

**EVALUACIÓN DE MATERIALES CO-INMOVILIZANTES PARA EL
CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN AGUAS RESIDUALES
INDUSTRIALES (VINAZAS)**

**DANIELA ANDREA CASTRO RUEDA
LAURA MARCELA VILLAMIZAR CÚJAR**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2012

**EVALUACIÓN DE MATERIALES CO-INMOVILIZANTES PARA EL
CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN AGUAS RESIDUALES
INDUSTRIALES (VINAZAS)**

**DANIELA ANDREA CASTRO RUEDA
LAURA MARCELA VILLAMIZAR CÚJAR**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

Directores

**Ph. D Viatcheslav Kafarov
M.Sc. Crisóstomo Barajas**

Codirector

Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2012

La unión de las diferentes esferas del trabajo debe converger en la Universidad al desarrollo de la ciencia y la transformación de la sociedad. Este trabajo lo dedico a cada estudiante, profesor, trabajador e intelectual que colabora incansablemente en este proceso.

A mis padres, gracias por hacer posible mi vida en la Universidad, la ciencia y el trabajo.

Daniela Andrea Castro Rueda

*A mis padres y hermanos por su motivación, su cariño,
sus consejos y su apoyo incondicional en la
realización de este sueño.*

*A mis amigos, compañeros y profesores por brindarme su
amistad y su compañía.*

*Junto a ellos viví una de mis mejores experiencias de la
vida.*

Laura Marcela Villamizar Cújar

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por su apoyo económico.
- INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETRÓLEO, por su aporte en el marco de este proyecto.
- UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por brindarnos el acceso a los conocimientos que fueron base para el desarrollo de este trabajo.
- CORPORACIÓN INSTITUTO MOSRROSQUILLO, por proveer las algas a trabajar.
- GRUPO DE INVESTIGACION CIDES, y al laboratorio de biomasa, por suministrar los medios necesarios para llevar a cabo esta investigación.
- Dr. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como líder del proyecto.
- M.Sc CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA, por su gran aporte científico.
- ANDRÉS FERNANDO BARAJAS, por su valioso apoyo, dedicación y paciencia.
- EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, por su colaboración y orientación incondicional.
- A los profesores de la escuela de Ingeniería Química por su aporte a la consolidación de nuestros conocimientos.
- A nuestra familia por su compromiso, apoyo y paciencia.
- A nuestros amigos por su respaldo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	19
1.1 Microalgas	19
1.2 Co-inmovilización	19
1.3 Matrices para co-inmovilización.....	21
1.4 Vinazas.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 Diagrama general del proceso.....	24
2.2 Materiales.....	24
2.2.1 Microalgas y condiciones de cultivo.....	24
2.2.2 Vinazas.....	25
2.2.3 Matrices para co-inmovilización.....	25
2.2.4 Fotobiorreactor.....	25
2.3 Diseño experimental.....	26
2.4 Análisis estadístico.....	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Resultados y análisis primera fase.....	30
3.2 Resultados y análisis segunda fase.....	32
3.3 Resultados y análisis tercera fase.....	32
3.4 Análisis diseño experimental propuesto.....	36
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama general del proceso experimental.....	22
Figura 2. Dimensiones del material.....	24
Figura 3a. Fotobiorreactor con el polímero sumergido en cultivo para pruebas de co-inmovilización de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803.....	25
Figura 3b. Montaje completo de fotobiorreactores.....	25
Figura 4a. Fotobiorreactor con polímero sumergido.....	26
Figura 4b. Montaje fotobiorreactor con vinazas.....	26
Figura 5. Diagrama metodología experimental.....	28
Figura 6a. Loofha.....	29
Figura 6b. Poliuretano.....	29
Figura 6c. Polietileno.....	29
Figura 7. Biomasa recuperada en las diferentes matrices para pruebas parciales cada 5 días.....	30
Figura 8. Co-inmovilización de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803 en polietileno de baja densidad.....	30
Figura 9. Resistencia del polietileno de baja densidad de grosor 1, 2 y 4 [cm] a la degradación por vinazas.....	31
Figura 10. Recuperación de biomasa en g/l.....	31
Figura 11. Curva de recuperación de biomasa cada grosor del polímero.....	32
Figura 12. Producción promedio de biomasa recuperada para cada grosor de polietileno de baja densidad.....	33
Figura 13. Estado final del material luego de aplicar el método de co-inmovilización en vinazas.....	34

Figura 14. Desarrollo experimental propuesto a partir de los resultados obtenidos en investigaciones previas en el laboratorio CIDES.....35

Figura 15. Desarrollo experimental propuesto a partir de los resultados obtenidos en la experimentación.....36

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características fisico-químicas de las vinazas.....	23
Tabla 2. Composición química de la vinaza según proceda de jugo, melaza o la mezcla de ambos (promedios de cinco determinaciones).....	47
Tabla 3. Diferentes composiciones de las soluciones stock, necesarias para preparar el medio de cultivo Bold Basal para volumen de trabajo de litro.....	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Composición química de la vinaza.....	47
Anexo B. Medio bold basal.....	48
Anexo C. Análisis estadístico.....	49

RESUMEN

Título: Evaluación de materiales co-inmovilizantes para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en aguas residuales industriales (Vinazas)*.

Autores: DANIELA ANDREA CASTRO RUEDA, LAURA VILLAMIZAR CÚJAR**.

Palabras Claves: Microalgas, co-inmovilización, vinazas, *Chlorella vulgaris*

El uso de las microalgas se ha incrementando en los últimos años siendo estos organismos una alternativa en la industria cosmética, farmacéutica, de tratamiento de aguas entre otras. Sin embargo, su pequeño tamaño celular constituye un obstáculo para el cultivo y aprovechamiento de sus beneficios. Como solución a este problema, se desarrollan las técnicas de inmovilización celular, técnicas que facilitan la recuperación de biomasa.

Inicialmente se evaluó la resistencia y cantidad de biomasa recuperada en tres materiales co-inmovilizantes (Loofha, poliuretano y polietileno de baja densidad). Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas sugieren que el polietileno es la matriz más adecuada y consecuentemente se seleccionó para las etapas subsiguientes. El polímero se trabajó en tres grosores diferentes (1, 2 y 4 cm) conservando el área. Las microalgas fueron puestas en contacto (10 días) con el polímero para verificar que éstas se adherían al mismo. Luego, se determinó la resistencia del material en vinazas mediante seguimiento fotográfico durante 10 días. Finalmente, se evaluó la productividad de biomasa durante 5 días para cada grosor de material.

Los resultados evidencian un aumento del 65% en la producción de biomasa respecto a trabajos anteriores.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el polietileno de baja densidad como un material co-inmovilizante para el crecimiento de microalgas en Vinazas, evidenciar el tiempo de vida útil del mismo y proponer un esquema experimental para la optimización del proceso.

Del material se concluye que es reutilizable, las microalgas sobreviven en él durante el tiempo de cultivo sin mostrar daño o deformación significativa. Además, mediante la prueba estadística ANNOVA de una vía, se demuestra que grosor del material no influye significativamente la producción de biomasa. Sin embargo se elige el material de 2 cm como la matriz con mayor rendimiento en el experimento.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores PhD. Viatcheslav Kafarov, Msc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector, Biólogo, Andrés Fernando Barajas Solano.

ABSTRACT

Title: **Assessment of co-immobilizer materials for the growth of *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 in industrial water residuals (Vinasses)*.**

Authors: DANIELA ANDREA CASTRO RUEDA, LAURA VILLAMIZAR CÚJAR**.

Keywords: Microalgae, co-immobilization, vinasses, *Chlorella Vulgaris*

In the past years, the use of microalgae has been increasing. These organisms have become an alternative in cosmetic, pharmaceutical, water treatment and others; however, their small size is an obstacle for the culture and its benefits. As a solution, cellular co-immobilization techniques have been developing which facilitates biomass recovery.

Resistance was evaluated initially and quantity of biomass recovered in three co-immobilizing material (Loofha, polyurethane and low density polyethylene). The results of tests suggest that polyethylene is the most appropriate matrix and thus were selected for subsequent stages. The polymer was worked in three different thicknesses (1, 2 and 4 cm) while maintaining the area. Microalgae were brought into contact (10 days) with the polymer to verify that they are adhered thereto. Then, we determined the strength of the material in vinasses using photographic surveillance for 10 days. Finally, we evaluated the productivity of biomass for 5 days for each thickness of material.

The results showed a 65% increase in biomass production compared to previous work.

From the material is concluded that it resists and that the microalgae survive on it without showing any harm or significant deformation. Besides, trough the one way statistical test ANNOVA was shown that the increase of thickness on the material doesn't have an improvement on biomass production. However the material is chosen as the matrix 2 cm with higher yield in the experiment.

* Grade project.

** Physicochemical Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Directors PhD. Viatcheslav Kafarov, Msc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Co-director, Biologist Andrés Fernando Barajas Solano.

INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas, la urbanización, la industrialización, entre otras alteraciones, han aumentado el aporte de nutrientes en los ciclos bioquímicos, especialmente el nitrógeno y el fósforo. Un ejemplo clave, la eliminación de residuos de destilería (vinazas) presenta un grave desafío para el ecosistema natural y puede causar considerables problemas ambientales. Las vinazas, son residuos extremadamente contaminantes debido a su gran contenido de material orgánico y minerales como potasio, fósforo, nitrógeno y compuestos sulfurados ^[1] los cuales le confieren un pH ácido (4-5) ^[2]. Estos nutrientes contenidos en dichos residuos son directamente responsables de la eutrofización de los ríos, lagos y mares, que puede provocar la pérdida de especies que los componen y así mismo pérdida de la función de los ecosistemas ^[3, 4, 5]. Un metro cúbico de vinazas equivale a la contaminación generada por una población de 1000 habitantes ^[6] vertidos en fuentes de agua sin ningún tipo de tratamiento.

La descarga de aguas residuales en fuentes de agua requiere la eliminación de la mayoría de los nutrientes, ^[4, 7] a pesar que este procedimiento, muchas veces obligatorio no se realice (especialmente en los países en desarrollo como el nuestro), no indica que en la industria de tratamiento de aguas residuales actualmente no se utilicen varios métodos para su eliminación; mezcla de una sustancia química con aguas residuales, recolección de sedimentos, tratamientos biológicos como biorremediación, entre otros ^[4, 8] son principales para eliminar el fósforo, el nitrógeno y otros contaminantes como metales pesados. En este campo, el uso de la microalga unicelular de agua dulce, *Chlorella vulgaris*, se ha ido incrementado en los últimos años. Estos organismos con aplicación en alimentos, cosméticos, la acuicultura y la industria farmacéutica, ^[9] tienen algunas ventajas significativas: no producen riesgos para la salud, no producen contaminación secundaria, y sus productos finales se pueden convertir a otros productos derivados (como los fertilizantes o los biocombustibles) que generan un valor agregado al proceso de tratamiento

de agua residual. ^[4, 10] Sin embargo, su pequeño tamaño celular supone un problema en la aplicación de los procesos biotecnológicos. ^[11]

Es por este motivo que surgen técnicas de co-inmovilización. Estas, presentan ventajas importantes: concentran una elevada cantidad de biomasa que se puede utilizar como subproducto, evitan la filtración y tienen una alta resistencia a los compuestos tóxicos de las aguas residuales tratadas. ^[12] Y dificultades como: la eficiencia del sistema para eliminar los contaminantes, costo de la matriz y costos del proceso de inmovilización. ^[4, 12] Como solución al problema de la recolección de nutrientes, el presente trabajo tomó como punto de partida la co-inmovilización de microalgas en un polímero determinado. Se realizaron pruebas en matrices orgánicas (Loofha) e inorgánicas (Poliestireno y polietileno de baja densidad) tomando como referencia el trabajo realizado en el grupo de investigación CIDES ^[13] para probar su resistencia en las vinazas. Posteriormente, con el material seleccionado, se realizó la co-inmovilización para evaluar los efectos en la tasa de producción de biomasa teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el grupo de investigación CIDES ^[14] y de esta forma concluir sobre la aplicación del método de co-inmovilización.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 MICROALGAS

Las microalgas son organismos que desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos. Se estima que aproximadamente el 40% de la fotosíntesis mundial se lleva a cabo con microalgas ^[15, 9, 16]. Las microalgas presentan ventajas como: una alta velocidad de crecimiento, de eficiencia fotosintética y de producción de biomasa comparada con otros cultivos terrestres energéticos ^[17, 18]. Co-inmovilizar este tipo de cultivos, tiene el potencial, no sólo para reducir los costos en la obtención de productos de valor agregado (Biodiesel y otros), ^[19, 20, 21] sino también la compensación de las emisiones de carbono ^[22].

La microalga *Chlorella vulgaris*, Reino: *Protista*; División: *Chlorophyta*; Clase *Chlorophyceae*; Orden: *Chlorococcales*; Familia: *Oocystaceae*; Género: *Chlorella*; Especie: *vulgaris*. Es utilizada para tratamiento de aguas residuales terciarias principalmente para la eliminación del nitrógeno y fósforo y metales pesados ^[8, 23, 24, 25]. Además, la asimilación de carbono fotosintético provoca un incremento en el pH en el agua que pueden inducir precipitación química del fósforo ^[23].

1.2 CO-INMOVILIZACIÓN

La co-inmovilización de las algas ha sido usada mayoritariamente para la obtención de biomasa y remoción de macro nutrientes. La extremadamente alta capacidad de acumular sustancias potencialmente peligrosas ha sido explotada ^[26] para técnicas de biorremediación aplicada en aguas contaminadas ^[27, 28, 29, 25, 30]. Esta capacidad también ha sido explotada con el fin de pre-concentrar estas sustancias y luego facilitar la medición de las trazas en el medio ambiente ^[31].

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se ve impedida de moverse independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa del sistema bajo estudio. ^[4, 9]

La co-inmovilización de microorganismos en soportes naturales o sintéticos proporciona estabilidad a las funciones celulares. Esta técnica permite alcanzar altas concentraciones celulares en volúmenes reducidos, la reutilización de la matriz co-inmovilizante, la implantación de sistemas continuos de producción y facilitar la separación de la biomasa. ^[32]

Seis tipos diferentes de inmovilización han sido definidos: covalentes acoplamiento, la inmovilización de afinidad, la adsorción, la reclusión en un líquido-emulsión líquida, la captura detrás de la membrana semipermeable, y la trampa en los polímeros ^[4]. Estos tipos de inmovilización se pueden agrupar como "pasiva" (con la tendencia natural de microorganismos que se adhieren a las superficies naturales o sintéticas y crecen en ellas) y "activa" (agentes floculantes, unión química, y el gel de encapsulación) ^[4, 9, 12].

En los sistemas de inmovilización poliméricos, similar a los otros sistemas de biofiltración, no hay separación física entre los microorganismos y las aguas residuales tratadas. Los microorganismos se inmovilizan (atrapados) con vida dentro del polímero, ya que sus poros son más pequeños que los microorganismos, mientras que el líquido atraviesa y sostiene a su metabolismo y eventual crecimiento ^[33]. Cabe resaltar que el procedimiento tiene ventajas significativas: no permiten que las células mueran, y más que su acción como biofiltro, son esenciales para la producción y recuperación facilitada de biomasa. En el campo de la remoción de nutrientes las ventajas del uso de algas son: el bajo costo de la operación y la posibilidad de reciclaje de nitrógeno y fósforo asimilado en la biomasa de algas como fertilizante para evitar un problema posterior. Las concentraciones de estos nutrientes en los efluentes secundarios varían dependiendo de las características de las aguas residuales y de las tecnologías aplicadas para el tratamiento ^[1, 38]. Sin embargo, la co-inmovilización afecta a las algas, incluyen cambios morfológicos,

características de crecimiento variables, y cambios en las actividades metabólicas de las mismas ^[33].

1.3 MATRICES PARA CO-INMOVILIZACIÓN

El polímero orgánico, esponja de Loofha, es un material natural que consiste en una red fibrosa. Este material cuenta con un alto grado de porosidad, alto volumen de poros específicos y biodegradables. Debido a estas excelentes características su uso como material soporte es factible. La esponja presenta un problema, la estructura del esqueleto de los frutos varía de una planta a otra en función de condiciones de cultivo, cada esponja de loofha tiene una estructura diferente ^[37]. El poliuretano es un material poroso que permite la inmovilización de microorganismos por adsorción ^[38]. Debido a sus características porosas, el crecimiento de las algas en la espuma de poliuretano es sustancial y es realizado dentro de los poros, debido a eso la recolección de la biomasa a partir de este material es muy difícil ^[39]. El polietileno de baja densidad es un polímero termoplástico conformado por unidades repetitivas de etileno. Por ser un polímero sintético es muy estable, difícilmente degradable y además es un material reciclable ya que su principal uso en la industria es embalaje de equipos electrónicos (computadores portátiles, equipos de sonido etc.)

En los sistemas de inmovilización poliméricos, existe una separación física entre los microorganismos y el medio. Además independientemente del polímero utilizado, el material debe ser hidrofílico, lo que permite difundir las aguas.

1.4 VINAZAS

Las vinazas son un subproducto derivado del proceso de fabricación de alcohol, cuya composición depende de la variedad y el estado de maduración de la caña, de la cosecha, el sustrato, el tipo y la eficiencia de fermentación y destilación. La solución fermentada contiene un 6-8% de alcohol y se destila

con vapor de baja presión para obtener rectificado o alcohol neutro como el producto final. La producción tradicional de vinazas en una fábrica de alcohol es de 9.14 litros por cada litro de etanol obtenido. Las vinazas tienen un pH muy ácido (pH 4-5) y un alto contenido de carga orgánica ^[6, 34] (Ver anexo A).

Las vinazas, poseen características propias que las convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente; incrementan la temperatura del cuerpo receptor del agua cuando son vertidas y disminuyen la cantidad de oxígeno disuelto disponible. Cuando no son neutralizadas pueden disolver algunos metales. Éstas contienen todos los componentes del mosto que han sido arrastrados por el vapor de agua así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles además, de materia orgánica abundante que incluye una cantidad considerable de fenoles y sus polímeros. ^[35]

El empleo de las vinazas se ha diversificado tratando de encontrar la mejor opción garantizando la favorabilidad ambiental. La alta riqueza en minerales ha permitido llegar a cabo pruebas usando las vinazas como complementos o enmiendas al suelo ya que cuentan con uno de los elementos fértiles más importantes, el potasio, en el cultivo de la caña de azúcar. A pesar de obtenerse mejoras en sus rendimientos, su uso ha estado limitado al tipo de suelo y, debido al bajo pH se limita su empleo a cantidades relativamente bajas que, comparadas con los grandes volúmenes que se producen diariamente implica la necesidad de buscar otros usos ^[36].

De manera general, los constituyentes son los siguientes: Sustancias inorgánicas solubles en las cuales predominan los iones K, Ca y SO₄, células muertas de levadura, sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos contaminantes, alcohol y azúcar residual, sustancias orgánicas insolubles, sustancias orgánicas volátiles ^[34]. (Ver Anexo A)

CARACTERÍSTICAS	PROMEDIOS
Temperatura	78,0 – 82,0
pH	3,7 – 4,5
Sólidos totales % p/p	9 - 12
DQO mg/l	80.000 – 110.000
DBOs mg/l	45.000 – 50.000
Cloruros mg/l	5.000 – 6.000
Sulfatos mg/l	4.000 – 8.000
Sodio mg/l	400 - 600
Potasio mg/l	8.000 – 12.000
Nitrógeno total mg/l	1.000 – 1.200
Fósforo mg/l	200 - 300
Calcio mg/l	2.000 – 3.500

Tabla 1. Características fisico-químicas de las vinazas.

Fuente: Nimbalkar, D. Vasantdada Sugar Institute, Pune, India. 2005.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO.

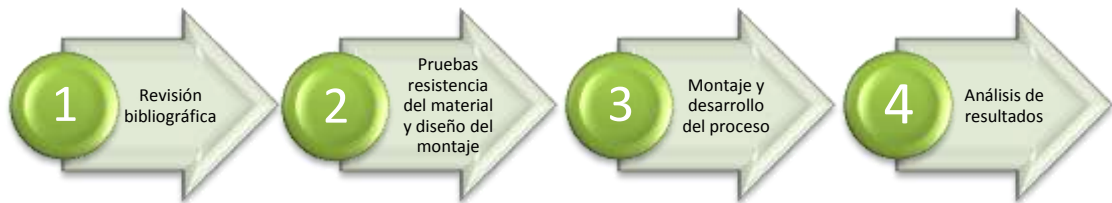


Figura 1. Diagrama general del proceso experimental.

Fuente: Los autores

2.2 MATERIALES

2.2.1 MICROALGAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, se obtuvo de la colección de cepas de la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). Fue cultivada en un Medio Bold Basal compuesto por (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 7,5; NaNO_3 : 25,0; NaCl : 2,5; K_2HPO_4 : 7,5; KH_2PO_4 : 17,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2,5; H_3BO_3 : 11,42; KOH : 31,0 y 1 ml de solución de metales.

El medio de cultivo Bold Basal se usó siguiendo las especificaciones indicadas en el Anexo B; ésta preparación con las soluciones stock se aforó luego a un litro con agua destilada para posteriormente inocularlo con cantidades de cepa *C. vulgaris*, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8~0,4 g/l.

2.2.2 VINAZAS

Las vinazas de destilería de alcohol se encuentran entre los residuos orgánicos de mayor efecto contaminante. Para el trabajo experimental las vinazas utilizadas fueron adquiridas por medio del técnico Eduardo Carreño en el Laboratorio de Procesos de Ingeniería Química.

2.2.3 MATRICES CO-INMOVILIZANTES

Primera fase:

- ✓ Loofha.
- ✓ Poliuretano. Grosor: 1 cm
- ✓ Polietileno de baja densidad. Grosor: 1 cm

Segunda fase:

- ✓ Polietileno de baja densidad en los diferentes grosores (1, 2 y 4 cm). Ver figura 2.

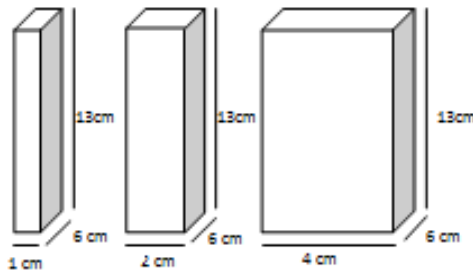


Figura 2. Dimensiones del material

2.2.4 FOTOBIORREACTOR

Se utilizaron botellas plásticas transparentes (Polietileno Tereftalato) tubulares de 2½ litros con diámetro interno de 12 cm y 35 cm de altura, encontradas en el mercado, con un volumen de cultivo de 2 L. La distribución de los biorreactores en el laboratorio fue de tal forma que se acoplaron a un sistema de aireación constante por burbujeo tipo (tubo-difusor) de igual forma se logró una distribución equitativa de luz durante todo el ciclo del día. Ver figura 3.



Figura 3a. Fotobiorreactor con el polímero sumergido en cultivo para pruebas de co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803

Fuente: Los autores



Figura 3b. Montaje completo de fotobiorreactores. Se aprecia el sistema de aireación.

Fuente: Los autores

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con miras a una producción de biomasa más eficiente y rentable, tomando como base investigaciones previas realizadas en el grupo de investigación CIDES, ^[13] la primera fase del diseño experimental consistió en la preselección del material más idóneo. Durante 15 días (haciendo evaluaciones de deterioro y midiendo cantidad de biomasa recuperada cada 5 días) se probaron tres tipos de matrices: Loofha (Matriz orgánica), poliuretano y polietileno de baja densidad (Matrices inorgánicas).

El material seleccionado se trabajó en 3 diferentes grosores 1, 2 y 4 [cm] respectivamente, con el fin de comprobar si el grosor resultaba un factor definitivo en la recuperación de biomasa.

La segunda fase, consistió en probar la capacidad de co-inmovilización del material y la resistencia del mismo a la vinaza, para tal efecto, se co-inmovilizó *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 en el material. Se hizo en medio bold basal. El montaje se realizó para cada grosor en un fotobiorreactor durante 10 días. (Esta fase cuenta con registro fotográfico que se analizará en la discusión de los resultados obtenidos). Para comprobar la resistencia, el material fue sumergido durante 10 días en vinanzas sin diluir. Se observó si su estructura tenía algún cambio, por descomposición bacteriana o por efecto de las demás sustancias contenidas en las vinazas (Ver figura 4). Para las pruebas mencionadas, se realizó original y réplica. Se usó un fotobiorreactor por grosor de material. Cada uno contenía tres muestras del mismo.



Figura 4a. Fotobiorreactor con polímero sumergido.

Fuente: Los autores.



Figura 4b. Montaje Fotobiorreactor con vinazas.

Fuente: Los autores.

Ya verificada la capacidad del material ante la degradación y como agente co-inmovilizante, se procedió con la tercera fase que consistió en la inoculación del material esta se realizó usando medio bold basal, la co-inmovilización tuvo una duración de cinco días. Pasada esta etapa, se sumergió el material impregnado en microalgas en los fotobiorreactores que contenían las vinazas sin diluir. La etapa tuvo una duración de cinco días. La recolección de biomasa se hizo cada 24 horas. El procedimiento para la recolección de biomasa

consistió en raspar la biopelícula (biomasa formada sobre el polímero). Del líquido retirado, se tomaron muestras de 10 ml, cada muestra fue centrifugada (Centrifuga PowerSpin™ MX) a temperatura ambiente a 3400 rpm durante veinte minutos. Luego de la centrifugación se retiró el sobrenadante, se aforó a 10 ml con agua destilada y se centrifugó nuevamente durante diez minutos. Una vez más se retiró el sobrenadante, se removió el pellet (biomasa resultante) y se llevó a papel filtro (Munktell filter AB. Grade: 3 hw) para proceder a su secado en un horno de convección forzada (Binder 500) a una temperatura de 105° C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se llevaron al desecador durante 12 horas y finalmente se pesaron en una balanza digital obteniéndose los datos de producción de biomasa en peso seco. (Ver figura 4).

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la productividad de biomasa recuperada con los distintos grosores del polietileno de baja densidad, se utilizó como herramienta estadística el software PAST versión 2.12^[40]. Para cada uno de los datos obtenidos durante la fase experimental, se comprobó si estos cumplen con las asunciones de distribución normal y homogeneidad de varianza. El test de contraste de normalidad de Shapiro-Wilk y el Test de Levene con un ($p > 0,05$) muestran que los datos efectivamente se ajustan a una distribución normal y a una homogeneidad de varianza. Asunciones que son requisito para la utilización de la prueba paramétrica ANOVA^[41].

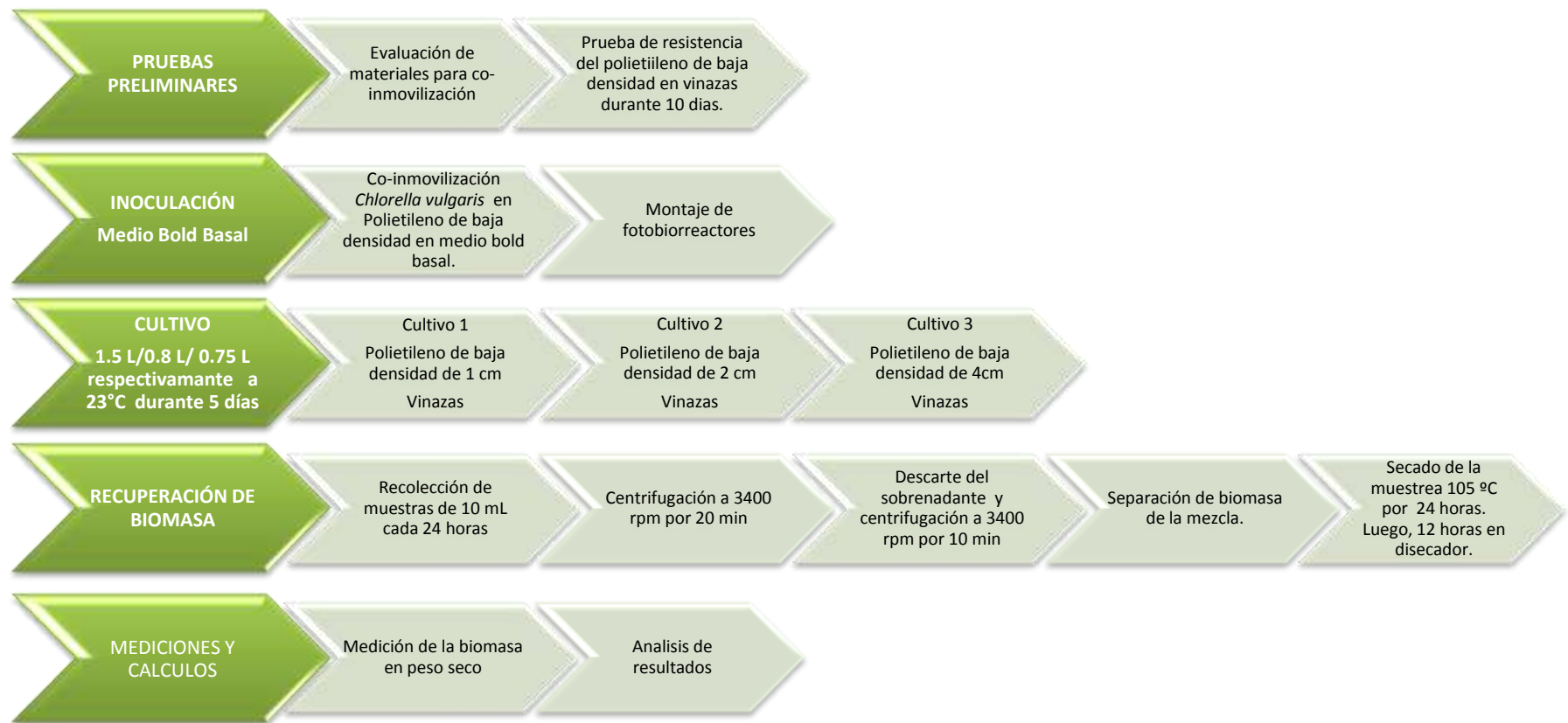


Figura 5. Diagrama metodología experimental

Fuente: Los autores.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados y análisis primera fase



Figura 6a. Loofha

Figura 6b. Poliuretano

Figura 6c. Polietileno

Fuente: Los autores

Se observó que la loofha (Figura 6a) es sensible a la degradación, no es reutilizable y presenta muerte celular. El poliuretano (Figura 6b) a pesar de ser el material más absorbente, presenta degradación irreversible dejando así como mejor opción el polietileno de baja densidad que no presenta cambios en sus propiedades de recuperación de biomasa, sin embargo presenta cambios en su forma y color. Es reutilizable y por sus características, la recuperación de biomasa se facilita. El polietileno de baja densidad (fig. 6c) fue elegido como material idóneo para los experimentos realizados.

La mayor obtención de biomasa se dio mediante cosechas parciales durante cinco días. (Ver figura 7).

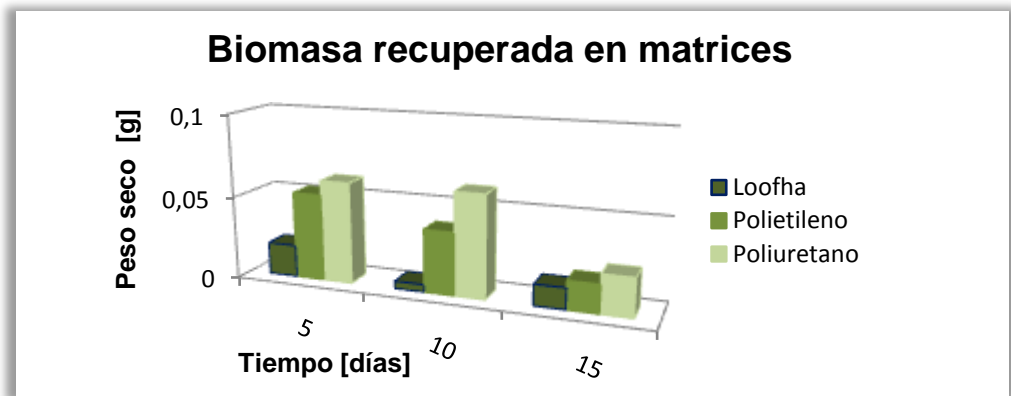


Figura 7. Biomasa recuperada en las diferentes matrices para pruebas parciales cada 5 días

3.2 Resultados y análisis segunda fase

En la figura 8 se muestra el proceso de co-inmovilización de las microalgas en el polímero para cada grosor correspondiente; las algas se adhieren de forma gradual al material durante un tiempo de 10 días, obteniéndose así la biopelícula esperada para la producción de biomasa co-inmovilizada.

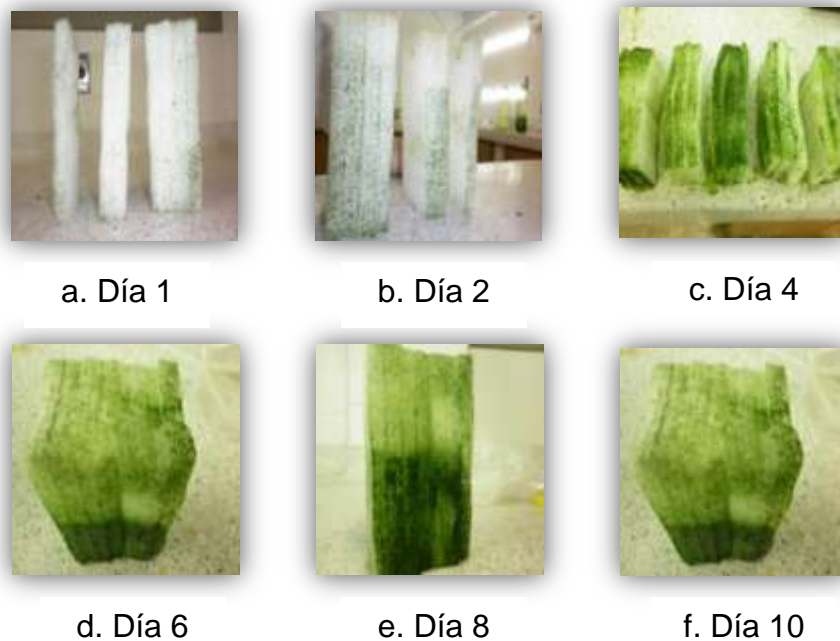


Figura 8. Co-inmovilización de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en polietileno de baja densidad

El experimento, con duración de 10 días, demostró que aunque el polímero demuestra signos de degradación debido al bajo pH del medio (figura 9) este material resiste las condiciones del reactor.

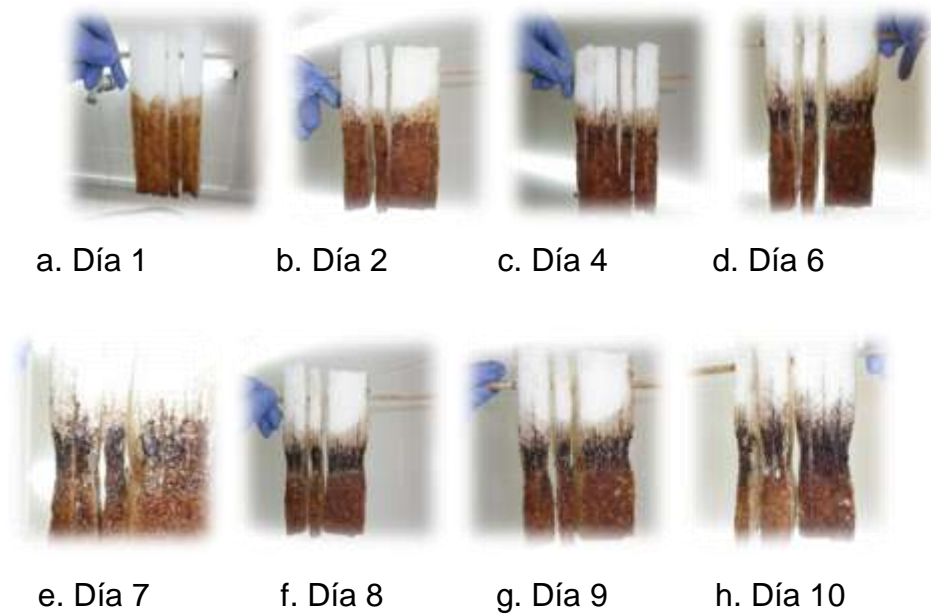


Figura 9. Resistencia del polietileno de baja densidad de grosor 1, 2 y 4 [cm] a la degradación por vinazas.

3.3 Resultados y análisis tercera fase

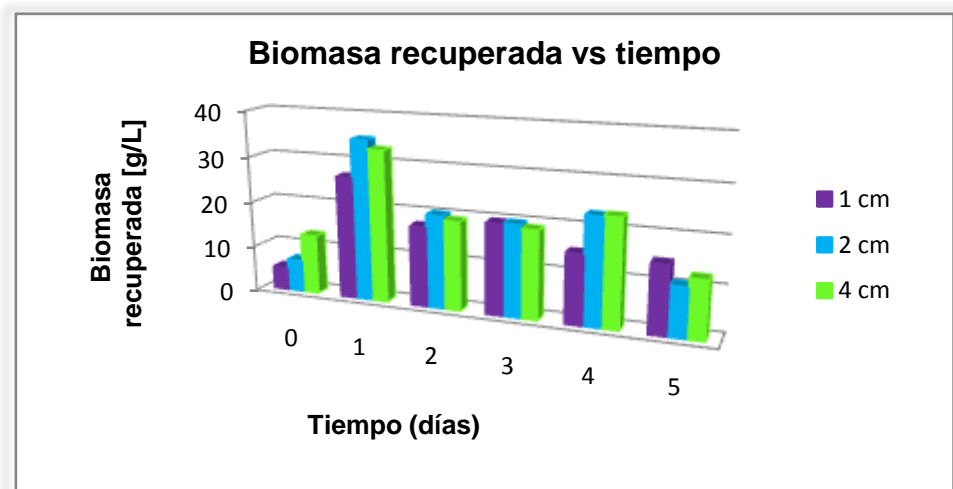


Figura 10. Recuperación de biomasa en g/l

A partir de la figura 8 se puede analizar la producción de biomasa en vinazas durante los 5 días de experimentación. El día cero muestra la cantidad de microalga inoculada en el material previo a ser sometido en las vinazas. El primer día se obtiene la mayor producción de biomasa 26,6 g/l para el material de 1 cm, 35 g/l para el de 2 cm y 33 g/l para el de 4 cm resultados esperados ya que la concentración de nutrientes es la más alta durante el experimento. (Ver figura 10)

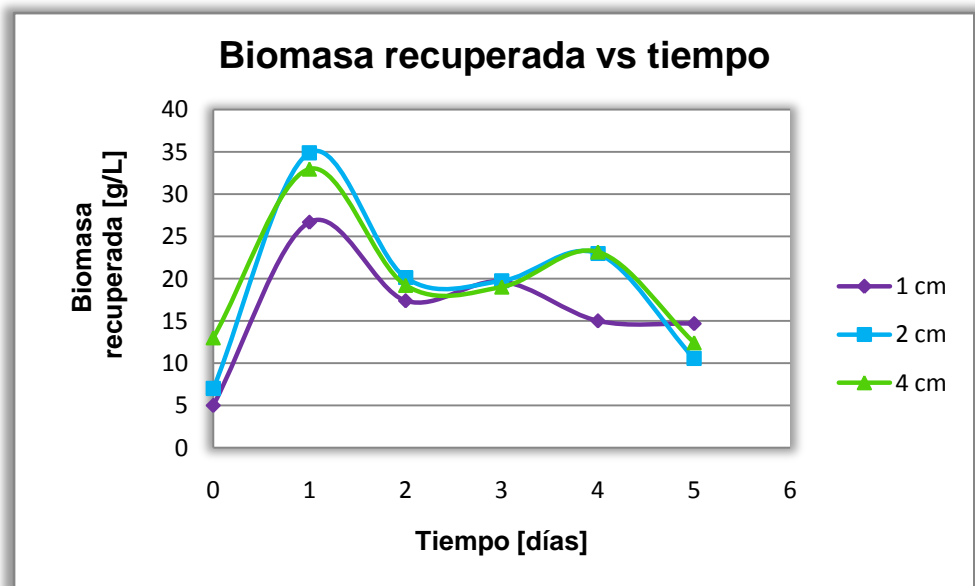


Figura 11. Curva de recuperación de biomasa para cada grosor del polímero

En el segundo y tercer día se observa una disminución significativa de producción, donde el polímero de 1 cm disminuye un 65%, el de 2 cm 57% y el de 4 cm 58% respecto al día anterior. Estos dos días no presentan mayor variación entre ellos. En el cuarto día se evidencia un comportamiento atípico en los materiales de 2 y 4 cm ya que contrario a lo que se espera, la producción respecto al día anterior aumenta en un 15%. El material de 1 cm continúa con la tendencia a disminuir. Sin embargo, el último día de inoculación, el material de un 1 cm es el de mayor producción de biomasa. Estas fluctuaciones en la producción tienen su raíz principalmente en la difusión del aire, ya que al igual que

en experimentos anteriores se evidenció la formación de una biopelícula en los difusores [14] que no permite una aireación homogénea, además se concluye que no existe una relación proporcional entre el área del polímero y la biomasa recuperada dado que el material de 2 cm presenta una mayor producción que el de 4 cm; esto es debido a una sobreproducción de biomasa que se evidenció en fotobiorreactores en forma de sedimento en los fondos. Finalmente, es importante aclarar que al paso de los días los nutrientes presentes en este residuo disminuyen, por lo cual la productividad también decrece (Ver figura 11).

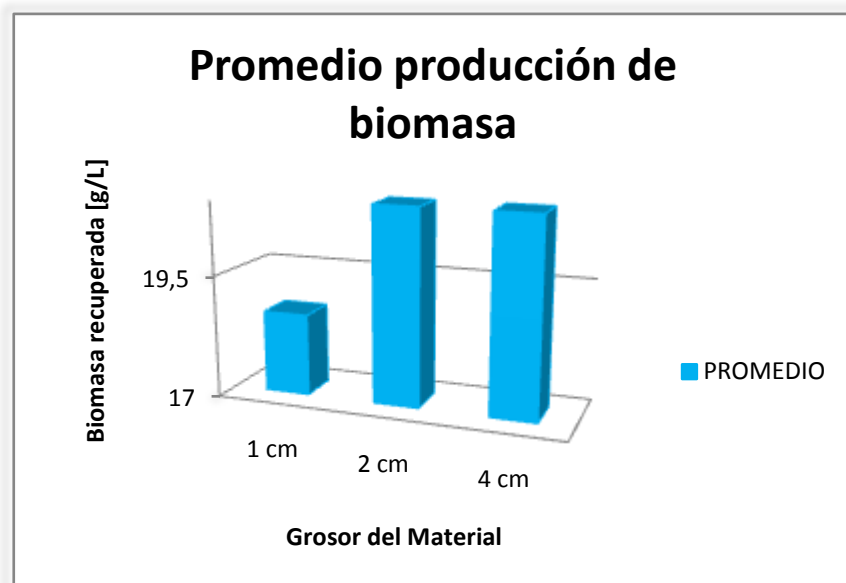


Figura 12. Producción promedio de biomasa recuperada para cada grosor de polietileno de baja densidad

En la figura 10 se muestra la producción promedio de biomasa recuperada durante 5 días para cada grosor trabajado con el polietileno de baja densidad se aprecia que no hay una diferencia significativa en la productividad del polietileno de 2 cm de grosor y el de 4 cm.



Figura 13. Estado final del material luego de aplicar el método de co-inmovilización en vinazas. Se evidencia para los diferentes grosores.

Finalmente, la culminación del experimento evidencia el estado del material el cual aunque no conserva su forma y sus características iniciales, mantiene la capacidad de recuperación de biomasa y permite continuar con el proceso, por lo cual se estima que el material, para cualquier grosor tiene un tiempo de vida productiva no mayor a 30 días.

El análisis estadístico muestra que a pesar que en las gráficas de productividad de biomasa (g/l) se evidencie cierta diferencia entre los grosores manejados, la prueba estadística ANOVA, arroja que sin importar que grosor de material se utilice no hay diferencias significativas en el rendimiento. Esto se garantiza ya que el valor $p = 0,43858$ de normalidad se mantiene por encima de 0,05. (Anexo C).

3.4 Análisis diseño experimental propuesto

Los esquemas que se muestran a continuación (Ver figura 12, 13), se observan dos diseños experimentales. Primero, el diseño que resulta de un trabajo investigativo desarrollado en el grupo de investigación CIDES [14] y segundo, el diseño propuesto como resultado de nuestra investigación.

Diseño Experimental investigación anterior

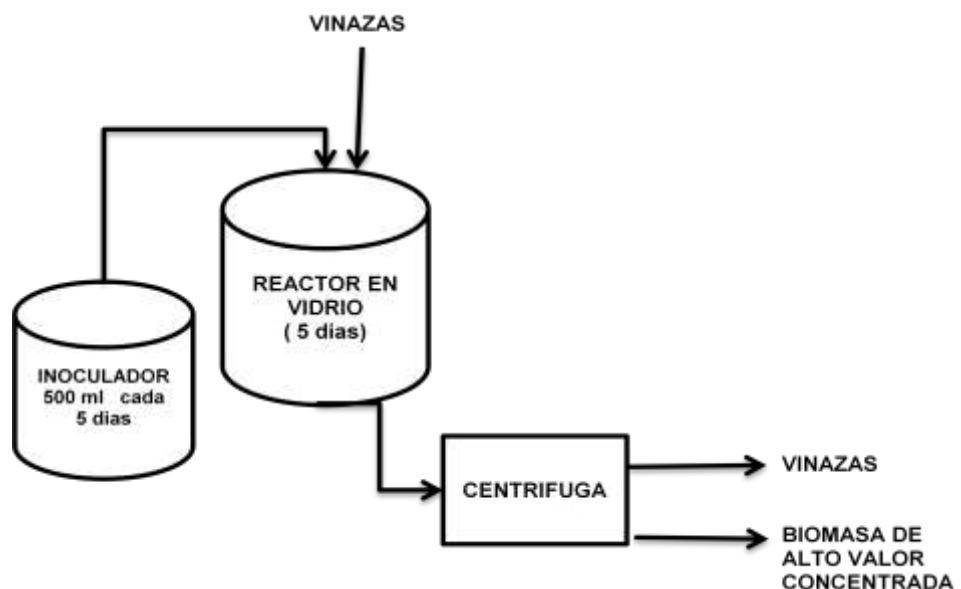


Figura 14. Desarrollo experimental propuesto a partir de los resultados obtenidos en investigaciones previas en el laboratorio CIDES

Diseño Experimental Propuesto

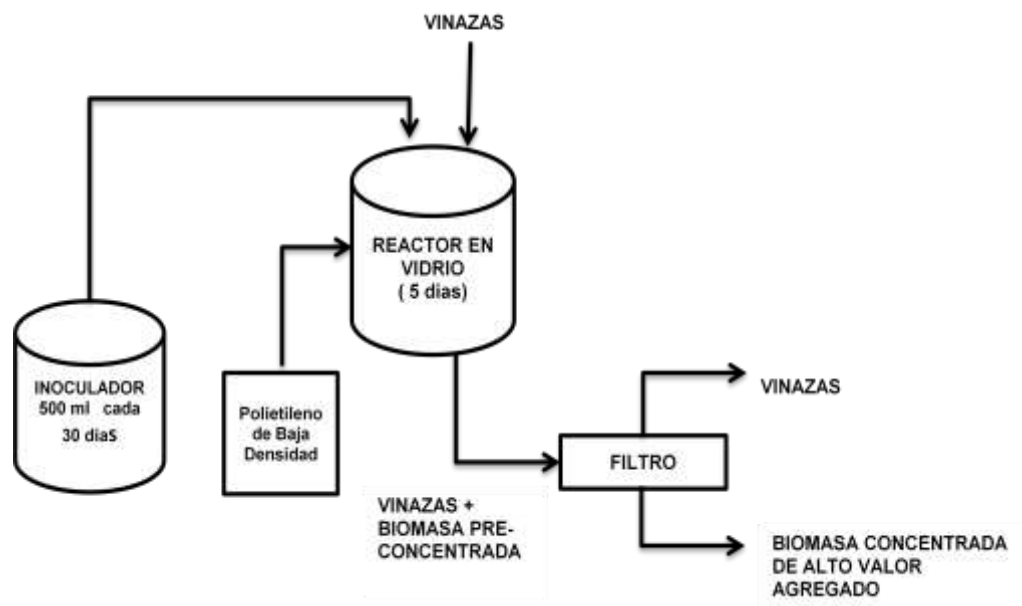


Figura 15. Desarrollo experimental propuesto a partir de los resultados obtenidos en la experimentación.

En el primero, al no existir co-inmovilización celular, es necesario inocular microalgas frescas cada cinco días, además la recuperación de la biomasa producida, debe ser mediante técnicas como floculación o centrifugación, en el caso de la centrifugación, resulta un método muy costoso en comparación con la producción de la biomasa, representando un gasto elevado; sin embargo el diseño obtenido de la experimentación con materiales co-inmovilizantes, aunque de igual forma parte de una inoculación, este proceso se lleva a cabo en el material, lo cual según los resultados obtenidos anteriormente, nos permiten inocular cada 30 días, además cabe resaltar que este material posee un costo pequeño debido a que es un material de reciclaje, ya que es un polímero utilizado para el embalaje de mercancías y es considerado un residuo, su precio en el mercado está alrededor de \$6000 pesos/ metro cuadrado.

En los esquemas anteriores otro aspecto importante es el método de obtención de la biomasa concentrada, ya que la filtración es un método más económico, debido a que la biomasa resultante de la co-inmovilización está pre-concentrada. Es importante hacer énfasis en la disminución de costos, teniendo en cuenta el gasto del polietileno de baja densidad, ya que este valor no es tan relevante como lo es el ahorro en nutrientes (en una sexta parte) y el ahorro comprendido por la filtración.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la matriz más adecuada para el método de co-inmovilización es el polietileno de baja densidad.
- Se comprobaron algunas características de las otras matrices analizadas, como lo fue la loofha, que presenta alto grado de degradación y el poliuretano que es muy absorbente pero se degrada y esto implica residuos en la biomasa recuperada, por lo tanto no es conveniente su uso.
- Se verificó la resistencia del polietileno de baja densidad a los componentes de las vinazas sin diluir en un periodo superior a 10 días, se estableció que es reutilizable y su estructura permite una fácil recuperación de biomasa. La co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 se realizó satisfactoriamente en el polietileno de baja densidad durante los cinco días de inoculación en medio bold basal y sobrevivió a las vinazas presentando un aumento importante en la producción de biomasa.
- La velocidad de producción de biomasa para los 3 grosores manejados en el material es similar, aunque la diferencia no sea significativa, se eligió al material de 2 cm de grosor como el más adecuado ya que se demuestra es el más eficiente.
- El aumento en la tasa de producción de biomasa se considera favorable [un promedio de: $18.67 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (1 cm), $21.67 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (2 cm) y $21.3494 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (4cm)]. Se aumento en una 65 % en comparación con el trabajo investigativo (Grupo de investigación CIDES) ^[14] en la que se obtuvo una producción de $13,45 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$.

RECOMENDACIONES

Se sugiere trabajar con polietileno de baja densidad de 2 cm de grosor puesto que es más económico y tiene un buen rendimiento.

Realizar la caracterización de las vinazas antes y después de realizar el método para determinar que nutrientes y en qué cantidad se remueven, para comprobar las propiedades de remoción de nitrógeno, azufre, orto fosfatos y carbono orgánico, al igual que algunos metales que se mencionan en la literatura para la *Chlorella vulgaris*.

Es necesario determinar la composición de la biomasa para demostrar el valor agregado de la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORRERO, M.A.V., Pereira, J.T.V. y Miranda, E.E., (2003). An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil. *Biomass Bioenergy*. 25, 287–299.
2. E. W. BECKER, et al., (1995). *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge, Great Britain.
3. ASLAN S., Kapdan I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* N° 28: p64–70
4. DE-BASHAN, L.E., Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, *Bioresource Technology* 10: 1611–1627.
5. TRAVIESO L., Benítez F., Sánchez E., Borja R., León M., Raposo F. and Rincón B. (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. N°22: p 467-473.
6. TRAVIESO L., Benítez F., Sánchez E., Borja R., León M., Raposo F. and Rincón B. (2008). Assessment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. *Environmental Technology*. N°19: p 985-992.
7. DE-BASHAN, L.E., Hernández, J.P., Morey, T., Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Res.* 38, 466–474.

8. DE-BASHAN, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.P., Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* (36): 2941–2948.
9. MALLICK N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review *Biometals* (15) 377–390.
10. GONZALEZ, L.E., Cañizares, R.O., Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and Phosphorus Removal from a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60: 259-262.
11. BOROWITZKA, M.A., Borowitzka, J.L. (1988). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
12. GARRIDO M. I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource. Technology* 99: 3949–3964.
13. GARCÍA L. J., Romero A. M. (2010). Optimización de la producción de biomasa de microalgas utilizando materiales co-inmovilizantes. (Optimización de la producción de biomasa de microalgas utilizando materiales co-inmovilizantes- Universidad Industrial de Santander). Libro de tesis.
14. PARRA R. J., Castro C. L. (2011). Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala laboratorio. (Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala laboratorio- Universidad Industrial de Santander). Libro de tesis.

15. GORDON M. J., Polle W. E. (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. *Apple Microbiology Biothecnology* 76: 969-975.
16. MIAO X., Wu Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97: 841-846.
17. HWAN-U B., Kim Y.S., (2009). Review: A change for Korea to advance algal biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 156: 1-7.
18. SCARSELLA M., Belotti G., De Filippis P., Bravi M., (2009). Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. *Dept. of Chemical Engineering Materials Environment*: 1-6.
19. CRUTZEN P.J., Mosier A.R., Smith K.A., Winiwarer W., (2008). N₂O release from agrobiofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys.* 8, 389–395.
20. JEONG M.L., Gillis, J.M.; Hwang, J.Y., (2003). Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, *ull. Korean Chem. Soc. Vol. 24, No. 12* 1763.
21. MORAIS MG. And Costa JAV., (2007). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manage*;48: 2169-73.
22. BENEMAN J.R., Hughes E., (1997). Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Manage.* 38, S467–S473.
23. LARSDOTTER, K., Janse, J La Cour., Dalhammar, G. (2007). Biologically Mediated Phosphorus Precipitation in Wastewater Treatment with Microalgae. *Environmental Technology*, Vol. 28. pp 953-960.

24. LAU, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. (1996). Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella vulgaris*: Optimization through Acclimation. Environmental Technology, Vol. 17 pp 183-189.
25. VALDERRAMA L. T., Del Campo Claudia M., Rodríguez Claudia M., de-Bashan Luz E., Bashan Yoav. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. Water research: 364185-4192.
26. Maeda, S., Sakaguchi, T. (1990). Accumulation and detoxification of toxic elements by algae. In: Akatsuka, I. (Ed.), Introduction to Applied Phycology. SPB Academic Publishing BV, The Hague, The Netherlands.
27. GREENE, B., Bedell, G.W. (1990). Algal gels or immobilized algae for metal recovery. In: Akatsuka, I. (Ed.), Introduction to Applied Phycology. SPB Academic Publishing BV, The Hague, The Netherlands, pp. 137– 149.
28. KALIN M, Wheeler WN, Meinrath G. (2005) The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. J Environ Radioact 78: 151–77.
29. MUNOZ R, Guieysse B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Res 40: 2799–815.
30. SURESH B, Ravishankar GA. (2004) Phytoremediation — a novel and promising approach for environmental clean-up. Crit Rev Biotechnol 24: 97–124.
31. CARRILHO, E.N.V.M., Nobrega, J.A., Gilbert, T.R. (2003). The use of silica-immobilized brown alga (*Pilayella littoralis*) for metal preconcentration and

determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 60: 1131–1140.

32. DURAN-PARRAMO, E. et al (2000), *Appl. Biochem. Biothechnol.* 84-86, 479-485

33. COHEN Y. (2001). Bio-filtration "The treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material" A review. *Biores. Technol.* 77: 257–274.

34. GARCÍA A. O., Rojas C. A. (2006) Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos. *Tecnicaña*.

35. COBOS Y.L., Ortiz H. M. (2007). Evaluación del impacto ambiental producido por el tratamiento anaerobio de vinazas. (Evaluación del impacto ambiental producido por el tratamiento anaerobio de vinazas- Universidad Industrial de Santander). Libro de tesis

36. COBOS Y. L., Ordoñez S. R. (2007). Evaluación del potencial de la producción de biogas a partir de vinazas en un biodigestor anaerobio. (Evaluación del potencial de la producción de biogas a partir de vinazas en un biodigestor anaerobio- Universidad Industrial de Santander). Libro de tesis.

37. LIU, Y.K., Seki, M., Tanaka, H., Furusaki, S. (1998). Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 416–421.

38. HU, Z.; Korus, R.; Levinson, W. (1994). Adsorption and Biodegradation of Pentachlorophenol by Polyurethane-Immobilized Flavobacterium. En: *Environmental Science Technology*. Moscow, Idaho, 28 (3): 491-496.

- 39.** JOHNSON M., Zhiyou W. (2010). Development of an attached microalgal growth system for biofuel production.
- 40.** HAMMER Ø., Harper D.A.T., and Ryan P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. http://palaeo electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- 41.** GONZÁLEZ C. G., Felpeto A. B., Estraviz I. M., Alarcón I. R., Castaño A. R. y Liste A. V. (2006) Tratamiento de datos. Capítulo VII. p 127-147

ANEXOS

Anexo A. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA VINAZA

Tabla 2. Composición química de la vinaza según proceda de jugo, melaza o la mezcla de ambos (promedios de cinco determinaciones)

Propiedad	Melaza	Jugo	Mixto de melaza y jugo
N (kg/m ³)	0,77	0,28	0,46
2O ₅ (kg/m ³)	0,19	0,2	0,24
K ₂ O (kg/m ³)	6	1,47	3,6
CaO (kg/m ³)	2,45	0,46	1,18
MgO (kg/m ³)	1,04	0,29	0,53
SO ₄ (kg/m ³)	3,73	1,32	2,67
Materia orgánica (kg/m ³)	52,04	23,44	32,63
Fe (ppm)	80	69	78
Cu (kg/m ³)	5	7	21
Zn (kg/m ³)	3	2	19
Mn (kg/m ³)	8	7	6

Fuente: (Gloria & Orlando, 1983)

Anexo B. MEDIO BOLD BASAL

Tabla 3. Diferentes composiciones de las Stock Solutions, necesarias para preparar el medio de cultivo Bold Basal para un volumen de trabajo de un litro

Macronutrientes		
Soluciones Stock		Para 400 mL
1.	NaNO₃	10,0 g
2.	NaCl	1,0 g
3.	MgSO₄·7H₂O	3,0 g
4.	KH₂PO₄	7,0 g
5.	K₂HPO₄	3,0 g
6.	CaCl₂·2H₂O	1,0 g
Micronutrientes		
Soluciones Stock		Para 1 L
Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse)	7. ZnSO₄·7H₂O	8,82 g
	MnCl₂·4H₂O	1,44 g
	MoO₃	0,71 g
	CuSO₄·5H₂O	1,57 g
	Co(NO₃)₂·6H₂O	0,49 g
	8. H₃BO₃	11,42 g
	9. EDTA	50,0 g
	KOH	31,0 g
	10. FeSO₄·7H₂O	4,98 g
	H₂SO₄ (concentrado)	1,0 mL
Medio <i>Bold Basal</i>		Para 1 L
Soluciones Stock 1-6 (Macronutrientes)		10 mL cada una
Soluciones Stock 7-10 (Micronutrientes)		1 mL cada una

Fuente: Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, UK

Anexo C.

Figura C.14. Test de normalidad obtenido con el programa PAST; Productividad de biomasa ($\text{g/L} \cdot \text{d}^{-1}$)

	1 cm	2 cm	4 cm
N	5	5	5
Shapiro-Wilk W	0,8608	0,8608	0,9423
p(normal)	0,2313	0,2313	0,6823
Jarque-Bera JB	0,8017	0,8017	0,3296
p(normal)	0,6697	0,6697	0,8481
p(Monte Carlo)	0,1502	0,1483	0,8187
Chi ²	0,6	0,6	0,6
p(normal)	0,43858	0,43858	0,43858
Chi ² OK (N>20)	NO	NO	NO

Figura C.15. ANOVA de una vía.

Repeated measures

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	23,8979	2	11,9489	0,3415	0,7174
Within groups:	419,884	12	34,9904		
Total:	443,782	14			
omega ² :	-0,09625				

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) = 0,6599
Based on medians: p(same) = 0,7988

Welch F test in the case of unequal variances: F=0,2394, df=7,778, p=0,7927

Residuals

Tukey's pairwise comparisons:
Q \ p(same)

	1 cm	2 cm	4 cm
1 cm		1	0,7592
2 cm	0		0,7592
4 cm	1,012	1,012	