH día recogida muestra	0.999	Sí
pH media semanal	0.913	Sí
NH ₄ ⁺ día recogida muestra (mg/L)	0.028	No
NH ₄ ⁺ media semanal (mg/L)	0	No
PO ₄ ³⁻ día recogida muestra (mg/L)	0.527	Sí
PO ₄ ³⁻ media semanal (mg/L)	0.074	Sí
NO ₂ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	0.748	Sí
NO ₂ ⁻ media semanal (mg/L)	0.780	Sí
NO ₃ ⁻ día recogida muestra (mg/L)	0.912	Sí
NO ₃ ⁻ media semanal (mg/L)	0.919	Sí
Tª día recogida muestra (°C)	0.954	Sí
Tª media semanal (°C)	0.986	Sí
Intensidad lumínica (Lux)	0.916	Sí
Sólidos Suspendidos Totales (g/L)	0.911	Sí
Diatomeas (Tanto por uno)	0.414	Sí
Dinoflagelados (Tanto por uno)	0	No
Euglenofíceas (Tanto por uno)	0.284	Sí
Clorofíceas (Tanto por uno)	0.029	No
Criptofíceas (Tanto por uno)	0.075	Sí
Prasinofíceas (Tanto por uno)	0.176	Sí
Primnesiofíceas (Tanto por uno)	0	No
Cianobacterias (Tanto por uno)	0.662	Sí
Diatomeas (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No
Dinoflagelados (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No
Euglenofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No
Clorofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No
Criptofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	0.075	Sí
Prasinofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	0.001	No
Primnesiofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No
Cianobacterias (µg/L de chl <i>a</i>)	0	No

Aquellas variables cuyo P-valor supera el valor límite 0.05 se puede afirmar, con un 95% de confianza que cumplen la condición de homocedasticidad.

6.4. Análisis multivariado.

6.4.1. Análisis de correlaciones

En primer lugar se analizan las correlaciones entre los distintos parámetros físico-químicos y los grupos fitoplanctónicos presentes, los resultados se muestran en la Tabla 11. La correlación entre los distintos grupos fitoplanctónicos se presenta en la Tabla 12.

Tabla 11. Análisis de correlación de variables físico-químicas versus grupos fitoplanctónicos.

	Diatomeas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Dinoflagelados ($\mu\text{g/L chl } a$)	Euglenofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Clorofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Criptofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Prasinofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	Cianobacterias ($\mu\text{g/L chl } a$)
pH	-0.245**	0.343**	-0.080	0.194**	-0.101	0.108	-0.041	-0.058
NH ₄ ⁺ (mg/L)	-0.290**	0.211**	-0.211**	0.028	-0.223**	0.072	-0.153*	-0.167*
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.232**	-0.436**	0.313**	0.030	-0.062	-0.267**	0.189**	0.255**
NO ₂ ⁻ (mg/L)	0.094	-0.147*	0.027	-0.053	0.053	0.090	0.118	0.089
NO ₃ ⁻ (mg/L)	0.073	-0.301**	0.201**	0.068	-0.251**	-0.207**	-0.101	0.037
T _a (°C)	-0.051	0.316**	-0.201**	0.250**	-0.022	0.089	0.095	0.012
Sólidos suspendidos totales (g/L)	0.222**	-0.373**	0.442**	-0.113	0.108	-0.266**	0.284**	0.347**
Intensidad lumínica (Lux)	0.174*	-0.060	0.352**	0.251**	-0.106	-0.077	0.041	0.244**

**P<0.01, *P<0.05

Tabla 12. Análisis de correlaciones entre grupos fitoplanctónicos ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*).

	Diatomeas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Euglenofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Criptofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Prasinofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	Cianobacterias ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)
Diatomeas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)	1	0,122	0,096	0.344**	0.523**	0.210**	0,109	0.263**
Dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)		1	-0.156*	0.268**	0.555**	0.371**	-0,003	-0,0123
Euglenofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)			1	0.160*	0,038	-0.501**	0.561**	0.748**
Clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)				1	-0,020	-0.190**	0,061	0.169*
Criptofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)					1	0.374**	0.268**	0.280**
Prasinofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)						1	-0.368**	-0.362**
Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)							1	0.868**
Cianobacterias ($\mu\text{g/L}$ chl <i>a</i>)								1

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Las correlaciones estadísticamente significativas de los distintos grupos fitoplanctónicos son las mismas para las variables medidas en el mismo día de muestreo que para el valor medio de la semana previa al muestreo. Así pues, a partir de aquí se analizarán únicamente los valores medidos en el mismo día de muestreo del fitoplancton, descartando que el análisis de la media semanal pueda aportar mayor información.

Como se ve en la Tabla 11 el pH presenta una correlación estadísticamente significativa directa con los dinoflagelados y las clorofíceas, e inversa con las diatomeas. Los valores de pH observados varían en el siguiente rango de 6.41 - 8.57. Cabe decir que dentro de un rango entre 7 y 9 pueden crecer todos los grupos fitoplanctónicos observados (Hinga *et al.*, 2002). El pH sufre una disminución a lo largo del experimento, debido a la continua degradación de la materia orgánica aportada a un agua sin renovación. El progresivo aumento de la tasa de respiración y los procesos metabólicos, aumentan la concentración de CO₂ en los bioflóculos (Furtado *et al.*, 2011) y estas variaciones de CO₂ modifican el pH del agua. Los valores de pH inferiores a 7 se observaron la semana del 5 al 11 de septiembre, y se inició un proceso de corrección del pH añadiendo diariamente alcalinidad en forma de carbonato cálcico (CaCO₃). Se añadieron entre 20 y 25 gramos de CaCO₃ por tanque y día.

Por lo que se refiere a los nutrientes el amonio presenta una correlación estadísticamente significativa negativa con la mayoría de grupos (diatomeas, euglenofíceas, criptofíceas, primnesiofíceas y cianobacterias), mientras que esta correlación es positiva con los dinoflagelados. Es decir, a mayores niveles de amonio se hallan mayores abundancias de dinoflagelados. El fosfato presenta una correlación estadísticamente significativa positiva con diatomeas, euglenofíceas, primnesiofíceas y cianobacterias, y por el contrario, negativa con dinoflagelados y prasinofíceas. Es decir, el comportamiento de los fosfatos respecto a los distintos grupos fitoplanctónicos es inverso al del amonio. Los nitritos únicamente presentan una correlación estadísticamente significativa inversa con los dinoflagelados. A mayor concentración de nitritos menor abundancia de dinoflagelados. Por último, los nitratos únicamente se correlacionan de forma positiva significativa con las euglenofíceas, mientras que presentan una correlación negativa significativa con dinoflagelados, criptofíceas y prasinofíceas.

Hay 2 grupos de fitoplancton que presentan abundancias significativamente superiores a temperaturas más altas, éstos son los dinoflagelados y las clorofíceas. Mientras que las euglenofíceas presentan abundancias significativas superiores a temperaturas más bajas.

Los sólidos suspendidos totales se correlacionan positivamente de forma estadísticamente significativa con diatomeas, euglenofíceas, primnesiofíceas y cianobacterias. En este sistema cerrado el material suspendido está formado principalmente por flóculos de bacterias y fitoplancton, lo que explica esta correlación significativa con los grupos más abundantes de fitoplancton (Brito *et al.*, 2014). Presenta, además una relación estadísticamente significativa inversa con dinoflagelados y prasinofíceas. Grupos que se dan en los cultivos cuando la abundancia total de fitoplancton es menor.

Vemos como aquellos grupos que presentan correlación estadísticamente representativa con la intensidad lumínica la presentan de manera directa.

La correlación entre los distintos grupos fitoplanctónicos observada en la Tabla 12, muestra que los dos grupos fitoplanctónicos más abundantes, diatomeas y cianobacterias presentan una correlación positiva estadísticamente significativa entre ellos. Por otra parte, es destacable la correlación inversa estadísticamente significativa entre dinoflagelados y euglenofíceas. Los dinoflagelados son más abundantes al inicio del experimento (ver figuras 11, 12 y 16), cuando el sistema de bioflóculos aún no está maduro (hasta el día 31) y se producen aumentos del amonio. Así, se ha observado en la tabla anterior (Tabla 11) que el amonio presentaba una correlación directa con los dinoflagelados e inversa con otros grupos. En la mayoría de tanques se observa una sustitución de los dinoflagelados y las clorofíceas por las euglenofíceas, esta sustitución se produce, por lo general, a partir del día 31. A partir del día 66 del experimento la abundancia de las euglenofíceas disminuye considerablemente, y únicamente vuelven a ser importantes al final del período de estudio. Además, se identifican como grupos complementarios aquellos que se hallan presentes a lo largo de todo el período de estudio con una abundancia relativamente pequeña, los cuales se correlacionan positivamente con los grupos más abundantes.

A lo largo del experimento, que inició en mayo y finalizó en octubre, la variación de la radiación solar, temperatura y horas de insolación produjo cambios en la temperatura del agua y la intensidad lumínica que alcanzaba los tanques. Para moderar el efecto de estas variables en el cultivo se reguló la exposición al sol mediante el cubrimiento (julio) y descubrimiento (finales de septiembre) del invernadero con toldos. El todo reduce la temperatura del agua, impidiendo subidas de la temperatura por encima del óptimo para el crecimiento de los langostinos. El cubrimiento con toldo del invernadero coincide con un descenso de la abundancia de fitoplancton, especialmente de dinoflagelados, clorofíceas y euglenofíceas, quedando una comunidad formada casi exclusivamente por diatomeas y/o cianobacterias (Figuras 10 y 11).

En el análisis de correlaciones se observa que los dinoflagelados tienen una correlación significativa inversa con la temperatura. Esto coincide con la aparición de este grupo al inicio del período de estudio, con temperaturas más bajas del agua.

En la Tabla 13 se presentan los resultados del análisis de correlación entre las variables físico- químicas.

Tabla 13. Análisis de correlaciones de las variables físico químicas

	pH	NH ₄ ⁺ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	NO ₂ ⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	SST (g/L)	T ^a (°C)	IL (Lux)
pH		-0.313**	-0.691**	0.424**	-0.698**	-0.129	0.136	0.337**
NH ₄ ⁺ (mg/L)			0.200	-0.362**	0.265*	0.001	0.145	-0.088
PO ₄ ³⁻ (mg/L)				-0.425**	0.789**	0.479**	-0.177	-0.261*
NO ₂ ⁻ (mg/L)					-0.711**	-0.046	-0.194	0.234**
NO ₃ ⁻ (mg/L)						0.171	-0.063	-0.214**
SST (g/L)							-0.089	-0.051**
T ^a (°C)								0.219**
IL (Lux)								

**P<0.01, *P<0.05 SST: Sólidos suspendidos totales, IL: Intensidad lumínica

Podemos ver como el pH se encuentra relacionado de manera inversa con el amonio, el nitrato y el fosfato. Al crecer los langostinos, aumenta la cantidad de pienso que se introduce en los cultivos y aumenta la cantidad de materia orgánica que se degrada en el

medio. Se genera con ello mayor cantidad de fosfatos y nitratos y se aumenta la actividad metabólica. La mayor actividad metabólica supone un aumento de la concentración del CO₂ en el agua, y con ello se reduce el pH (Furtado, Poersch, & Wasielesky, 2011). Esto significa que la acumulación de estos nutrientes tendrá como consecuencia indirecta una disminución del pH en el medio. Este resultado se ha observado también por otros autores (Hinga, 2002).

El amonio aparece en el medio como consecuencia de la mineralización de la materia orgánica aportada. Puede ser reciclado en el sistema por tres vías: consumo fotoautotrófico por fitoplancton, incorporación directa a bacterias heterotróficas o conversión de amonio a nitrato por la acción de bacterias quimioautótrofas (Vinatea *et al.*, 2010). Este último escenario se da cuando, una vez en el medio, este compuesto es oxidado a NO₂⁻ por bacterias estrictamente autótrofas, las cuales presentan una tasa de crecimiento mucho menor que las bacterias heterótrofas encargadas de la degradación de la materia orgánica (Ferrer & Seco, 2003).

En la siguiente tabla se analizan las posibles correlaciones estadísticamente significativas entre los grupos fitoplanctónicos y el tratamiento con probiótico.

Tabla 14 Análisis de correlación entre grupos fitoplanctónicos y el tipo de tratamiento con probiótico

	Dosis de tratamiento (%)
Diatomeas ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.330**
Dinoflagelados ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.04
Euglenofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	0.026
Clorofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.133
Criptofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.065
Prasinofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.058
Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L chl } a$)	0.044
Cianobacterias ($\mu\text{g/L chl } a$)	-0.03

**P<0.01, *P<0.05

Como se puede observar en la Tabla 14, existe una correlación estadísticamente significativa inversa entre la población de diatomeas y la dosis aplicada de probiótico. Por lo tanto, a mayores dosis de tratamiento, menores poblaciones de diatomeas encontraremos en el medio.

6.4.2. Análisis de diferencias significativas

Se pretende analizar si existen diferencias estadísticamente significativas en las variables analizadas entre los distintos tanques y según las dosis de tratamiento con probiótico (0, 10 y 100% de la dosis recomendada por el fabricante).

En la Tabla 15 se presenta la prueba de análisis seleccionada en función de la normalidad de la variable estudiada y el cumplimiento de la hipótesis de homocedasticidad de las varianzas (obtenida a partir del apartado 6.3).

Tabla 15. Elección del método estadístico a utilizar

	Distribución Normal	Homogeneidad de la varianza	Método de análisis
pH día recogida muestra	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
NH ₄ ⁺ día recogida muestra (mg/L)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
PO ₄ día recogida muestra (mg/L)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
NO ₂ día recogida muestra (mg/L)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
NO ₃ día recogida muestra (mg/L)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Tª día recogida muestra (°C)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Sólidos Suspendedos Totales g/L	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Intensidad lumínica (Lux)	Sí	No	KRUSKAL-WALLIS
Diatomeas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Diatomeas (Tanto por uno)	Sí	Sí	ANOVA Simple
Dinoflagelados (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Dinoflagelados (Tanto por uno)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Euglenofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Euglenofíceas (Tanto por uno)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Clorofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Clorofíceas (Tanto por uno)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Criptofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Criptofíceas (Tanto por uno)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Prasinofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Prasinofíceas (Tanto por uno)	No	Sí	KRUSKAL-WALLIS
Primnesiofíceas (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Primnesiofíceas (Tanto por uno)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Cianobacterias (µg/L de chl <i>a</i>)	No	No	KRUSKAL-WALLIS
Cianobacterias (Tanto por uno)	Sí	Sí	ANOVA Simple

A continuación, presentamos en las tablas siguientes los resultados del análisis. En la Tabla 16 se presentan las variables físico-químicas. En las Tablas 17 y 18 los grupos fitoplanctónicos, en abundancia absoluta y relativa.

Tabla 16. Resultado análisis de diferencias significativas. Parámetros físico-químicos

	Tanque	Tratamiento
	P-valor	P-valor
pH día recogida muestra	0.994	0.898
NH ₄ ⁺ día recogida muestra (mg/L)	0.128	0.174
PO ₄ día recogida muestra (mg/L)	0.998	0.943
NO ₂ día recogida muestra (mg/L)	0.993	0.647
NO ₃ día recogida muestra (mg/L)	0.984	0.882
Tª día recogida muestra (°C)	0.052	0.137
Sólidos Suspendidos Totales g/L	0.327	0.029
Intensidad lumínica (Lux)	0.121	0.723

Únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas en los sólidos suspendidos en función del tratamiento aplicado al sistema.

En la figura siguiente observamos el gráfico de caja-bigotes en que se pueden observar las diferencias en los sólidos suspendidos totales en función de la dosis de tratamiento aplicada.

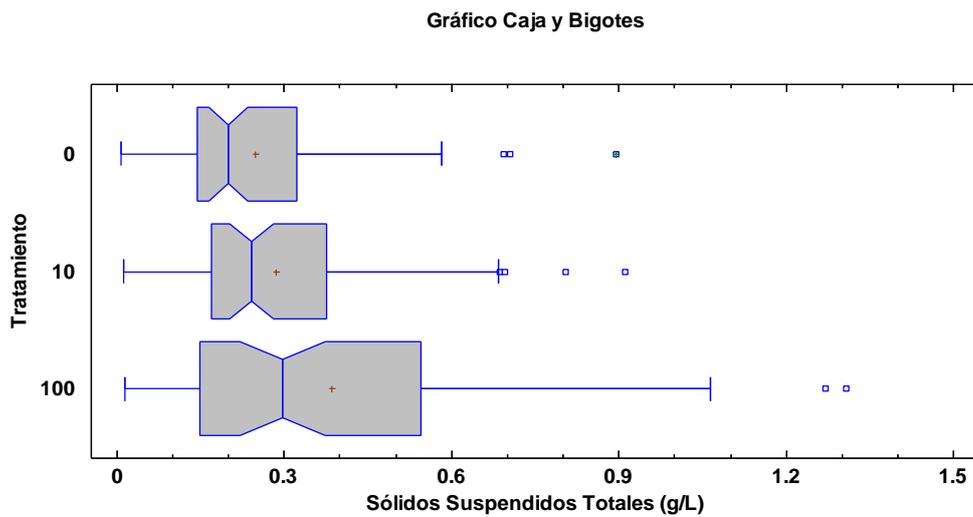


Figura 18. Gráfico de caja y bigotes para los sólidos suspendidos totales según la dosis de tratamiento aplicada

Como vemos en la Figura 18, los valores de Sólidos Suspendidos Totales son mayores al aplicar mayores dosis de tratamiento con probiótico en el medio. Este resultado, se corresponde a los resultados obtenidos en estudios similares (Brito *et al.*, 2014).

No existen diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros físico-químicos, ni entre los distintos tanques del experimento, ni entre las distintas dosis de tratamiento con probiótico. Esto coincide con lo observado por de Paiva-Maia *et al.* (2013).

Tabla 17. Resultados del análisis de diferencias significativas para abundancia absoluta de grupos fitoplanctónicos.

	Tanque	Tratamiento
	P-valor	P-valor
Diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0	0
Dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.211	0.682
Euglenofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.431	0.731
Clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.001	0.12
Criptofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.214	0.028
Prasinofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.562	0.154
Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.438	0.574
Cianobacterias ($\mu\text{g/L}$ de chl <i>a</i>)	0.293	0.34

Únicamente se observan las siguientes diferencias significativas. Las diatomeas presentan diferencias tanto entre tanques como entre tratamientos. Las clorofíceas presentan diferencias entre tanques y las criptofíceas entre dosis de tratamiento. En los siguientes gráficos de caja-bigotes se analiza donde se presentan estas diferencias.

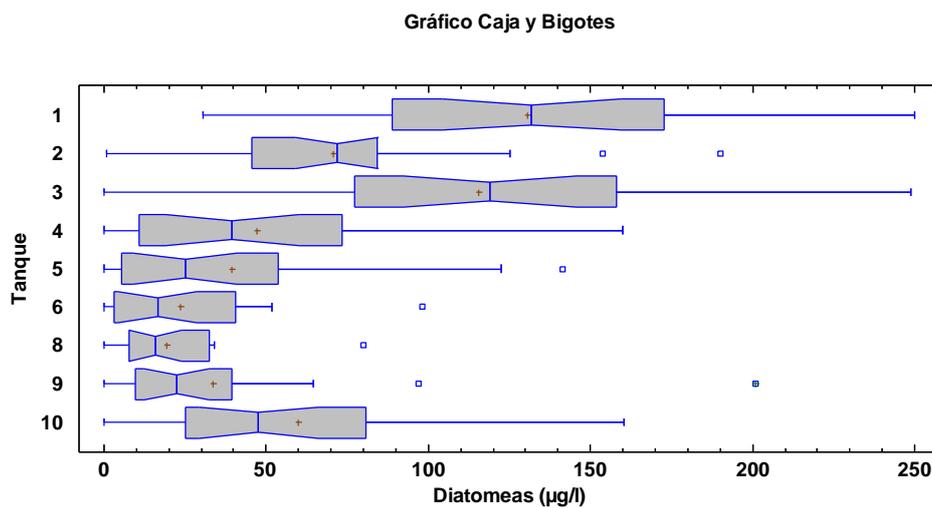


Figura 19. Gráfico de caja y bigotes para las diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*) según el tanque

Las diatomeas tienen diferencias significativas entre los tanques 1 y 3 y el resto de tanques. Esto corrobora lo observado en los gráficos de evolución temporal (Figuras 9 a 17), en los que se describía una mayor abundancia de diatomeas a lo largo de todo el período de estudio. Además, los tanques 2 y 10 presentan abundancias de diatomeas superiores al resto de tanques, aunque inferiores a los tanques 1 y 3.

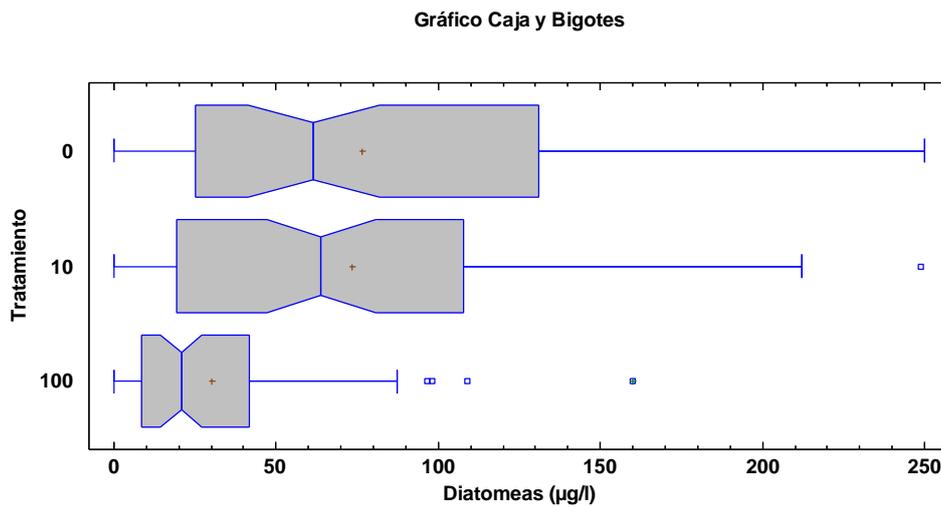


Figura 20. Gráfico de caja y bigotes para las diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*) según el tratamiento aplicado

En la Figura 20 se observa que los tanques en los que se ha utilizado el 100% de la dosificación de probiótico recomendada por el fabricante, presentan una abundancia significativamente inferior al resto de dosificaciones. En relación a las diferencias observadas entre tanques, cabe destacar que los tanques 1 y 3, presentan dosificaciones del 0 y el 10% respectivamente, las cuales no producen diferencias significativas.

Gráfico Caja y Bigotes

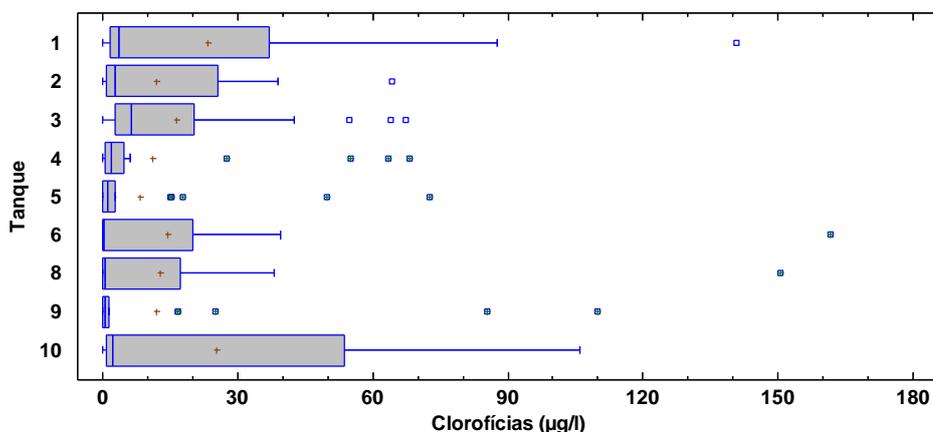


Figura 21. Gráfico de caja y bigotes para clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*) según el tanque

Las clorofíceas presentan un valor medio muy influido por los valores extremos, así la media y la mediana se hallan muy distanciadas en todos los tanques. El valor considerablemente inferior de la media nos indica que en general este grupo es muy poco abundante, y que la media no es representativa del período estudiado. Los tanques 4, 5 y 9 presentan abundancias significativamente inferiores al resto.

Gráfico Caja y Bigotes

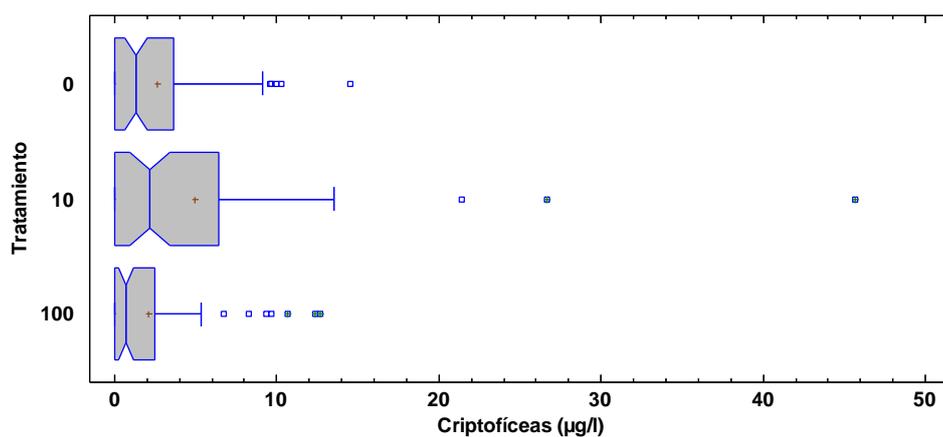


Figura 22. Gráfico de caja y bigotes para criptofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*) según el tratamiento aplicado

En la Figura 22 se observa que las criptofíceas son significativamente menos abundantes en los tanques tratados con un 100% de la dosis de probiótico recomendada por el fabricante.

A continuación, se analizan las diferencias significativas entre tanques y tratamientos de cada uno de los grupos fitoplanctónicos en función de su abundancia relativa sobre el total de fitoplancton.

Tabla 18. Resultado análisis de diferencias significativas en la abundancia relativa de grupos fitoplanctónicos

	Tanque	Tratamiento
	P-valor	P-valor
Diatomeas (Tanto por uno)	0	0.003
Dinoflagelados (Tanto por uno)	0.949	0.502
Euglenofíceas (Tanto por uno)	0.195	0.236
Clorofíceas (Tanto por uno)	0.047	0.475
Criptofíceas (Tanto por uno)	0.893	0.321
Prasinofíceas (Tanto por uno)	0.505	0.892
Primnesiofíceas (Tanto por uno)	0.017	0.264
Cianobacterias (Tanto por uno)	0	0.285

Únicamente existen diferencias significativas en los grupos de diatomeas, clorofíceas, primnesiofíceas y cianobacterias.

En el grupo de las diatomeas, se observa una diferencia significativa tanto entre tanques (Figura 23) como en las distintas dosis de tratamiento (Figura 24). En este caso, al tratarse de una distribución normal de datos, utilizamos el gráfico de intervalos LSD de Fisher para realizar la comparativa.

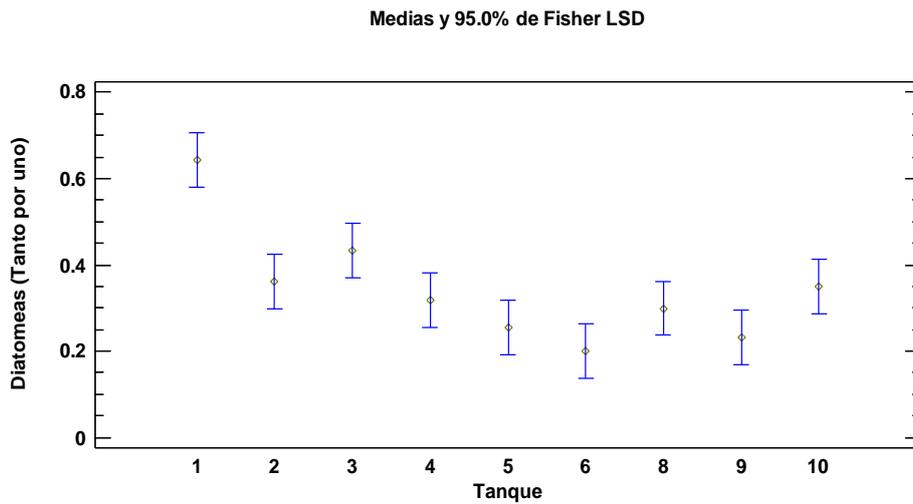


Figura 23. Gráfico LSD de Fisher para diatomeas (Tanto por uno) por tanque

Se puede observar en la Figura 23 como el tanque 1 presenta valores superiores al resto, presenta una diferencia estadísticamente significativa. Además, se extrae que el tanque 3 presenta valores ligeramente superiores, lo que corrobora la diferencia establecida con anterioridad de los tanques 1 y 3 frente al resto.

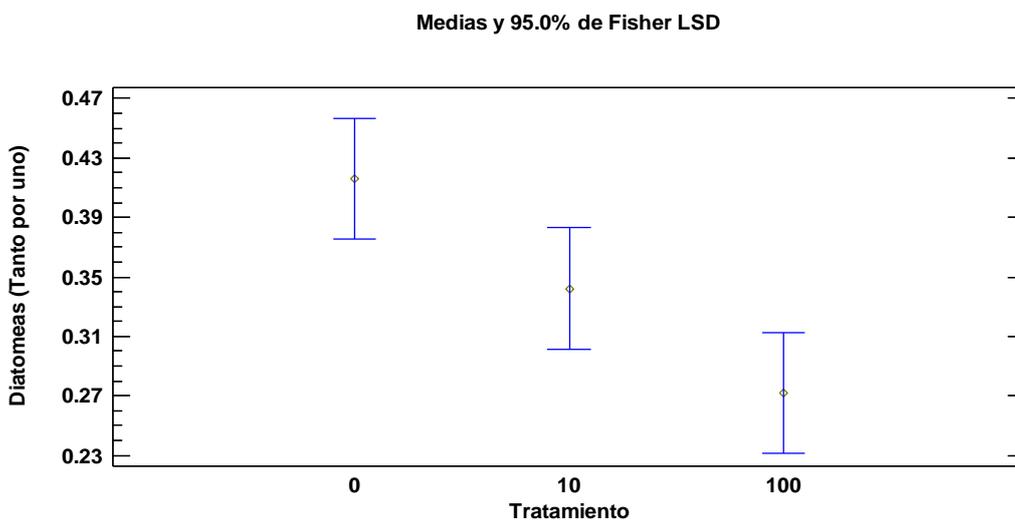


Figura 24. Gráfico LSD de Fisher para diatomeas (Tanto por uno) por tratamiento

Se puede ver en esta figura como existente diferencias significativas en la presencia de las diatomeas respecto al total de fitoplancton en función del tratamiento aplicado. Estas diferencias se encuentran entre la aplicación del 100% de la dosis de probiótico y la no aplicación de este.

Por otro lado, se observa en la Figura 25. el gráfico de caja y bigotes correspondiente al peso del grupo de clorofíceas en función del tanque del que procedan las muestras.

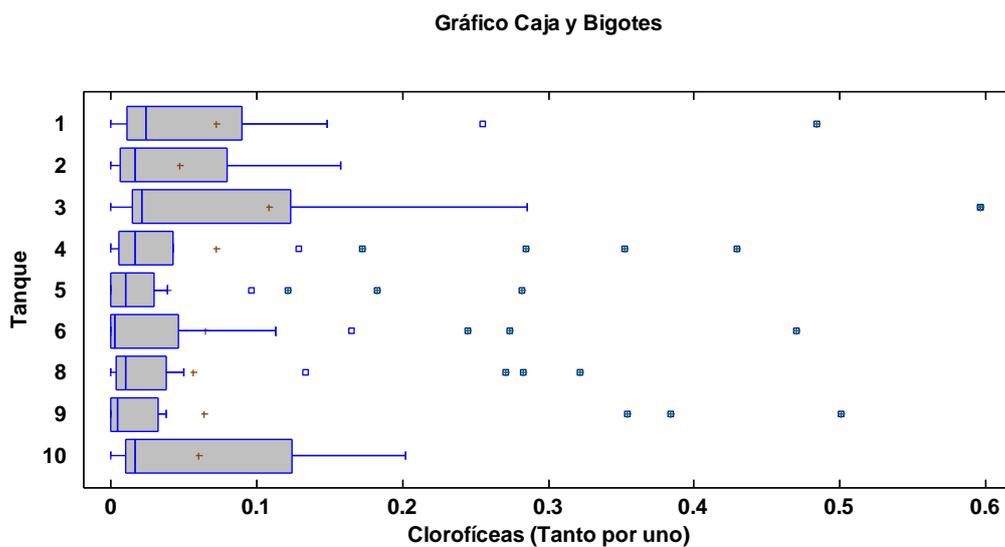


Figura 25. Gráfico caja y bigotes para clorofíceas (Tanto por uno) por tanque

Se observa en esta figura la diferencia entre las medias y las medianas observada con anterioridad. Se puede apreciar, además como los tanques 1, 2, 3 y 10 presentan un porcentaje en tanto por uno mayor de clorofíceas que el resto de los tanques.

A continuación se puede ver el gráfico correspondiente a las diferencias existentes entre los ratios de primnesiofíceas en función del tanque estudiado.

Gráfico Caja y Bigotes

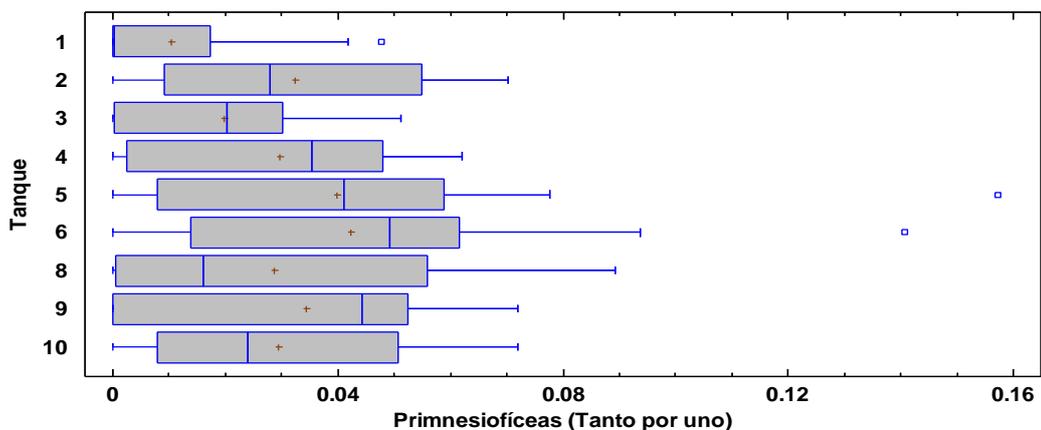


Figura 26. Gráfico caja y bigotes para primnesiofíceas (Tanto por uno) por tanque
En la Figura 26 se observa como los tanques 1 y 3 presentan valores menores de porcentajes de primnesiofíceas que el resto.

Gráfico Caja y Bigotes

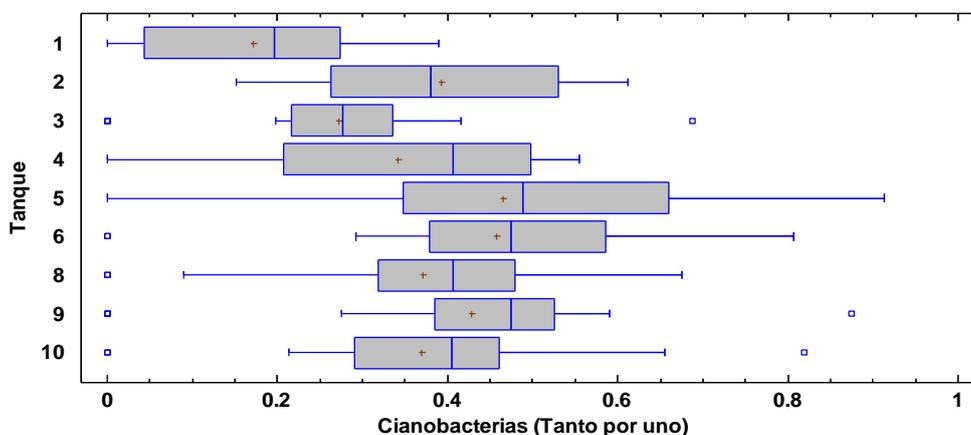


Figura 27. Gráfico de caja y bigotes para cianofíceas (Tanto por uno) por tanque
Se puede extraer de la Figura 27 que el tanque 1 presenta una diferencia estadísticamente significativa con el resto, presentando porcentajes menores de cianobacterias. El tanque 3 también presenta valores bajos, pero no se puede determinar que sean significativamente distintos del resto de tanques.

7. Conclusiones

Los resultados observados en las variaciones de la calidad del agua y los grupos fitoplanctónicos son semejantes a los observados en otros estudios de sistemas de bioflóculos:

- Se han alcanzado valores de clorofila *a* cercanos a 1100 µg/L.
- Se presenta una clara dominancia de los grupos diatomeas y cianobacterias.
- El amonio presenta una relación estadísticamente significativa inversa con la mayor parte de los grupos fitoplanctónicos estudiados, con excepción de los dinoflagelados.
- El fosfato presenta una relación directa con los grupos fitoplanctónicos a excepción de dinoflagelados y prasinofíceas.
- La aplicación mayores dosis de tratamiento con probiótico da lugar a concentraciones absolutas menores de diatomeas y criptofíceas, así como mayores concentraciones de sólidos suspendidos totales.

8. Campos futuros de estudio

A lo largo del estudio se ha observado que existe una gran cantidad de bibliografía en la que se estudia la utilización de un probiótico en acuicultura. Estos estudios investigan las consecuencias de este tratamiento sobre las poblaciones de los organismos cultivados o sobre la población bacteriana. En cambio, el estudio del impacto de la aplicación de probiótico sobre la población fitoplanctónica prácticamente no se ha estudiado.

Dado que se han descrito distintos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados en los distintos grupos fitoplanctónicos, sería interesante estudiar el efecto de la comunidad fitoplanctónica en relación a su valor nutricional. En esta línea sería interesante el estudio del consumo de fitoplancton por parte de los langostinos mediante el análisis de pigmentos en las heces de estos organismos.

9. Bibliografía

- Ansio, M. (2008). Clasificación taxonómica de fitoplancton mediante HPLC. Alicación a Programas de Vigilancia Ambiental en jaulas flotantes del Mediterraneo occidental. UPV.
- APHA. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, EUA.: American Public Health Association.
- APROMAR. (2016). *La acuicultura en España 2016. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos en España*. APROMAR.
- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264 (1), 140-147.
- Baumgarten, M. Z., de Barros Rocha, J. M., & Niencheski, L. H. (1996). *Manual de análisis em oceanografía química*. Rio Grande, Brasil.
- Brito, L. O., Vinatea, L. A., Borda, R., Severi, W., Miranda, R. H., Bezerra, S. M., . . . Olivera, A. (2014). Water quality, phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with *Gracilaria Birdiae* (Greville) and *Glacilaria domingensis* (Kützing). *Aquaculture international* 22, 1649-1664.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331.
- Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C. (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232, 525-537.
- Claustre, H., Hooker, S., Vn Heukelem, L., Berthon, J.-F., Barlow, R., Ras, J., . . . Marty, J.-C. (2003). An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using in situ samples: application to remote sensing and database activities. *Marine chemistry*, 41-61.
- Crab, R., Defroit, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356, 351-356.
- de Paiva-Maia, E., Alves-Modesto, G., Otavio-Brito, L., Olivera, A., & Vasconcelos-Gesteira, T. C. (2013). Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41, 126-137.
- de Schryver, P., Crab, R., Defroit, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3), 125-137.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358.

- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma.
- Ferrer, J., & Seco, A. (2003). *Tratamientos biológicos de aguas residuales*. Universitat politècnica de València.
- Fundación Observatorio español de Acuicultura. (2015). *Plan estratégico Plurianual de la Acuicultura Española 2014- 2020*. Madrid, España.
- Furtado, P. S., Campos, B. R., Serra, F. P., Klosterhoff, M., Romano, L. A., & Wasielesky Jr., W. (2015). Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*, 315-327.
- Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 321, 130-135.
- Grasshoff, K. (1976). *Methods of Seawater Analysis*. . *Verlag Chemie: weinstein*.
- Hinga, K. R. (9 de Agosto de 2002). Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine ecology progress series*, 238, 281-300.
- Hooker, S. B., Claustre, H., Ras, J., Van Heukelem, L., Berthon, J. F., Targa, C., . . . Sessions, H. (2000). The JRC Method. En F. (. Hooker.S.B., *The First Sea WiFS HPLC Analysis Round-Robin Experiment (SeaHARRE-1)*. *NASA Technical Memorandum 2000-206892, Vol 14* (págs. 54 pp,). Greenbelt, MD: NASA Goddard Space Flight Center
- Jefatura del Estado. (25 de Junio de 1984). Ley 23/1984, de 25 de junio, de cultivos marinos. «BOE» núm. 153, de 27 de junio de 1984.
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. C., & Wright, S. W. (1997). Filtration and storage of pigments from microalgae. En S. W. Jeffrey, R. C. Mantoura, & S. W. Wright, *Phytoplankton pigment in oceanography: Guidelines to modern methods*. París: Unesco publishing.
- Labarta, U. (2007). El desarrollo de la acuicultura en España. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 669-685.
- Latasa, M. (11 de January de 2007). Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. *Marine Ecology Progress Series Vol.329*, 13-21.
- Latasa, M., van Lenning, K., Garrido, J. L., Scharek, R., Estrada, M., Rodríguez, F., & Zapata, M. (2001). Losses of Chlorophylls and Carotenoids in Aqueous Acetone and Methanol Extracts Prepared for RPHPLC Analysis of Pigments. *Cromatographia*, 385-391.
- Lemonnier, H., Lantoiné, F., Courties, C., Guillebault, D., Nézan, E., Chomérat, N., . . . Laugier, T. (2016). Dynamics of phytoplankton communities in eutrophying

- tropical shrimp ponds affected by vibriosis. *Marine Pollution Bulletin* 110, 449-459.
- Lin, Y.-C., & Chen, J.-C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Experimental marine biology and ecology*, 109-119.
- Lin, Y.-C., & Chen, J.-C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224, 193-201.
- Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., & Liu, C.-H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 837-844.
- Mackey, M. D., Higgins, H. W., Mackey, D. J., & Wright, S. W. (1997). *Chemtax User's Manual: a program for estimating class abundances from chemical markers-application to HPLC measurements of phytoplankton pigments*. Hobart, Australia: Csiro marine laboratories Report 229.
- MAPAMA. (25 de 02 de 2017). *Ministerio de agricultura, pesca, alimentación y medio ambiente*. Obtenido de http://www.mapama.gob.es/app/jacumar/normativa/Buscador_Listado.aspx?idccaa=22#app_section
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*.27, 31-36.
- National Institute of Oceanography. (2004). *Phytoplankton Manual*.
- National Oceanic and Atmospheric Administration FISHERIES. (03 de 02 de 2017). What is aquaculture? U.S.A.
- Nootong, K., & Pavasant, P. (2011). Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. *World Aquaculture society*, Vol.42, No.3, 339-347.
- Pérez, I. (2014). *Análisis de la comunidad fitoplanctónica en una playa receptora de descargas de agua dulce (Gandía, Valencia). Época de sequía y época de lluvias*. Gandía.
- Pinckney, J. L., Millie, D. F., & Van Heukelem, L. (2011). Update on filtration, storage and extraction solvents. En S. Roy, C. Llewellyn, E. S. Egeland, & G. Johnsen, *Phytoplankton Pigments* (págs. 625-632). New York: Cambridge university press.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., & Leffer, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimps (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299, 89-98.

- Read, P., & Fernandes, T. (2003). Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture* 226, 139-163.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms. Biology & Morphology of the genera*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Schlüter, L., Mohlenberg, F., Havskum, H., & Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine ecology progress series* 192, 49-63.
- Sebastià, M. T. (2006). *Determinación de pigmentos fotosintéticos mediante HPLC en el estany de Cullera. Puesta a punto de la metodología de análisis*. Valencia.
- Secretaria de pesca y acuicultura. (2007). *Pesquerías de calamar y langostino. Situación actual*. Argentina.
- Sosik, H. M. (1999). Storage of marine particulate samples for light-absorption measurements. *Limnology Oceanography*, 44, 1139-1141.
- Spector, D. L. (1984). *Dinoflagellates*. Orlando, Florida: Academic Press, Inc.
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., & Fang, J.-G. (2009). Ecological engineering in aquaculture- Potencial for integrate aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* 297, 1-9.
- UNESCO. (1978). *Phytoplankton manual*. París: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.
- Vinatea, L., Gálvez, A. O., Browdy, C. L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., . . . Leffler, J. W. (2010). Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquaculture Engineering* 42, 17-24.
- Wasielesky Jr., W., Atwood, H., Stokes, A., & Browdy, C. L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396-403.
- Wright, S. W., Jeffrey, S., Mantoura, R., Llewellyn, C. A., Bjornland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology progress series*, 183-196.
- Xu, W.-J., Pan, L.-Q., Zhao, D.-H., & Huang, J. (2012). Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 350-353, 147-153.

Yussof, F. M., Zubaidah, M. S., Matias, H. B., & Kwan, T. S. (2002). Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. *Aquaculture Research* 33, 269-278.

Anexo 1. Concentraciones de pigmentos por muestra, tanque y día

La identificación de las muestras sigue el siguiente código:

FFX: Siendo X el Número del tanque analizado. (No existe tanque 7. por lo que este valor oscila entre el 1 y el 10.

Los **cuatro números** siguientes indican el día y mes de la recolección de la muestra.

Ejemplo: FF4-0306 se corresponde con la muestra obtenida del tanque número 4 el día 3 de junio.

Tabla 19. Concentraciones de pigmentos por muestra.

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF01-2705	0.49	2.53	0.00	0.00	0.00	0.39	0.20	0.00	0.30	7.00	58.59
FF02-2705	0.97	0.60	0.00	0.00	0.20	0.40	0.00	0.00	0.42	0.90	2.75
FF03-2705	50.42	3.66	0.00	0.00	12.31	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	85.97
FF04-2705	61.83	0.40	0.00	0.00	10.73	23.21	0.00	0.00	0.00	0.00	96.91
FF05-2705	2.58	20.01	0.00	0.61	0.62	1.75	0.00	0.00	0.43	0.00	39.83
FF06-2705	23.51	0.72	0.00	0.00	3.39	6.89	0.00	0.00	0.00	0.00	37.08
FF08-2705	49.78	0.62	0.00	0.00	8.42	18.36	0.00	0.00	0.00	0.00	78.44
FF09-2705	38.12	0.62	0.00	0.00	5.41	16.82	0.00	0.00	0.00	0.00	70.35
FF10-2705	10.53	3.31	0.00	0.00	0.86	2.56	0.00	0.00	0.00	0.00	22.71
FF01-0306	3.75	60.70	0.00	0.88	4.48	11.20	0.00	0.00	0.00	0.00	109.59
FF02-0306	10.18	2.60	0.00	0.00	1.21	4.05	0.00	0.00	2.08	5.08	37.86
FF03-0306	80.32	12.02	0.00	0.00	6.47	30.59	0.00	0.00	1.07	2.82	148.86
FF04-0306	111.06	1.72	0.00	0.00	8.04	38.86	0.00	0.00	0.81	0.00	156.34
FF05-0306	31.42	0.72	0.00	0.00	2.46	10.09	0.00	0.00	0.00	0.00	52.95
FF06-0306	49.01	2.47	0.00	0.00	3.60	17.01	0.00	0.00	1.17	2.66	88.74
FF08-0306	52.07	2.08	0.00	0.00	3.77	14.74	0.00	0.00	0.00	0.00	77.87

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF09-0306	170.03	0.00	0.00	0.00	10.28	69.65	0.00	0.00	0.00	0.00	286.59
FF10-0306	11.84	8.73	0.00	0.00	0.54	3.55	0.00	0.00	0.62	1.85	36.65
FF01-1006	7.66	48.23	20.53	0.00	16.34	23.29	0.00	0.00	46.86	116.64	290.70
FF02-1006	3.19	13.25	16.81	0.00	9.15	1.98	0.00	0.00	46.63	97.74	209.50
FF03-1006	0.00	9.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.25	74.96	4.36
FF04-1006	44.31	2.40	5.11	0.00	0.00	22.49	0.00	0.00	7.53	12.52	10.42
FF05-1006	4.53	25.04	2.58	0.00	6.03	3.45	0.00	0.00	15.21	33.01	4.08
FF06-1006	41.24	15.99	22.62	0.00	23.15	27.15	0.00	0.00	57.96	136.88	343.90
FF08-1006	49.25	9.82	27.13	0.00	23.39	23.27	0.00	0.00	63.68	199.11	468.52
FF09-1006	93.32	2.68	0.00	0.00	9.76	58.90	0.00	0.00	0.00	0.00	170.38
FF10-1006	15.20	22.88	25.15	0.00	13.06	7.84	0.00	0.00	60.07	176.67	431.86
FF01-1706	0.00	85.28	0.00	0.00	6.87	6.05	0.00	0.00	29.80	74.60	356.48
FF02-1706	0.00	16.88	7.41	0.00	2.45	1.82	0.00	0.00	21.36	50.22	170.27
FF03-1706	0.00	41.55	11.45	0.00	5.91	2.22	0.00	0.00	28.00	94.19	268.77
FF04-1706	2.58	19.17	5.47	0.00	2.19	1.71	0.00	0.00	20.89	40.95	138.05
FF05-1706	0.00	52.19	0.00	0.00	7.58	5.45	0.00	0.00	21.96	40.38	215.56
FF06-1706	0.00	7.97	56.32	0.00	22.78	0.00	0.00	0.00	160.79	290.80	777.74
FF08-1706	0.00	16.53	58.20	0.00	33.90	0.00	0.00	0.00	164.59	313.00	805.68
FF09-1706	2.13	20.41	0.00	0.00	1.14	1.75	0.00	0.00	6.17	0.00	57.22
FF10-1706	0.00	39.92	47.69	0.00	17.71	9.94	0.00	0.00	168.44	283.33	784.68
FF01-2406	0.00	63.90	10.64	0.00	3.76	4.07	0.00	0.00	20.89	111.31	306.39
FF02-2406	0.00	46.95	18.92	0.00	5.47	2.28	1.14	0.00	22.23	102.18	284.27
FF03-2406	0.00	39.43	14.75	0.00	7.20	2.68	0.47	0.00	28.21	108.64	314.26

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF04-2406	0.00	21.06	2.02	0.00	1.17	2.17	0.00	0.00	8.62	31.20	113.80
FF05-2406	0.00	42.88	40.24	0.00	21.81	3.04	0.00	0.00	99.01	273.34	589.55
FF06-2406	0.00	12.97	28.26	0.00	10.06	0.00	0.00	0.00	77.54	207.35	440.32
FF08-2406	0.00	6.95	18.36	0.00	9.03	0.00	0.00	0.00	45.58	139.94	294.05
FF09-2406	0.00	20.62	12.75	0.00	5.75	0.00	0.00	0.00	26.04	79.29	198.76
FF10-2406	0.00	81.22	27.91	0.00	5.55	16.05	0.00	0.00	78.47	213.55	523.63
FF01-0107	0.00	96.81	21.55	0.00	12.83	9.92	0.00	0.00	51.09	144.08	486.75
FF02-0107	0.00	49.08	20.10	0.00	10.61	3.07	0.00	1.65	47.77	88.05	339.04
FF03-0107	0.00	96.75	31.66	0.00	28.83	28.53	0.00	43.40	66.96	150.06	500.81
FF04-0107	0.00	16.22	5.52	0.00	1.99	1.91	0.00	0.00	16.17	29.72	123.29
FF05-0107	0.00	16.04	67.90	0.00	31.66	0.00	0.00	0.00	190.74	375.45	1006.26
FF06-0107	0.00	41.94	28.52	0.00	9.06	2.82	0.00	0.00	65.15	119.04	426.29
FF08-0107	0.00	29.88	30.16	0.00	15.51	2.47	0.00	0.00	69.50	140.11	448.24
FF09-0107	0.00	49.67	29.75	0.00	20.88	2.56	0.00	0.00	83.86	166.96	513.20
FF10-0107	0.00	114.41	14.91	22.43	14.57	13.10	0.00	0.00	63.98	157.16	617.71
FF01-0807	0.00	75.83	6.99	0.00	3.59	6.79	0.00	0.00	17.36	87.10	277.55
FF02-0807	0.00	65.47	33.62	0.00	10.71	5.08	0.00	0.00	67.86	204.52	609.74
FF03-0807	0.00	106.02	12.96	0.00	4.75	6.97	0.00	0.00	28.90	101.33	421.42
FF04-0807	0.00	93.33	18.35	0.00	5.78	8.01	0.00	0.00	35.37	137.73	490.92
FF05-0807	0.00	35.13	60.97	0.00	26.05	2.48	0.00	0.00	138.96	425.40	987.26
FF06-0807	0.00	47.06	22.36	0.00	4.87	5.07	0.00	0.00	35.53	114.83	324.61
FF08-0807	0.00	37.52	17.54	0.00	8.05	5.48	0.00	0.00	38.31	100.95	286.45
FF09-0807	0.00	31.02	12.11	0.00	6.03	2.87	0.00	0.00	28.29	90.81	249.71

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF10-0807	0.00	19.85	12.45	0.00	0.00	2.20	0.00	0.00	23.14	82.10	181.92
FF01-1507	0.00	31.57	1.53	0.00	0.86	1.83	0.00	0.00	4.74	21.06	94.78
FF02-1507	0.00	17.97	10.52	0.00	2.61	0.00	0.00	0.00	23.93	70.36	188.29
FF03-1507	0.00	45.07	2.77	0.00	2.00	3.33	0.00	0.00	10.70	35.87	162.05
FF04-1507	0.00	24.67	0.00	0.00	2.60	6.52	0.00	0.00	15.61	59.35	175.26
FF05-1507	0.00	3.32	4.24	0.00	2.97	0.00	0.00	0.00	22.47	48.82	114.82
FF06-1507	0.00	8.81	3.15	0.00	1.43	1.12	0.00	0.00	7.42	22.05	56.85
FF08-1507	0.00	10.57	4.64	0.00	3.77	1.40	0.00	0.00	15.17	41.20	105.48
FF09-1507	0.00	13.57	5.06	0.00	3.89	2.47	0.00	0.00	14.61	42.00	111.52
FF10-1507	0.00	10.02	5.11	0.00	2.28	2.25	0.00	0.00	11.03	42.81	76.29
FF01-2207	0.00	71.83	0.00	0.00	11.16	6.48	0.00	0.00	4.13	18.54	152.21
FF02-2207	0.00	35.15	2.98	0.00	3.59	3.52	0.00	0.00	12.12	38.98	136.38
FF03-2207	0.00	35.21	4.05	0.00	3.98	3.29	0.00	0.00	14.19	34.97	146.82
FF04-2207	0.00	29.35	3.66	0.00	0.98	3.08	0.00	0.00	7.26	16.21	48.98
FF05-2207	0.00	2.20	1.62	0.00	0.00	2.08	0.00	0.00	6.78	0.00	6.64
FF06-2207	0.00	2.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.03	5.88	7.39
FF08-2207	0.00	8.85	2.07	0.00	1.44	1.14	0.00	0.00	4.10	10.50	20.71
FF09-2207	0.00	9.76	3.01	0.00	2.36	1.08	0.00	0.00	9.02	20.32	33.82
FF10-2207	0.00	9.04	0.00	0.00	2.63	1.38	0.00	0.00	10.76	0.00	16.81
FF01-2907	0.00	83.22	0.00	0.00	0.00	6.25	0.00	0.00	5.13	23.79	190.31
FF02-2907	0.00	16.66	14.53	0.00	4.59	0.00	0.00	0.00	36.76	95.77	259.96
FF03-2907	0.00	61.99	6.64	0.00	3.69	6.62	0.00	0.00	21.31	63.94	289.45
FF04-2907	0.00	59.98	10.12	0.00	3.62	5.39	0.00	0.00	22.02	80.27	294.09

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF05-2907	0.00	11.02	13.27	0.00	4.45	0.00	0.00	0.00	28.70	76.88	181.21
FF06-2907	0.00	7.07	3.29	0.00	1.20	0.62	0.00	0.00	10.23	35.34	76.80
FF08-2907	0.00	26.05	4.97	0.00	0.00	2.86	0.00	0.00	2.91	35.57	34.24
FF09-2907	0.00	15.42	6.53	0.00	2.38	2.20	0.00	0.00	14.44	49.97	121.36
FF10-2907	0.00	10.37	4.74	0.00	1.52	1.37	0.00	0.00	9.73	38.72	69.51
FF01-0508	2.96	83.87	0.00	0.00	0.00	5.11	0.00	0.00	3.07	22.58	188.80
FF02-0508	0.00	39.19	15.60	0.00	4.79	4.42	0.00	0.00	66.85	114.30	290.10
FF03-0508	0.00	83.29	9.40	0.00	4.08	7.73	0.00	0.00	30.02	77.70	374.60
FF04-0508	0.00	89.48	20.76	0.00	5.25	8.99	0.00	0.00	30.11	114.74	394.11
FF05-0508	0.00	5.95	11.76	0.00	3.15	0.00	0.00	0.00	29.30	78.23	137.66
FF06-0508	0.00	46.52	16.88	0.00	3.28	5.89	0.00	0.00	28.96	101.91	240.27
FF08-0508	0.00	15.00	5.15	0.00	3.28	2.42	0.00	0.00	14.40	42.66	93.79
FF09-0508	0.00	11.80	6.78	0.00	2.79	0.00	0.00	0.00	16.54	53.64	110.58
FF10-0508	0.00	13.14	5.80	0.00	2.29	2.12	0.00	0.00	11.89	44.80	90.66
FF01-1208	0.00	114.32	0.00	0.00	14.22	6.21	0.00	0.00	4.09	9.60	240.34
FF02-1208	0.00	26.45	0.00	5.91	5.37	2.27	0.00	4.04	24.04	58.59	209.82
FF03-1208	0.00	82.52	0.00	4.95	8.40	7.23	0.00	0.00	19.92	49.63	321.46
FF04-1208	0.00	43.32	0.00	34.36	6.75	3.89	0.00	0.00	3.08	36.73	37.81
FF05-1208	0.00	32.32	0.00	5.62	5.48	3.55	0.00	3.33	18.66	43.16	154.56
FF06-1208	0.00	22.09	0.00	6.46	4.43	4.36	0.00	0.00	17.62	43.79	144.31
FF08-1208	0.00	15.37	0.00	2.40	2.67	1.68	0.00	0.00	9.80	27.25	78.74
FF09-1208	0.00	12.88	0.00	5.31	3.40	2.11	0.00	0.00	11.78	30.68	76.54
FF10-1208	0.00	34.69	0.00	7.77	3.19	2.65	0.00	0.00	16.21	49.85	148.85

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF01-1908	0.00	43.85	0.00	0.00	4.79	4.47	0.00	0.00	3.23	15.00	100.95
FF02-1908	0.00	0.90	5.39	0.00	2.23	0.00	0.00	0.00	12.17	27.39	87.28
FF03-1908	0.00	95.98	2.18	0.00	3.99	8.56	0.00	0.00	27.10	45.71	390.37
FF04-1908	0.00	19.47	2.88	5.51	3.00	2.70	0.00	0.00	23.35	39.71	159.01
FF05-1908	0.00	19.67	1.28	1.44	2.21	2.49	0.00	0.00	21.01	29.63	125.31
FF06-1908	0.00	26.19	4.34	8.30	2.55	1.27	0.00	0.00	28.17	46.85	186.48
FF08-1908	0.00	9.65	0.42	1.14	0.76	0.73	0.00	0.00	4.93	20.68	42.25
FF09-1908	0.00	13.49	3.54	2.24	3.61	1.15	0.00	0.00	18.30	30.69	112.58
FF10-1908	0.00	21.02	1.17	4.62	2.15	2.77	0.00	0.00	15.38	24.45	100.34
FF01-2608	0.00	199.64	0.00	0.00	15.88	11.02	0.00	0.00	0.00	0.00	343.44
FF02-2608	0.00	41.04	3.13	0.00	1.66	2.37	0.00	0.00	10.15	31.49	117.71
FF03-2608	0.00	93.94	0.00	2.77	3.52	8.47	0.00	0.00	4.57	11.76	190.38
FF04-2608	0.00	18.57	0.00	3.92	1.36	2.38	0.00	0.00	5.37	23.84	59.18
FF05-2608	0.00	16.86	0.00	3.80	1.68	1.31	0.00	0.00	15.05	40.88	85.16
FF06-2608	0.00	8.81	0.00	3.29	1.57	1.69	0.00	0.00	6.91	32.64	53.83
FF08-2608	0.00	7.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.63	7.63	12.57
FF09-2608	0.00	13.88	0.00	3.77	1.93	0.98	0.00	0.00	11.45	32.36	66.06
FF10-2608	0.00	32.17	0.00	3.61	2.18	1.66	0.00	0.00	9.48	30.38	105.79
FF01-0209	0.00	57.43	0.00	0.00	0.00	2.62	0.00	0.00	14.90	0.00	141.10
FF02-0209	0.00	39.03	3.78	0.00	1.93	3.24	1.90	0.00	28.70	58.09	189.42
FF03-0209	0.00	65.86	5.83	0.00	2.25	6.49	0.00	0.00	27.08	74.02	287.19
FF04-0209	0.00	29.41	6.15	0.00	2.17	4.76	0.00	0.00	24.44	84.31	179.66
FF05-0209	0.00	18.82	7.34	0.00	2.83	1.93	0.00	0.00	23.89	71.34	160.41

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF06-0209	0.00	6.82	3.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11.17	26.69	48.80
FF08-0209	0.00	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.12	22.81
FF09-0209	0.00	12.13	6.00	0.00	2.44	0.00	0.00	0.00	15.12	47.75	445.32
FF10-0209	0.00	32.22	8.86	0.00	3.98	3.30	0.00	0.00	22.71	75.09	212.13
FF01-0909	0.00	52.29	0.52	0.00	0.46	3.42	0.00	0.00	12.40	0.00	100.85
FF02-0909	0.00	51.81	4.20	0.00	2.42	1.72	0.00	0.00	16.15	40.76	135.41
FF03-0909	0.00	67.42	2.29	0.00	1.98	4.53	0.00	0.00	17.05	40.76	210.99
FF04-0909	0.00	12.63	2.90	0.00	1.33	0.88	0.00	0.00	16.17	45.47	87.64
FF05-0909	0.00	15.82	7.74	0.00	4.40	2.27	0.00	0.00	17.10	98.86	158.94
FF06-0909	0.00	8.94	4.08	0.00	6.39	0.00	0.00	0.00	10.37	21.98	19.47
FF08-0909	0.00	4.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.10	27.97	20.68
FF09-0909	0.00	4.79	2.83	0.00	1.91	0.00	0.00	0.00	19.59	36.91	11.89
FF10-0909	0.00	26.95	5.55	0.00	3.89	0.00	0.00	0.00	10.40	32.91	66.80
FF01-1609	0.00	41.85	0.00	0.00	0.00	1.47	0.00	0.00	2.94	36.01	92.61
FF02-1609	0.00	43.17	0.98	0.00	0.76	8.41	0.00	0.00	10.97	27.89	106.23
FF03-1609	0.00	44.64	3.98	0.00	2.61	0.00	0.00	0.00	13.21	39.76	141.82
FF04-1609	0.00	27.76	4.50	0.00	1.59	3.22	0.00	0.00	18.69	54.23	87.85
FF05-1609	0.00	11.22	3.52	0.00	2.51	0.00	0.00	0.00	5.75	33.12	42.58
FF06-1609	0.00	5.79	2.65	0.00	4.11	0.00	0.00	0.00	9.33	37.37	34.84
FF08-1609	0.00	7.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88	46.31	29.20
FF09-1609	0.00	4.59	1.07	0.00	0.46	2.05	0.00	0.00	7.02	45.60	32.02
FF10-1609	0.00	38.48	2.69	0.00	2.02	0.00	0.00	0.00	8.66	43.94	92.52
FF01-2309	0.00	63.98	0.00	0.00	12.46	6.07	0.00	0.00	6.63	54.58	166.74

Ident. muestra	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF02-2309	0.00	44.31	3.34	0.00	2.85	3.82	0.00	0.00	13.11	72.16	180.57
FF03-2309	0.00	42.63	4.44	3.88	1.96	5.79	0.00	0.00	13.59	83.84	174.55
FF04-2309	0.00	24.81	11.27	0.00	5.21	0.79	0.00	0.00	31.83	132.76	237.81
FF05-2309	0.00	17.86	2.64	1.22	2.77	0.00	0.00	0.00	29.76	0.00	73.74
FF06-2309	0.00	9.40	2.86	0.00	2.57	0.00	0.00	0.00	19.25	0.00	15.85
FF08-2309	0.00	7.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.37	65.09	37.44
FF09-2309	0.00	3.17	1.56	0.79	0.51	0.00	0.00	0.00	6.45	60.39	38.70
FF10-2309	0.00	18.49	1.31	0.00	0.50	0.78	0.00	0.00	6.49	51.11	63.00
FF01-3009	0.00	61.10	2.33	0.00	3.64	2.50	0.00	0.00	12.19	70.25	200.09
FF02-3009	0.00	78.93	5.31	0.00	5.28	4.88	0.00	0.00	30.48	128.92	339.18
FF03-3009	0.00	52.58	2.79	0.00	1.77	3.24	0.00	0.00	22.98	99.35	237.63
FF04-3009	0.00	17.57	13.21	0.00	9.00	0.00	0.00	0.00	37.19	111.83	200.43
FF05-3009	0.00	20.01	2.05	0.00	2.29	0.84	0.00	0.00	11.50	79.15	109.76
FF06-3009	0.00	4.92	1.84	0.00	2.73	0.00	0.00	0.00	8.00	62.37	39.97
FF08-3009	0.00	7.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.94	64.90	40.12
FF09-3009	0.00	6.63	5.29	0.00	3.24	0.00	0.00	0.00	17.83	104.75	90.59
FF10-3009	0.00	35.81	2.09	0.00	5.04	4.20	0.00	0.00	13.74	92.79	143.70
FF01-0710	0.00	96.81	21.55	0.00	12.83	9.92	0.00	0.00	51.09	144.08	486.75
FF02-0710	0.00	49.08	20.10	0.00	10.61	3.07	0.00	1.65	47.77	88.05	339.04
FF03-0710	0.00	96.75	31.66	0.00	28.83	28.53	0.00	43.40	66.96	150.06	500.81
FF04-0710	0.00	16.22	5.52	0.00	1.99	1.91	0.00	0.00	16.17	29.72	123.29
FF05-0710	0.00	16.04	67.90	0.00	31.66	0.00	0.00	0.00	190.74	375.45	1006.26
FF06-0710	0.00	41.94	28.52	0.00	9.06	2.82	0.00	0.00	65.15	119.04	426.29

Ident. muestra	Perdinina	Fucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Diadinoxantina	Aloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila b	Clorofila a
FF08-0710	0.00	29.88	30.16	0.00	15.51	2.47	0.00	0.00	69.50	140.11	448.24
FF09-0710	0.00	49.67	29.75	0.00	20.88	2.56	0.00	0.00	83.86	166.96	513.20
FF10-0710	0.00	114.41	14.91	22.43	14.57	13.10	0.00	0.00	63.98	157.16	617.71
FF01-1410	0.00	118.71	0.00	0.00	4.06	5.27	0.00	0.00	20.58	200.58	409.22
FF02-1410	0.00	96.18	0.00	0.00	0.00	5.70	0.00	0.00	14.95	180.62	321.09
FF03-1410	0.00	136.04	0.00	0.00	3.56	9.98	0.00	0.00	37.18	316.13	552.04
FF04-1410	0.00	27.90	27.40	0.00	18.41	0.00	0.00	0.00	70.50	355.78	442.57
FF05-1410	0.00	108.54	4.48	0.00	11.22	7.57	0.00	0.00	37.18	319.54	514.65
FF06-1410	0.00	15.91	5.29	0.00	1.66	0.00	0.00	0.00	17.92	174.20	132.24
FF08-1410	0.00	32.08	3.52	0.00	4.06	2.87	0.00	0.00	15.20	202.59	159.42
FF09-1410	0.00	8.06	15.92	0.00	11.81	0.00	0.00	0.00	43.59	200.72	269.56
FF10-1410	0.00	138.11	8.62	0.00	8.50	7.24	0.00	0.00	39.93	217.97	545.42
FF01-2110	0.00	166.48	0.00	0.00	0.00	7.16	0.00	0.00	13.23	123.95	424.26
FF02-2110	0.00	134.48	0.00	0.00	0.00	8.92	0.00	0.00	18.96	174.88	407.04
FF03-2110	0.00	112.96	0.00	0.00	6.65	9.68	0.00	0.00	41.77	311.03	518.08
FF04-2110	0.00	20.72	10.11	0.00	8.15	0.00	0.00	0.00	47.95	199.58	236.50
FF05-2110	0.00	127.83	6.70	0.00	9.54	10.40	0.00	0.00	40.87	311.48	599.54
FF06-2110	0.00	39.54	3.80	0.00	2.93	0.00	0.00	0.00	26.62	205.83	213.55
FF08-2110	0.00	56.27	7.23	0.00	5.42	2.18	0.00	0.00	27.80	425.89	253.69
FF09-2110	0.00	32.48	31.97	0.00	19.05	0.00	0.00	0.00	86.35	356.49	455.37
FF10-2110	0.00	160.09	5.46	0.00	14.82	14.47	0.00	0.00	48.43	352.08	590.58

Anexo 2. Matrices de ratios de pigmentos para cada conglomerado

Tabla 20. Matriz de Ratios obtenida para el grupo o clúster 1

	Peridinina	19'Butanoyloxy Fucoxantina	Fucoxantina	19'Hexanoylox yfucoxantina	Neoxantina	Prasinoxantina	Violoxantina	Alloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>
Diatomeas	0.000	0.000	0.423	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.646
Dinoflagelados	0.450	0.000	0.000	0.146	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.403
Euglenofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.478	0.520
Clorofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.093	0.000	0.107	0.000	0.058	0.067	0.183	0.493
Criptofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.073	0.000	0.000	0.000	0.927
Prasinofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.239	0.106	0.053	0.000	0.015	0.059	0.387	0.282
Primnesiofíceas	0.000	0.011	0.254	0.416	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.486
Cianobacterias	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.229	0.000	0.819

Tabla 21. Matriz de Ratios obtenida para el grupo o clúster 2

	Peridinina	19'Butanoyloxy Fucoxantina	Fucoxantina	19'Hexanoyloxy fucoxantina	Neoxantina	Prasincoxantina	Violoxantina	Alloxantina	Luteína	Zeaxantina	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>
Diatomeas	0.000	0.000	0.423	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.646
Dinoflagelados	0.370	0.000	0.000	0.122	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.613
Euglenofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.478	0.520
Clorofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.066	0.000	0.056	0.000	0.063	0.054	0.225	0.618
Criptofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.114	0.000	0.000	0.000	0.906
Prasinofíceas	0.000	0.000	0.000	0.000	0.239	0.106	0.053	0.000	0.015	0.059	0.387	0.282
Primnesiofíceas	0.000	0.011	0.254	0.416	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.486
Cianobacterias	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.229	0.000	0.819

Anexo 3. Composición fitoplanctónica

Tabla 22. Composición fitoplanctónica de las muestras.

	Diatomeas ($\mu\text{g/L}$)	Dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$)	Euglenofíceas ($\mu\text{g/L}$)	Clorofíceas ($\mu\text{g/L}$)	Criptofíceas ($\mu\text{g/L}$)	Prasinofíceas ($\mu\text{g/L}$)	Primnesiofíceas ($\mu\text{g/L}$)	Cianobacterias ($\mu\text{g/L}$)
FF01-2705	0.52	0.01	0.04	0.01	0.16	0.00	0.00	0.26
FF02-2705	0.34	0.17	0.00	0.12	0.00	0.11	0.00	0.26
FF03-2705	0.00	0.46	0.00	0.25	0.00	0.29	0.00	0.00
FF04-2705	0.00	0.50	0.00	0.28	0.00	0.21	0.00	0.00
FF05-2705	0.88	0.03	0.02	0.04	0.00	0.03	0.00	0.00
FF06-2705	0.00	0.54	0.00	0.24	0.00	0.22	0.00	0.00
FF08-2705	0.00	0.51	0.00	0.28	0.00	0.21	0.00	0.00
FF09-2705	0.00	0.47	0.00	0.35	0.00	0.18	0.00	0.00
FF10-2705	0.44	0.33	0.00	0.14	0.02	0.08	0.00	0.00
FF01-0306	0.83	0.02	0.00	0.09	0.00	0.06	0.00	0.00
FF02-0306	0.38	0.17	0.00	0.12	0.06	0.07	0.00	0.20
FF03-0306	0.21	0.41	0.00	0.29	0.00	0.09	0.00	0.00
FF04-0306	0.00	0.56	0.00	0.35	0.00	0.09	0.00	0.00
FF05-0306	0.10	0.49	0.00	0.28	0.03	0.11	0.00	0.00
FF06-0306	0.18	0.43	0.00	0.27	0.03	0.09	0.00	0.00
FF08-0306	0.08	0.53	0.00	0.27	0.01	0.11	0.00	0.00
FF09-0306	0.03	0.50	0.00	0.38	0.02	0.07	0.00	0.00
FF10-0306	0.64	0.20	0.00	0.11	0.02	0.02	0.00	0.00
FF01-1006	0.12	0.04	0.04	0.48	0.00	0.00	0.05	0.28
FF02-1006	0.02	0.02	0.24	0.05	0.00	0.00	0.06	0.61
FF03-1006	0.22	0.00	0.08	0.00	0.00	0.01	0.00	0.69
FF04-1006	0.00	0.57	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00
FF05-1006	0.20	0.05	0.00	0.02	0.00	0.23	0.06	0.45
FF06-1006	0.02	0.16	0.03	0.47	0.00	0.00	0.02	0.29
FF08-1006	0.01	0.16	0.17	0.32	0.00	0.00	0.02	0.33
FF09-1006	0.00	0.43	0.00	0.50	0.00	0.07	0.00	0.00
FF10-1006	0.04	0.06	0.27	0.12	0.00	0.00	0.04	0.47
FF01-1706	0.60	0.00	0.00	0.01	0.03	0.04	0.00	0.32
FF02-1706	0.34	0.00	0.01	0.01	0.05	0.03	0.05	0.51
FF03-1706	0.44	0.00	0.01	0.00	0.05	0.04	0.04	0.42
FF04-1706	0.35	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04	0.53
FF05-1706	0.57	0.00	0.00	0.01	0.02	0.06	0.00	0.34
FF06-1706	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.06	0.69
FF08-1706	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.06	0.68
FF09-1706	0.65	0.02	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.28
FF10-1706	0.02	0.00	0.20	0.08	0.00	0.00	0.05	0.66

	Diatomeas (µg/L)	Dinoflagelados (µg/L)	Euglenofíceas (µg/L)	Clorofíceas (µg/L)	Criptofíceas (µg/L)	Prasinofíceas (µg/L)	Primnesiofíceas (µg/L)	Cianobacterias (µg/L)
FF01-2406	0.55	0.00	0.02	0.01	0.05	0.03	0.04	0.31
FF02-2406	0.44	0.00	0.01	0.00	0.09	0.04	0.07	0.34
FF03-2406	0.13	0.00	0.32	0.06	0.02	0.00	0.05	0.42
FF04-2406	0.54	0.00	0.01	0.02	0.05	0.02	0.02	0.34
FF05-2406	0.04	0.00	0.32	0.03	0.00	0.00	0.06	0.56
FF06-2406	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00	0.06	0.61
FF08-2406	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.06	0.57
FF09-2406	0.33	0.00	0.01	0.00	0.05	0.05	0.07	0.50
FF10-2406	0.13	0.00	0.20	0.20	0.00	0.00	0.05	0.42
FF01-0107	0.21	0.00	0.21	0.15	0.00	0.00	0.04	0.39
FF02-0107	0.13	0.00	0.20	0.08	0.00	0.00	0.05	0.53
FF03-0107	0.15	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.05	0.20
FF04-0107	0.36	0.00	0.00	0.01	0.04	0.03	0.05	0.50
FF05-0107	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.00	0.06	0.67
FF06-0107	0.08	0.00	0.22	0.05	0.00	0.00	0.06	0.59
FF08-0107	0.04	0.00	0.26	0.04	0.00	0.00	0.06	0.60
FF09-0107	0.08	0.00	0.25	0.03	0.00	0.00	0.05	0.59
FF10-0107	0.21	0.00	0.20	0.14	0.01	0.01	0.02	0.41
FF01-0807	0.64	0.00	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.25
FF02-0807	0.10	0.00	0.30	0.06	0.01	0.00	0.05	0.48
FF03-0807	0.30	0.00	0.21	0.13	0.01	0.00	0.03	0.32
FF04-0807	0.22	0.00	0.26	0.13	0.01	0.00	0.04	0.35
FF05-0807	0.01	0.00	0.36	0.02	0.00	0.00	0.06	0.55
FF06-0807	0.13	0.00	0.27	0.11	0.00	0.00	0.06	0.42
FF08-0807	0.11	0.00	0.23	0.13	0.00	0.00	0.06	0.46
FF09-0807	0.39	0.00	0.01	0.00	0.05	0.05	0.05	0.45
FF10-0807	0.33	0.00	0.04	0.01	0.05	0.01	0.07	0.49
FF01-1507	0.73	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.19
FF02-1507	0.33	0.00	0.02	0.00	0.05	0.03	0.06	0.51
FF03-1507	0.65	0.00	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.26
FF04-1507	0.50	0.00	0.01	0.03	0.05	0.03	0.00	0.37
FF05-1507	0.19	0.00	0.01	0.00	0.04	0.05	0.04	0.67
FF06-1507	0.39	0.00	0.00	0.01	0.04	0.05	0.06	0.46
FF08-1507	0.32	0.00	0.00	0.00	0.04	0.07	0.05	0.52
FF09-1507	0.36	0.00	0.00	0.01	0.04	0.06	0.05	0.47
FF10-1507	0.34	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.47
FF01-2207	0.86	0.00	0.00	0.01	0.00	0.13	0.00	0.00
FF02-2207	0.58	0.00	0.00	0.02	0.03	0.05	0.02	0.30
FF03-2207	0.55	0.00	0.00	0.01	0.02	0.05	0.03	0.34

	Diatomeas (µg/L)	Dinoflagelados (µg/L)	Euglenofíceas (µg/L)	Clorofíceas (µg/L)	Criptofíceas (µg/L)	Prasinofíceas (µg/L)	Primnesiofíceas (µg/L)	Cianobacterias (µg/L)
FF04-2207	0.66	0.00	0.00	0.04	0.00	0.03	0.06	0.21
FF05-2207	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.16	0.66
FF06-2207	0.42	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.54
FF08-2207	0.45	0.00	0.00	0.02	0.00	0.09	0.08	0.35
FF09-2207	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.07	0.55
FF10-2207	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.17	0.00	0.82
FF01-2907	0.89	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.07
FF02-2907	0.27	0.00	0.02	0.00	0.05	0.03	0.06	0.56
FF03-2907	0.57	0.00	0.00	0.02	0.04	0.03	0.03	0.31
FF04-2907	0.54	0.00	0.01	0.02	0.04	0.03	0.04	0.32
FF05-2907	0.23	0.00	0.02	0.00	0.05	0.04	0.07	0.58
FF06-2907	0.34	0.00	0.03	0.00	0.05	0.03	0.04	0.51
FF08-2907	0.74	0.00	0.02	0.05	0.00	0.01	0.09	0.09
FF09-2907	0.38	0.00	0.01	0.01	0.05	0.04	0.05	0.45
FF10-2907	0.36	0.00	0.02	0.01	0.04	0.04	0.06	0.46
FF01-0508	0.91	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.04
FF02-0508	0.09	0.00	0.17	0.09	0.00	0.00	0.04	0.61
FF03-0508	0.57	0.00	0.00	0.02	0.03	0.02	0.03	0.33
FF04-0508	0.24	0.00	0.22	0.17	0.01	0.00	0.05	0.31
FF05-0508	0.16	0.00	0.02	0.00	0.04	0.04	0.08	0.66
FF06-0508	0.17	0.00	0.24	0.16	0.00	0.00	0.06	0.36
FF08-0508	0.36	0.00	0.00	0.01	0.03	0.06	0.05	0.48
FF09-0508	0.31	0.00	0.02	0.00	0.04	0.04	0.06	0.52
FF10-0508	0.37	0.00	0.01	0.01	0.04	0.05	0.06	0.45
FF01-1208	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00
FF02-1208	0.37	0.00	0.13	0.00	0.02	0.05	0.00	0.42
FF03-1208	0.64	0.00	0.05	0.01	0.02	0.05	0.00	0.22
FF04-1208	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00
FF05-1208	0.43	0.00	0.14	0.01	0.00	0.07	0.00	0.35
FF06-1208	0.34	0.00	0.20	0.02	0.00	0.06	0.00	0.38
FF08-1208	0.42	0.00	0.12	0.01	0.01	0.06	0.00	0.38
FF09-1208	0.23	0.00	0.29	0.01	0.00	0.08	0.00	0.38
FF10-1208	0.42	0.00	0.24	0.01	0.00	0.04	0.00	0.30
FF01-1908	0.88	0.00	0.00	0.03	0.00	0.08	0.00	0.01
FF02-1908	0.20	0.00	0.01	0.00	0.06	0.05	0.07	0.60
FF03-1908	0.64	0.00	0.00	0.02	0.03	0.02	0.01	0.28
FF04-1908	0.26	0.00	0.17	0.01	0.01	0.04	0.02	0.50
FF05-1908	0.34	0.00	0.05	0.01	0.01	0.03	0.01	0.54
FF06-1908	0.24	0.00	0.22	0.00	0.00	0.03	0.03	0.49

	Diatomeas (µg/L)	Dinoflagelados (µg/L)	Euglenofíceas (µg/L)	Clorofíceas (µg/L)	Criptofíceas (µg/L)	Prasinofíceas (µg/L)	Primnesiofíceas (µg/L)	Cianobacterias (µg/L)
FF08-1908	0.46	0.00	0.12	0.01	0.01	0.03	0.01	0.35
FF09-1908	0.27	0.00	0.08	0.00	0.01	0.06	0.03	0.54
FF10-1908	0.31	0.00	0.20	0.02	0.00	0.04	0.01	0.42
FF01-2608	0.73	0.00	0.00	0.26	0.01	0.00	0.00	0.01
FF02-2608	0.66	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.03	0.26
FF03-2608	0.90	0.00	0.02	0.04	0.00	0.03	0.00	0.00
FF04-2608	0.49	0.00	0.28	0.03	0.00	0.04	0.00	0.16
FF05-2608	0.31	0.00	0.19	0.01	0.00	0.03	0.00	0.46
FF06-2608	0.32	0.00	0.26	0.02	0.00	0.05	0.00	0.34
FF08-2608	0.62	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36
FF09-2608	0.29	0.00	0.23	0.00	0.00	0.05	0.00	0.42
FF10-2608	0.57	0.00	0.15	0.01	0.00	0.04	0.00	0.24
FF01-0209	0.71	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.27
FF02-0209	0.38	0.00	0.01	0.01	0.11	0.02	0.02	0.44
FF03-0209	0.55	0.00	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.35
FF04-0209	0.41	0.00	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.45
FF05-0209	0.34	0.00	0.02	0.01	0.04	0.03	0.04	0.52
FF06-0209	0.24	0.00	0.04	0.00	0.02	0.01	0.06	0.64
FF08-0209	0.62	0.00	0.08	0.00	0.08	0.01	0.00	0.19
FF09-0209	0.45	0.00	0.03	0.00	0.10	0.02	0.02	0.38
FF10-0209	0.43	0.00	0.01	0.01	0.05	0.04	0.04	0.42
FF01-0909	0.74	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.22
FF02-0909	0.62	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.03	0.31
FF03-0909	0.67	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.27
FF04-0909	0.33	0.00	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.55
FF05-0909	0.38	0.00	0.03	0.01	0.06	0.05	0.05	0.42
FF06-0909	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.14	0.54
FF08-0909	0.42	0.00	0.07	0.00	0.04	0.01	0.00	0.46
FF09-0909	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.06	0.87
FF10-0909	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.07	0.33
FF01-1609	0.83	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.11
FF02-1609	0.69	0.00	0.00	0.07	0.00	0.01	0.01	0.22
FF03-1609	0.62	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.03	0.30
FF04-1609	0.42	0.00	0.01	0.02	0.00	0.03	0.04	0.47
FF05-1609	0.46	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.07	0.36
FF06-1609	0.24	0.00	0.00	0.00	0.02	0.14	0.06	0.55
FF08-1609	0.43	0.00	0.07	0.00	0.04	0.01	0.00	0.44
FF09-1609	0.34	0.00	0.05	0.04	0.04	0.02	0.02	0.48
FF10-1609	0.68	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	0.03	0.25

	Diatomeas (µg/L)	Dinoflagelados (µg/L)	Euglenofíceas (µg/L)	Clorofíceas (µg/L)	Criptofíceas (µg/L)	Prasinofíceas (µg/L)	Primnesiofíceas (µg/L)	Cianobacterias (µg/L)
FF01-2309	0.80	0.00	0.00	0.01	0.01	0.13	0.00	0.06
FF02-2309	0.60	0.00	0.01	0.02	0.04	0.03	0.02	0.28
FF03-2309	0.53	0.00	0.11	0.03	0.03	0.02	0.03	0.26
FF04-2309	0.35	0.00	0.03	0.00	0.05	0.04	0.04	0.49
FF05-2309	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.03	0.91
FF06-2309	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.09	0.81
FF08-2309	0.41	0.00	0.08	0.00	0.05	0.01	0.00	0.44
FF09-2309	0.32	0.00	0.13	0.00	0.06	0.02	0.03	0.44
FF10-2309	0.56	0.00	0.04	0.01	0.04	0.02	0.02	0.32
FF01-3009	0.68	0.00	0.01	0.01	0.03	0.03	0.01	0.23
FF02-3009	0.56	0.00	0.01	0.01	0.04	0.03	0.02	0.33
FF03-3009	0.54	0.00	0.02	0.01	0.04	0.02	0.01	0.36
FF04-3009	0.05	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.05	0.55
FF05-3009	0.48	0.00	0.03	0.00	0.05	0.04	0.02	0.37
FF06-3009	0.35	0.00	0.04	0.00	0.05	0.08	0.03	0.46
FF08-3009	0.40	0.00	0.08	0.00	0.05	0.01	0.00	0.46
FF09-3009	0.28	0.00	0.04	0.00	0.05	0.05	0.04	0.53
FF10-3009	0.56	0.00	0.01	0.02	0.04	0.06	0.01	0.30
FF01-0710	0.21	0.00	0.21	0.15	0.00	0.00	0.04	0.39
FF02-0710	0.13	0.00	0.20	0.08	0.00	0.00	0.05	0.53
FF03-0710	0.15	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.05	0.20
FF04-0710	0.36	0.00	0.00	0.01	0.04	0.03	0.05	0.50
FF05-0710	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.00	0.06	0.67
FF06-0710	0.08	0.00	0.22	0.05	0.00	0.00	0.06	0.59
FF08-0710	0.04	0.00	0.26	0.04	0.00	0.00	0.06	0.60
FF09-0710	0.08	0.00	0.25	0.03	0.00	0.00	0.05	0.59
FF10-0710	0.21	0.00	0.20	0.14	0.01	0.01	0.02	0.41
FF01-1410	0.33	0.00	0.37	0.09	0.00	0.00	0.00	0.20
FF02-1410	0.33	0.00	0.39	0.12	0.00	0.00	0.00	0.15
FF03-1410	0.27	0.00	0.39	0.12	0.00	0.00	0.00	0.22
FF04-1410	0.02	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.05	0.44
FF05-1410	0.22	0.00	0.43	0.10	0.00	0.00	0.01	0.24
FF06-1410	0.39	0.00	0.07	0.00	0.06	0.02	0.03	0.42
FF08-1410	0.50	0.00	0.05	0.01	0.06	0.04	0.02	0.32
FF09-1410	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.05	0.48
FF10-1410	0.28	0.00	0.31	0.10	0.00	0.00	0.02	0.29
FF01-2110	0.47	0.00	0.24	0.13	0.01	0.00	0.00	0.15
FF02-2110	0.38	0.00	0.30	0.16	0.00	0.00	0.00	0.16
FF03-2110	0.23	0.00	0.40	0.12	0.00	0.00	0.00	0.25

	Diatomeas (µg/L)	Dinoflagelados (µg/L)	Euglenofíceas (µg/L)	Clorofíceas (µg/L)	Criptofíceas (µg/L)	Prasinofíceas (µg/L)	Primnesiofíceas (µg/L)	Cianobacterias (µg/L)
FF04-2110	0.05	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.03	0.48
FF05-2110	0.24	0.00	0.38	0.12	0.00	0.00	0.01	0.25
FF06-2110	0.46	0.00	0.05	0.00	0.05	0.03	0.01	0.40
FF08-2110	0.13	0.00	0.73	0.02	0.00	0.00	0.02	0.09
FF09-2110	0.02	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.05	0.49
FF10-2110	0.27	0.00	0.35	0.16	0.00	0.00	0.01	0.21

Anexo 4. Resultados estudio de normalidad de las variables presentes en el Trabajo

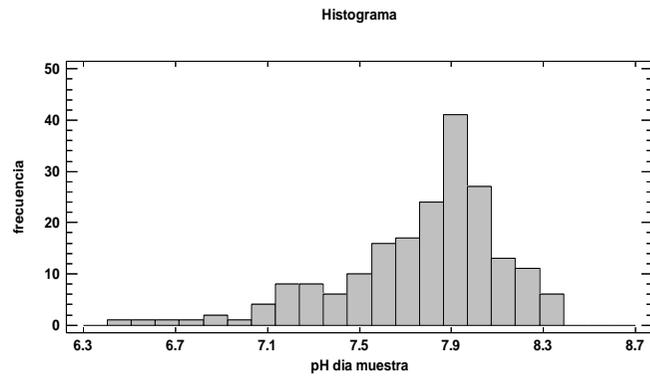


Figura 28. Estudio normalidad pH día muestreo

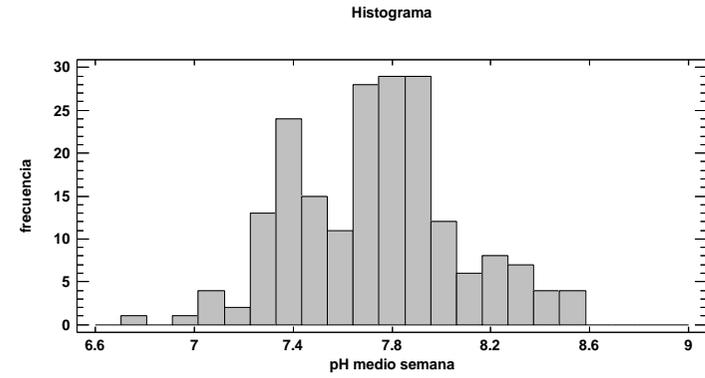


Figura 29. Estudio normalidad pH media semanal

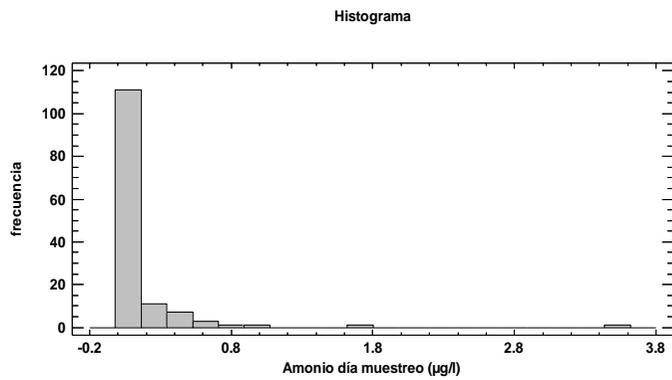


Figura 30. Estudio normalidad amonio día muestreo

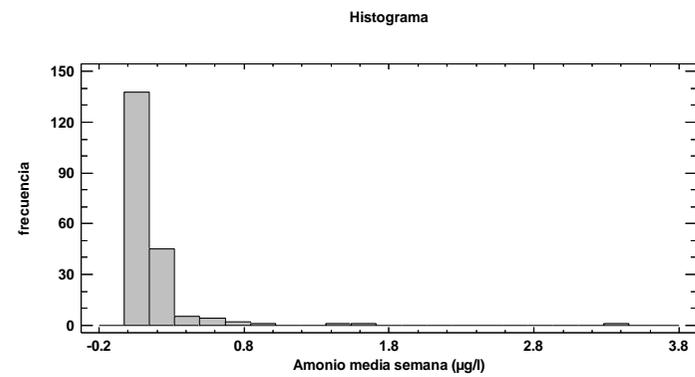


Figura 31. Estudio normalidad amonio media semanal

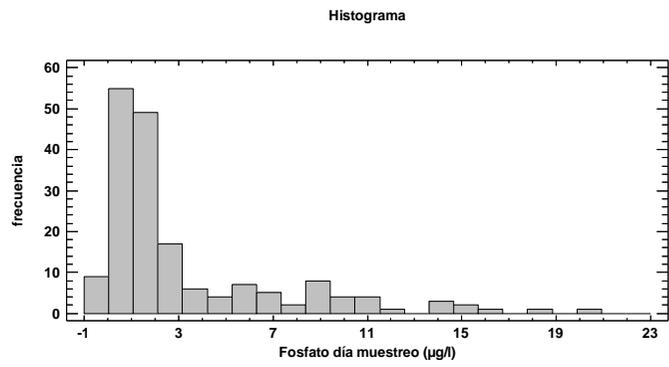


Figura 32. Estudio normalidad fosfato día muestreo

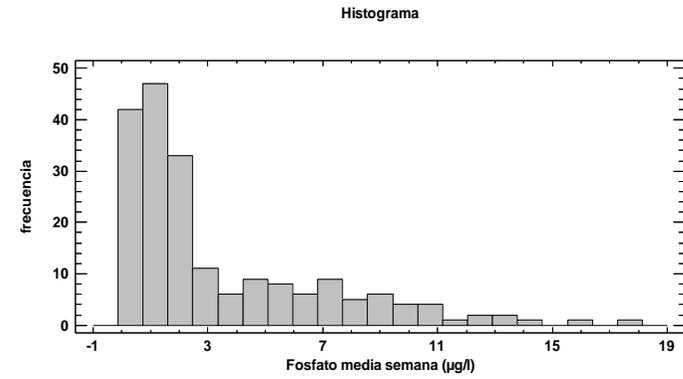


Figura 33. Estudio normalidad fosfato media semanal

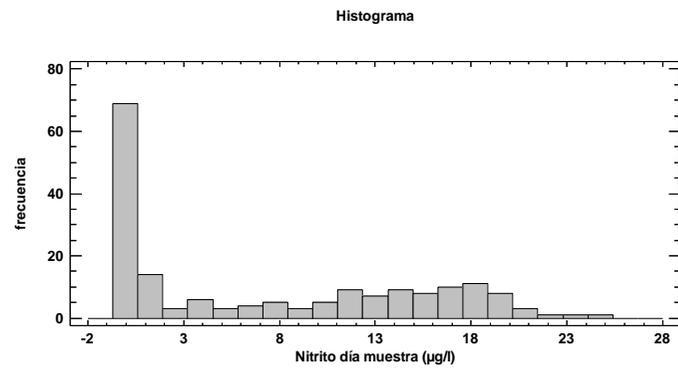


Figura 34. Estudio normalidad nitrito día muestreo

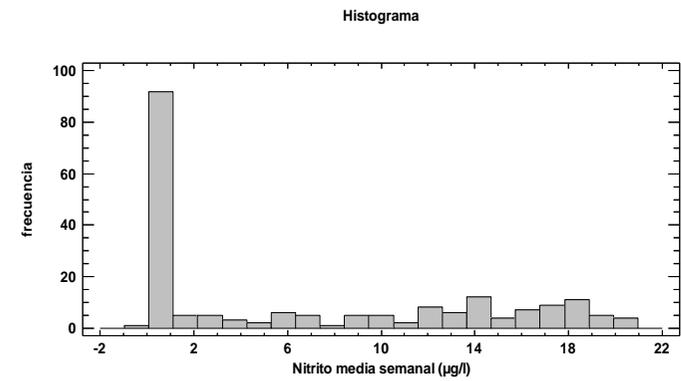


Figura 35. Estudio normalidad nitrito media semanal

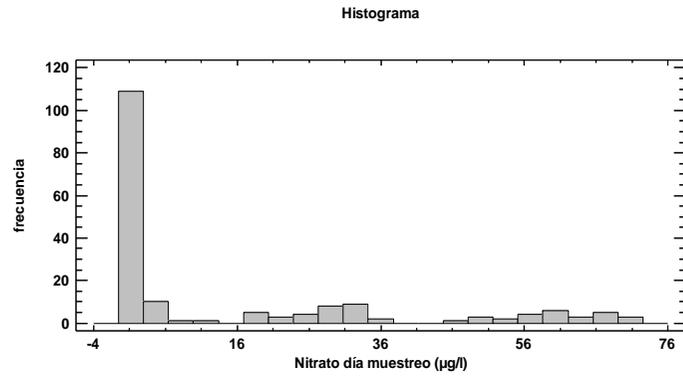


Figura 36. Estudio normalidad nitrato día muestreo

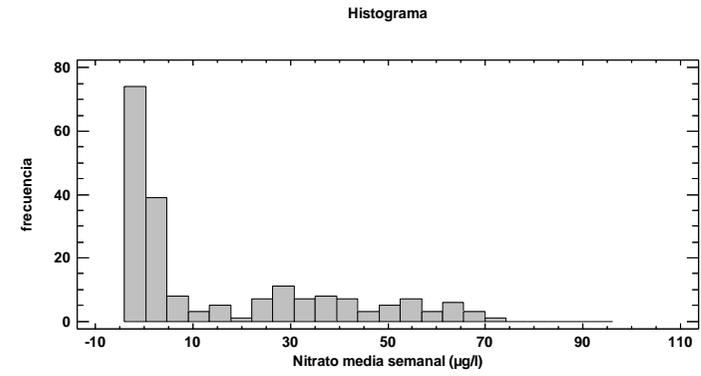


Figura 37. Estudio normalidad nitrato media semanal

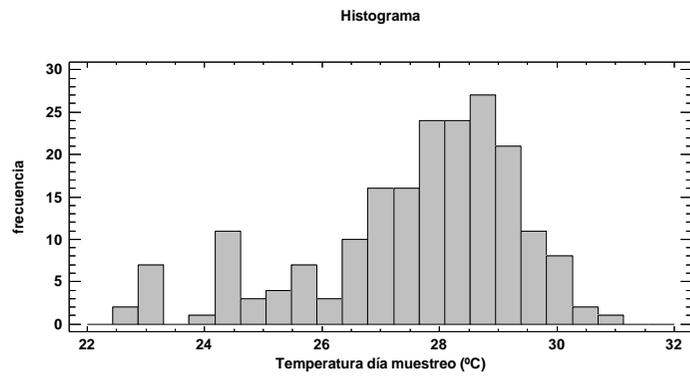


Figura 38. Estudio normalidad temperatura día muestreo

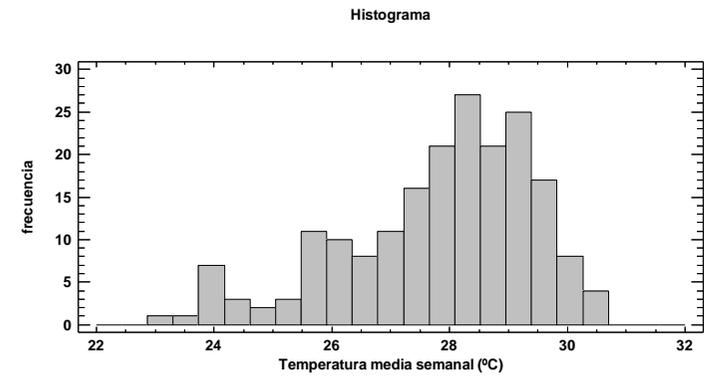


Figura 39. Estudio normalidad temperatura media semanal

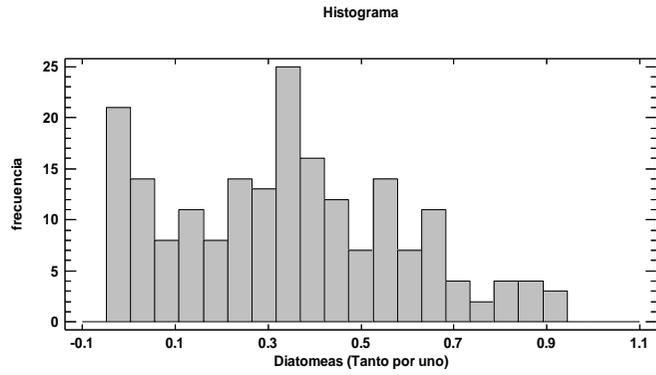


Figura 40. Estudio normalidad diatomeas (Tanto por uno)

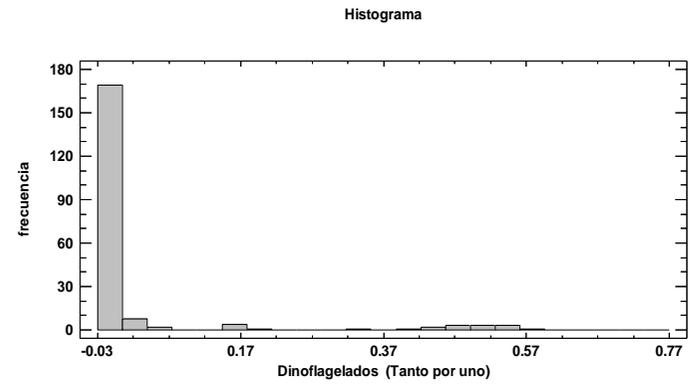


Figura 41. Estudio normalidad dinoflagelados (Tanto por uno)

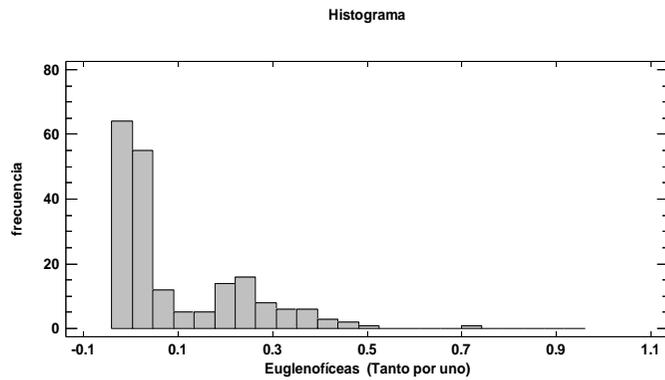


Figura 42. Estudio normalidad euglenofíceas. (Tanto por uno)

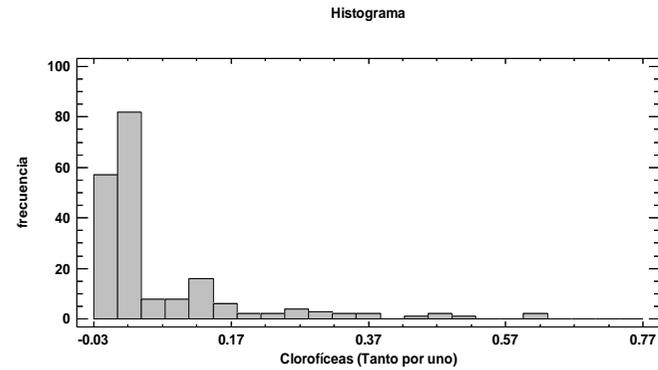


Figura 43. Estudio normalidad clorofíceas (Tanto por uno)

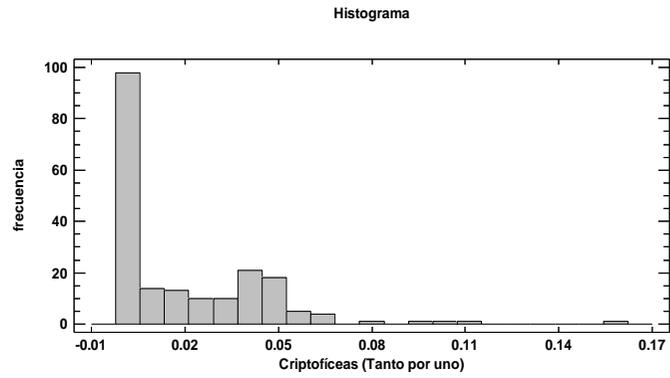


Figura 44. Estudio normalidad criptofíceas. (Tanto por uno)

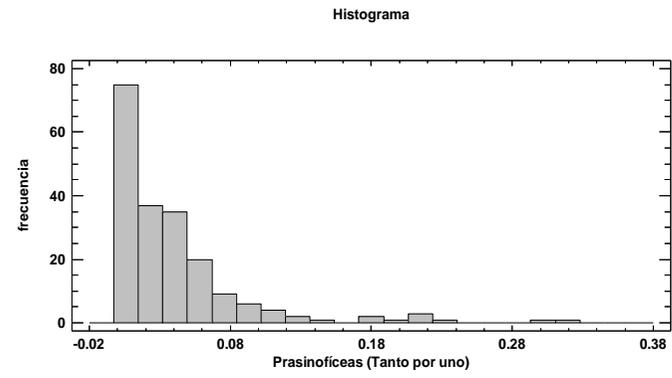


Figura 45. Estudio normalidad prasinofíceas. (Tanto por uno)

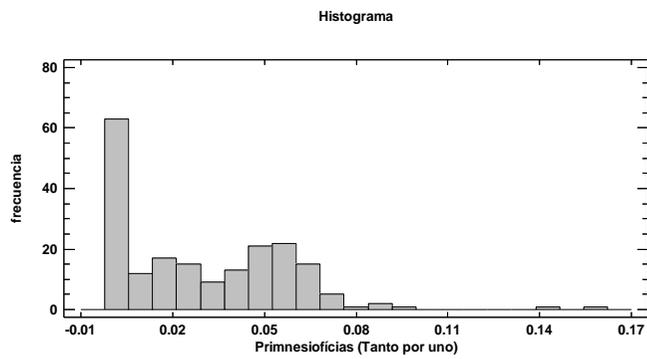


Figura 46. Estudio normalidad primnesiofíceas. (Tanto por uno)

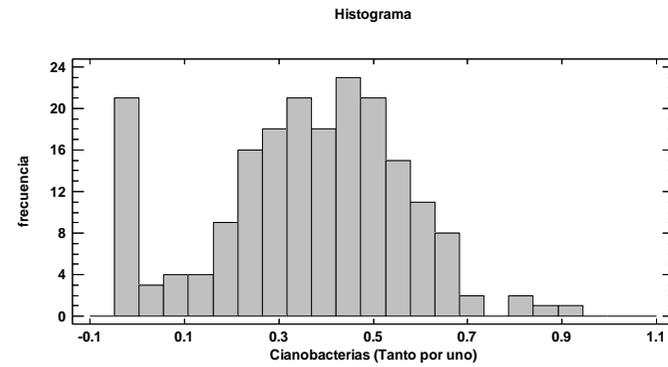


Figura 47. Estudio normalidad cianobacterias. (Tanto por uno)

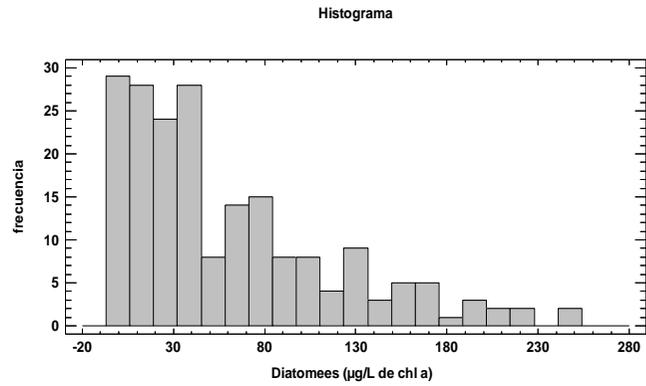


Figura 48. Estudio normalidad diatomeas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*)

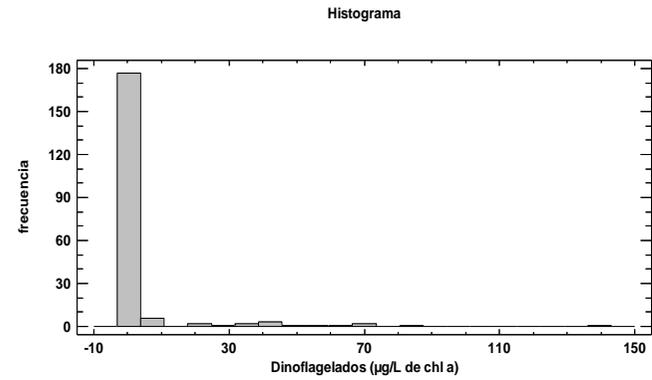


Figura 49. Estudio normalidad dinoflagelados ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*)

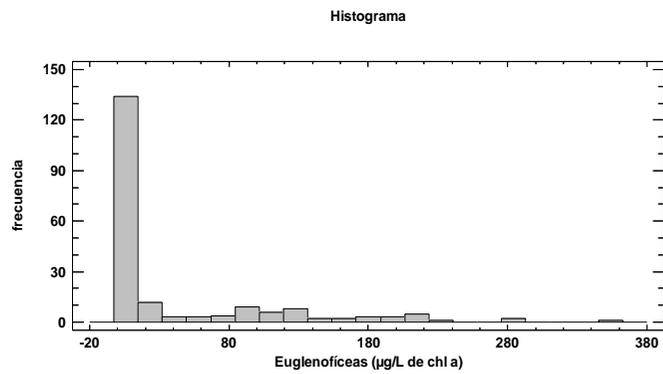


Figura 50. Estudio normalidad euglenofíceas. ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*)

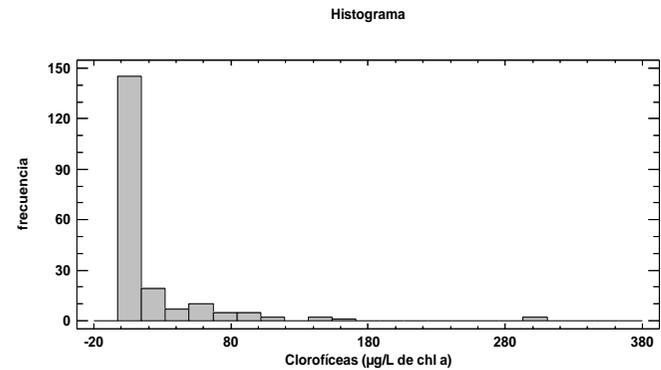


Figura 51. Estudio normalidad clorofíceas ($\mu\text{g/L}$ de chl *a*)

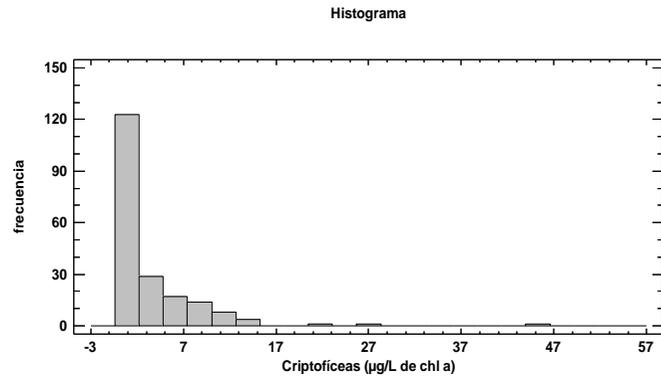


Figura 52. Estudio normalidad criptofíceas. (µg/L de chl a)

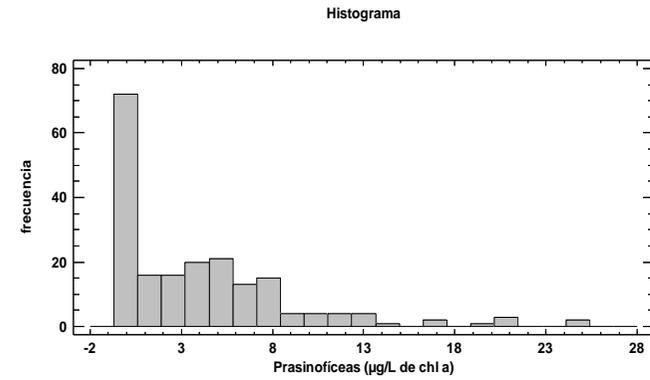


Figura 53. Estudio normalidad prasinofíceas. (µg/L de chl a)

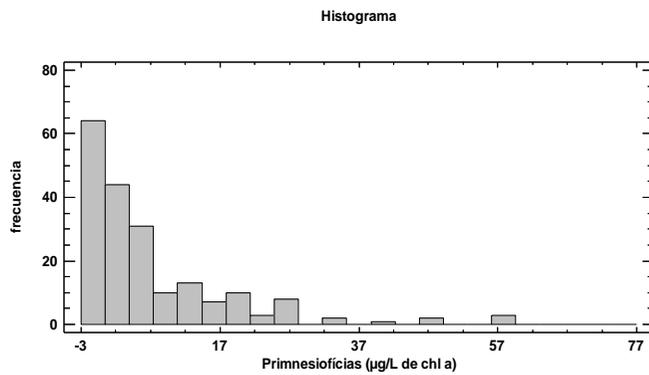


Figura 54. Estudio normalidad primnesiofíceas. (µg/L de chl a)

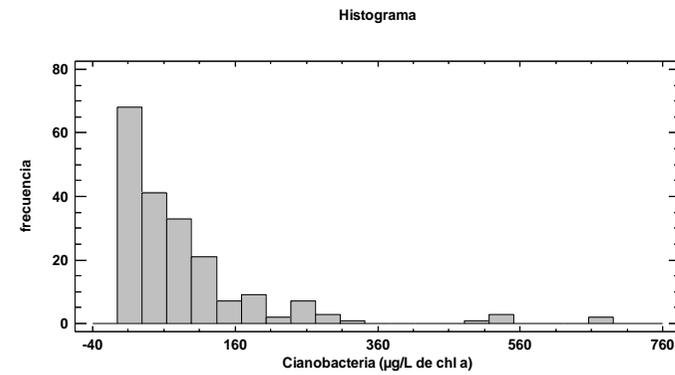


Figura 55. Estudio normalidad cianobacterias. (µg/L de chl a)

