

**APROVECHAMIENTO DE VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 A ESCALA LABORATORIO**

CARMEN LUCÍA CASTRO RUIZ

JHON ALEXANDER PARRA RODRÍGUEZ

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

2011

**APROVECHAMIENTO DE VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 A ESCALA LABORATORIO**

CARMEN LUCÍA CASTRO RUIZ

JHON ALEXANDER PARRA RODRÍGUEZ

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**

2011

A Dios por regalarme la vida, la sabiduría y fortaleza para superar satisfactoriamente cada etapa de la vida.

A mis padres Manuel y Rosenda por su amor incondicional, apoyo, consejos y sobre todo por ser mi inspiración y motivación para hacer las cosas.

A mis tíos Pedro y Martha por sus consejos y ser parte importante en mi formación como persona.

A mis hermanos, familia y amigos por estar conmigo en todo momento y regalarme tan gratos y hermosos recuerdos.

A Jorge Eduardo por su compañía y amor incondicional.

Carmen Lucía Castro Ruiz

A Dios por darme la sabiduría y por permitirme culminar esta etapa de mi vida Satisfactoriamente,

A mi padre y a mi madre por darme todos sus consejos, apoyo, amor y guiarme en el trayecto de mi vida,

A mis tíos Juan Bautista y Nancy Quintero por su apoyo incondicional durante toda mi vida y su comprensión, a mi familia a mis amigos por su compañía y momentos inolvidables.

Jhon Alexander Parra Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por su apoyo económico.
- INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETROLEO, por su aporte en el marco de este proyecto.
- UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por brindarnos los conocimientos que fueron base para el desarrollo de este trabajo.
- CORPORACION 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. CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA, por su gran aporte científico.
- ANDRES FERNANDO BARAJAS, por su valioso apoyo y dedicación.
- EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, por su colaboración y orientación incondicional.
- CARLOS GERARDO GARCÍA por su incondicional apoyo.
- A Dios, a nuestras familias y amigos, por su apoyo, motivación y ser nuestro motivo de inspiración.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
1.1. MICROALGAS	17
1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	18
1.3. VINAZAS	18
1.4. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. MICROALGAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	21
2.2. FOTOBIOREACTOR.....	21
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4. APLICACIONES	32
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	44

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Montaje biorreactores laboratorio	22
Figura 2. Procedimiento experimental	23
Figura 3. Biomasa seca en diferentes tratamientos (A la izquierda 10%v/v, centro 50%v/v, derecha 100%v/v)	25
Figura 4. Producción de biomasa en medios de cultivo con concentraciones de vinaza de 10%v/v y 50%v/v	26
Figura 5. Producción de biomasa en medios de cultivo con concentraciones de vinaza de 10%v/v y 50%v/v y 100%.....	27
Figura 6. Comportamiento de pH.....	29
Figura 7. Producción promedio de biomasa durante diez días	30

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados como tratamientos.....	23
Tabla 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y comparación por pares con U Mann-Whitney con el programa PAST.	27
Tabla 3. Relación de producción de biomasa	31
Tabla 4. Composición química de la vinaza según proceda de jugo, melaza o la mezcla de ambos (promedios de cinco determinaciones).....	44
Tabla 5. Diferentes composiciones de las Stock Solutions, necesarias para preparar el medio de cultivo Bold Basal para un volumen de trabajo de un litro	45
Tabla 6. Test de normalidad obtenido con el programa PAST; Productividad de biomasa (g/L*d ⁻¹)	46

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Composición química de la vinaza.....	44
Anexo 2. Medio Bold basal.....	45
Anexo 3. Test de normalidad.....	46

RESUMEN

TITULO: APROVECHAMIENTO DE VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 A ESCALA LABORATORIO*

AUTORES: CASTRO RUIZ Carmen Lucía, PARRA RODRIGUEZ Jhon Alexander.**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, *Chlorella vulgaris*, fotobiorreactores, vinazas, cultivo mixotrófico.

Para tratar aguas residuales de destilerías (vinazas) las microalgas surgen como alternativa viable y económica, caracterizándose por adaptarse a casi todos los ambientes y poseer el potencial para remover sustancias nitrogenadas y fosforiladas. Por tal razón se estudió el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio con vinazas oscuras como medio de cultivo.

Se realizaron tres diferentes tratamientos por triplicado a distintas concentraciones de vinazas oscuras/Agua Destilada (10%v/v, 50%v/v, 100%v/v) manteniendo la temperatura y ciclos de luz/oscuridad constantes durante un periodo de once días. Finalmente se analizó el comportamiento y producción de biomasa utilizando la técnica de peso seco. Encontrando que existen diferencias significativas entre los tratamiento utilizados ($p < 0,05$). La mejor productividad de biomasa fue de $13,45 \text{ (g/L}\cdot\text{d}^{-1})$ presentándose en el cultivo con 100%v/v de vinaza. Por tanto las vinazas oscuras sin disolver son favorables como medio de cultivo para *C. vulgaris* suministrando los nutrientes necesarios para conseguir una productividad alta de biomasa. Sin embargo para el tratamiento de vinazas, al parecer la microalga no posee por sí sola la capacidad de eliminar la gran cantidad de carga orgánica que estas poseen y que les da su color oscuro característico.

Este trabajo hace parte del proyecto “Bioprospección de Microalgas Colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710 financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, con la participación de la Universidad Industrial de Santander, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL y la Corporación Instituto de Morrosquillo.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de ingeniería Química. Directores: Ph. D Viatcheslav Kafarov M.Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo, Andrés Fernando Barajas Solano

ABSTRACT

TITLE: USE OF VINASSE AS CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 IN LABORATORY-SCALE*

AUTHORS: CASTRO RUIZ Carmen Lucía, PARRA RODRIGUEZ Jhon Alexander.**

KEY WORDS: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, photobioreactors, vinasse, mixotrophic culture.

For treating distillery sewage (vinasse), the microalgae emerge as a viable and economical, it's characterized by suit almost any environment and have potential to remove nitrogenous substances and phosphorylated. For this reason we studied the growing of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 in laboratory scale photobioreactors with dark vinasse as culture medium.

Three different treatments were performed in triplicate with different concentrations of vinasse dark/distilled water (10% v / v, 50% v / v, 100% v / v), maintaining the temperature and cycles of light / dark constant over a period of eleven days. Finally the behavior and biomass production was analyzed using the technique of dry weight. Finding that there are significant differences between the treatments used ($p < 0.05$). The best biomass productivity was 13.45 (g / L * d-1) present in the culture with 100% v / v of vinasse. Therefore the undissolved dark stillage are favorable culture medium for *C. vulgaris* providing the nutrients needed to achieve high productivity of biomass. However, for the treatment of vinasse, apparently the microalgae alone does not have the ability to remove the great amount of organic load that they have and that gives them their characteristic dark color.

This work it's part of the "Bioprospecting Colombian Microalgae for biodiesel production" code 2008D32006-6710 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, with the participation of the Universidad Industrial de Santander, the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL and Morrosquillo Institute Corporation.

* Thesis

** Faculty of engineering physics chemistry. School of Chemical engineering. Advisors: Ph. D Viatcheslav Kafarov M.Sc. Crisóstomo Barajas. Supervisor: B. Sc. Andrés Fernando Barajas Solano

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles ha creado incertidumbre en relación a su sostenibilidad, no solo en lo que respecta a su agotamiento sino que además por los efectos negativos de las emisiones del CO₂. (Brennan & Owende , 2010). Por tal razón surge la necesidad de buscar nuevas formas de energía sostenibles como el bioetanol, biodiesel, entre otros (Demain, 2009); sin embargo, esto genera otros tipos de residuos contaminantes como las aguas residuales de destilería conocidas como “Vinazas”, estas se caracterizan por su bajo pH (entre 4 y 5) (Travieso et al, 2008a), poseer altos contenidos de materia orgánica y nutrientes como nitrógeno, azufre, fósforo y potasio (Travieso et ál, 2008a); estos residuos al ser vertidos en fuentes hídricas sin ningún tipo de tratamiento causa un gran impacto sobre el medio ambiente, según Travieso et al (2008b) un m³ de vinaza equivale a la contaminación generada por 1000 habitantes.

Diferentes estudios han podido constatar el gran potencial que poseen las microalgas para remover sustancias nitrogenadas y fosforiladas (Aslan & Kapdan , 2006), caracterizándose por su capacidad de adaptación a casi todos los ambientes, mantener su producción durante todo el año y ayudar a mantener la calidad del aire (Brennan & Owende , 2010), además poseen la habilidad de asimilar nitrógeno inorgánico dentro de su biomasa convirtiéndose en una estrategia para la desintoxicación de cuerpos acuíferos (An et al, 2003). Debido a esto las microalgas surgen como una alternativa viable para la valoración de las vinazas y económica porque a la biomasa producida se le genera un valor agregado (producción de biocombustibles, alimentos, metabolitos de alto valor agregado, etc).

En éste trabajo se evaluó el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y la viabilidad de utilizar vinazas como medio de cultivo en fotobiorreactores a escala de laboratorio.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. MICROALGAS

Las microalgas son la forma más simple y más abundante de la vida vegetal en la tierra y son las responsables de más de la mitad de la producción primaria de oxígeno a nivel mundial. (Edberg , 2010).

Las algas pueden crecer autotrófica o heterotróficamente; las que crecen autotróficamente requieren compuestos de carbono inorgánicos como CO₂, sales y energía lumínica para crecer a través de la fotosíntesis; y las heterotróficas, requieren una fuente externa de carbono orgánico y nutrientes para suplir su demanda energética, aunque algunas presentan un comportamiento mixto y son conocidas como algas mixotróficas. (Brennan & Owende , 2010)

Actualmente las microalgas son consideradas como una alternativa para la producción de biocombustibles debido a que no requieren grandes cantidades de tierras (Chisti, 2008), sin embargo requieren hasta 11-13 millones L ha⁻¹ año⁻¹ de agua para su cultivo en estanques abiertos (Chinnasamy et al, 2010). Su capacidad de crecer en las aguas residuales industriales, municipales, agrícolas y el agua de mar no solo permiten superar este obstáculo, sino que también se transforma en una alternativa para el tratamiento de las mismas. (Chinnasamy et al, 2010)

1.2. *Chlorella vulgaris*

El nombre *Chlorella* proviene del griego *chloros*: verde; y del sufijo diminutivo latino *ella*: "pequeño", fue descubierta y nombrada por M. W. Beyerinck en Holanda en 1890. *Chlorella* es un género de algas verdes unicelulares. Tiene forma esférica, cerca de 2-10 µm de diámetro (Song et al, 2008), sin flagelo. Tiene un ciclo de vida simple que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Brennan & Owende , 2010). Puede crecer tanto autotróficamente como heterotróficamente y por eso es un alga mixotrófica (Richmond, 2004).

1.3. VINAZAS

Con la Ley 693 del año 2001 y su Resolución reglamentaria 189687, de julio 17 de 2003 se dispuso el uso del etanol para oxigenar las gasolinas y reducir la contaminación en las ciudades de más de 500.000 habitantes (Quintero et al, 2006), durante su producción se genera otro tipo de desechos también nocivos para el planeta, llamados vinazas (Quintero et al, 2006); existen dos tipos: primarias y secundarias, las primarias u oscuras provienen específicamente del proceso de evaporación y las secundarias o claras de la destilación.

Las vinazas se producen en una relación aproximada de 13:1, es decir por cada litro de alcohol se obtienen 13 litros de vinaza (Quintero et al, 2006). Además posee una demanda Química de Oxígeno (DQO₅) entre 60 y 70 g/L y un pH alrededor de 4. (Lezcano & Mora). Contienen principalmente materia orgánica, potasio (K), azufre (S), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y calcio (Ca); sin embargo, ésta composición es variable según provenga de melaza, jugo o la mezcla de

ambos (García & Rojas , 2006) (Anexo 1). Por tal razón las vinazas se encuentran entre los residuos orgánicos de mayor efecto contaminante de fuentes hídricas.

1.4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los principales factores de impacto en el crecimiento de microalgas incluyen pH, temperatura y la mezcla de cultivo líquidos. (Yang et al, 2008).

Todos los organismos vivos incluyendo las microalgas requieren de un medio de cultivo que contenga todos los nutrientes esenciales que necesiten para su desarrollo (Edberg , 2010) lo que conduce a tener una buena producción de biomasa. El mayor contribuyente en la producción de biomasa de algas es el carbono, seguido por el nitrógeno; el carbono se puede añadir en compuestos orgánicos, tales como peptona, ácido acético o en compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono (Richmond, 2004).

La temperatura podría afectar el metabolismo de las algas (Goldman & Carpenter, 1974); de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento; *C. vulgaris* podría dividirse en dos tipos de cepas: la de baja temperatura (25 -30) °C y alta temperatura (35 – 40) °C (Sorokin, 1959); la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* disminuye cuando la temperatura es superior a 25°C (Sayed & El-Shahed, 2000).

Según Edberg (2010), el pH del medio de cultivo perturba el crecimiento de *C. vulgaris*., afectando la eficacia del uso de carbono, la capacidad de absorción de los iones, el reciclaje, y la toxicidad de los metabolitos en el crecimiento de microalgas (Borowitzka & Borowitzka, 1988). A pH menor a 4, el alga no es capaz de crecer, en cambio, en un pH cercano o igual a 6, el crecimiento es más rápido que a un pH de 8, además a pH 10 y 12 el crecimiento se reduce en comparación con un pH de 8. A pesar de que *C. vulgaris* puede crecer en un amplio rango de

pH, se recomienda siempre mantener un pH de aproximadamente 6 (Lustigman et al, 1995).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

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): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,075; NaNO_3 : 0,25; NaCl : 0,025; K_2HPO_4 : 0,075; KH_2PO_4 : 0,175; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,025; H_3BO_3 : 0,01142; KOH : 0,031 y 1 mL de solución de metales.

El medio de cultivo Bold Basal se usó siguiendo las especificaciones indicadas en el Anexo 2; 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 equivalente a 0,4 g/L, el cual corresponde a la concentración celular óptima para la producción de biomasa, derivado de experimentaciones anteriores del grupo de investigación.

2.2. 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.

Figura 1. Montaje biorreactores laboratorio



Fuente: Los autores

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó el crecimiento de *C. vulgaris* UTEX 1803 en un medio de aguas residuales o vinazas primarias, para lo cual se llevaron a cabo tres etapas. En la primera, se revisó la viabilidad de los métodos de cuantificación de productividad celular como son densidad óptica, clorofila total (Chl *a* + Chl *b*) y peso seco. Para la segunda etapa se evaluó el efecto de la concentración de vinazas en tres diferentes tratamientos: 10%v/v, 50%v/v y 100%v/v (vinazas/agua destilada) (Tabla 2) sobre el crecimiento celular. Para evitar problemas de carencia e independencia en los datos se realizó un diseño experimental (Tabla 1), consistiendo en una original y dos replicas para cada uno de los tratamientos. Finalmente para llevar a cabo la tercera etapa, se evaluó la producción de Biomasa. Para esto, se tomó un volumen de 10 mL de cada fotobiorreactor durante la fase experimental (diez días). Cada muestra fue centrifugada a 3400 rpm, durante veinte (20) minutos (Centrifuga PowerSpin™ MX). Una vez culminada la centrifugación se procedió a retirar el sobrenadante del tubo para eliminar el medio presente, teniendo precaución de no remover el pellet (biomasa resultante). Seguidamente, las muestras se aforaron hasta obtener un volumen de

10 mL utilizando agua destilada para centrifugar nuevamente durante diez (10) minutos. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se depositó en papel filtro (secado y pesado con anterioridad), para luego ser llevado a un horno de convección forzada (Binder) a una temperatura de 105° C, durante 24 horas; al término de estas, se retiraron las muestras y se llevaron a un desecador y luego de doce (12) horas se pesaron en una balanza digital Precisa Gravimetricsc A6 (XB 220 A) registrándose los datos de peso seco.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados como tratamientos

Experimento Vinaza / Agua destilada (v/v)	Microalga (mL)	Vinaza (mL)	Agua destilada (mL)
10%	500	150	1350
50%	500	750	750
100%	500	1500	0

Fuente: Los autores

Figura 2. Procedimiento experimental



Fuente: Los autores

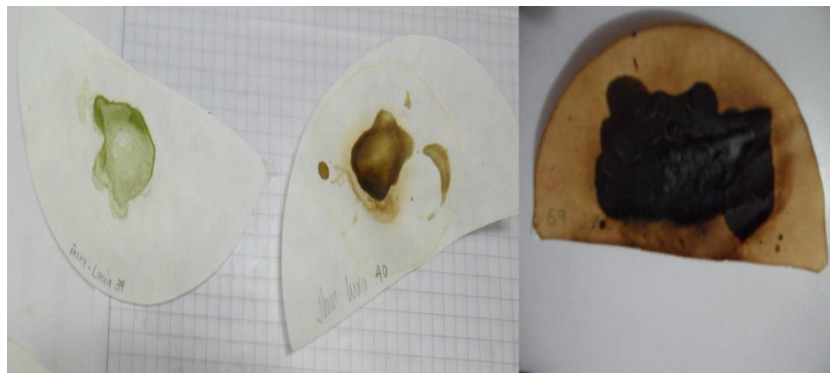
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de la productividad de biomasa utilizando como medio de cultivo agua residual de destilerías a distintas concentraciones se utilizó como herramienta estadística el software PAST versión 2.12 (Hammer et al, 2001). Para los tratamientos de 10%v/v y 50%v/v se realizó una prueba paramétrica (Prueba *T* student) debido a que presentaron una distribución normal ($p > 0,05$). Para comparar los dos tratamientos anteriores con el de 100%v/v, se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) por no cumplir con la asunción de distribución normal y homogeneidad de varianza incluso después de transformados los datos (González et al., 2006). (Anexo 3)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar los métodos de medición de la productividad de biomasa en *C. vulgaris* en las vinazas oscuras como medio de cultivo, se presentaron inconvenientes para estimar la densidad óptica y la clorofila total. Aun manteniendo en todos los fotobiorreactores las mismas condiciones de iluminación y de aireación, la gran cantidad de carga orgánica que poseen las vinazas oscuras, impidió que la entrada de luz fuera homogénea en todo el fotobiorreactor; como consecuencia, las microalgas en los tratamientos a 100% v/v y de 50%v/v tuvieron un comportamiento heterotrófico. En el tratamiento de 10%v/v por poseer menos concentración de vinazas oscuras en el medio de cultivo, las microalgas presentaron un comportamiento mixotrófico; se asume que las células que se encontraban cerca a las paredes del fotobiorreactor gracias a la buena aireación fueron capaces de realizar fotosíntesis, mientras que las ubicadas hacia el centro entraron en una etapa de heterotrofismo. Esto fue evidenciado en la biomasa recuperada en los papeles filtro (Figura 3). Por cuestiones prácticas y con el fin de poder estimar la productividad de biomasa de la misma manera en todos los tratamientos, se optó por utilizar el método peso seco.

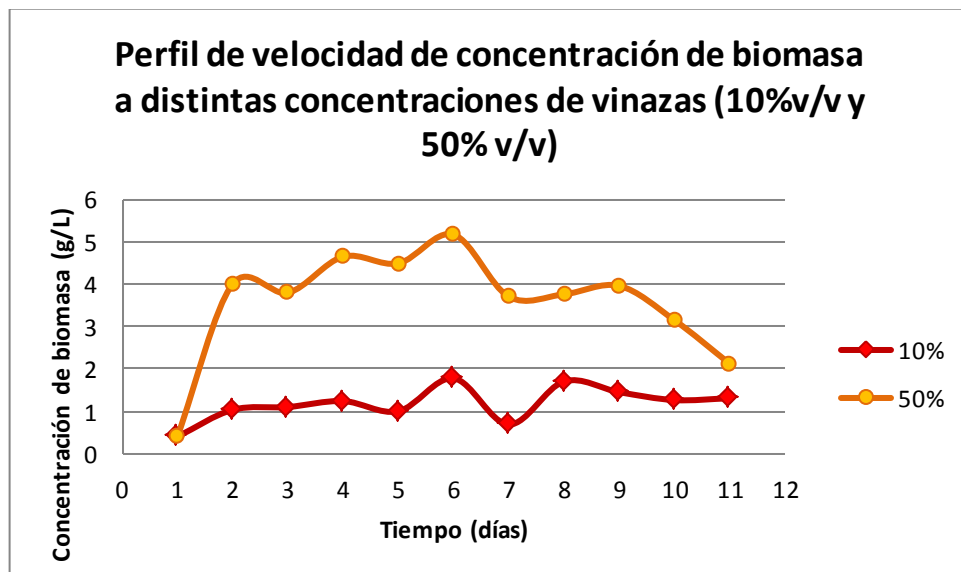
Figura 3. Biomasa seca en diferentes tratamientos (A la izquierda 10%v/v, centro 50%v/v, derecha 100%v/v)



Fuente: Los autores

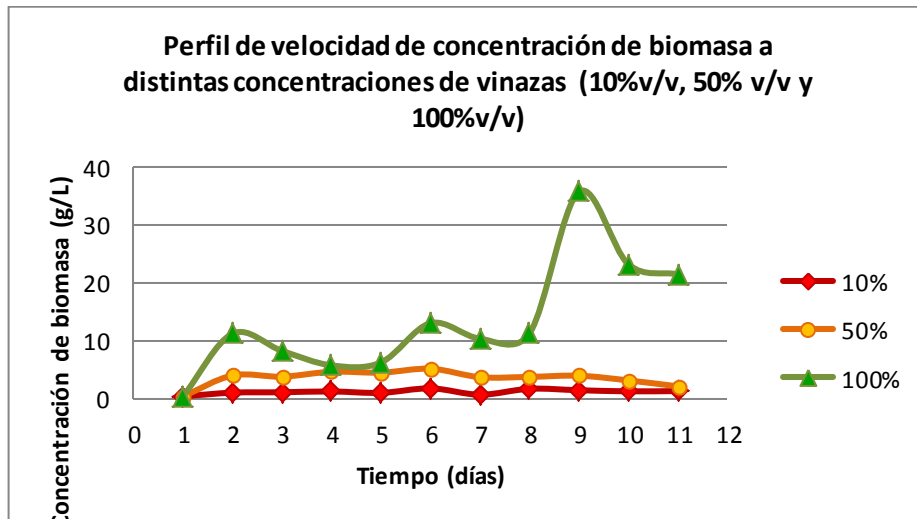
Una vez, escogido el método de peso seco, se estimó la productividad de biomasa obtenida en los tratamientos a 10%v/v y 50%v/v durante diez días. La prueba de T con un ($P < 0.05$) permite constatar que si existe diferencias entre ambos tratamientos como se evidencia en la Figura 4. Al segundo día en el tratamiento de 50%v/v, la productividad de biomasa se disparó desde su condición inicial de 0,4 g/L hasta 4 g/L. Durante los siguientes días la productividad de biomasa oscilo hasta alcanzar su pico máximo en el sexto día de seguimiento (5,167 g/L). En el tratamiento de 10%v/v a partir del segundo día se observó un productividad relativamente constante durante el periodo experimental. En el día siete ambos tratamientos presentaron una disminución en la productividad de biomasa, probablemente este comportamiento se deba al agotamiento de los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

Figura 4. Producción de biomasa en medios de cultivo con concentraciones de vinaza de 10%v/v y 50%v/v



Fuente: Los autores

Figura 5. Producción de biomasa en medios de cultivo con concentraciones de vinaza de 10%v/v y 50%v/v y 100%



Fuente: Los autores

Tabla 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y comparación por pares con U Mann-Whitney con el programa PAST.

Kruskal-Wallis test:	2, N= 90	p= ,0000	
Comparación por pares utilizando U-Mann Whitney			
	10%	50%	100%
10%	0	4,49E-11	3,68E-11
50%	1,35E-10	0	2,13E-05
100%	1,10E-10	6,39E-05	0

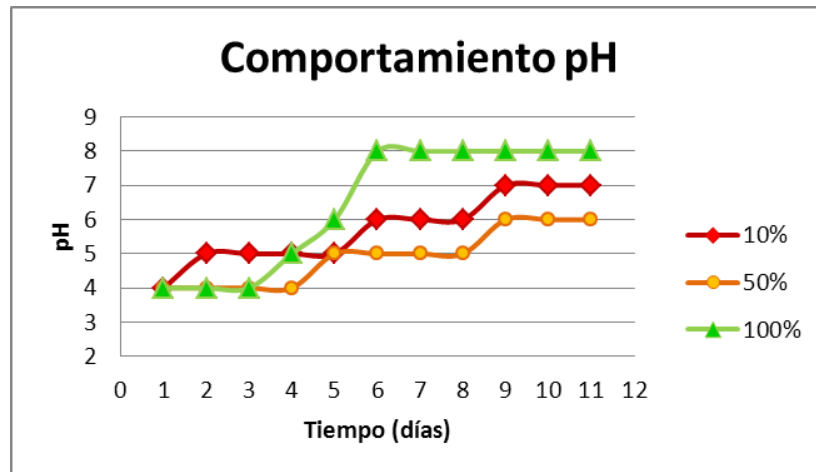
Fuente: Los autores

En el tratamiento de 100%v/v al igual que en los otros tratamientos se evidenció que *C. vulgaris* tuvo un crecimiento relativamente alto en el segundo día de tratamiento (figura 5) probablemente el cambio de medio de cultivo provoca que los microorganismos entren en un periodo de estrés y al tratar de sobrevivir aprovechan al máximo el gran contenido de nutrientes que poseen las vinazas. En la figura 5 se nota que en el tratamiento de 100%v/v la productividad de biomasa

es significativamente mayor que en los otros dos tratamientos; la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 2) permite corroborar que efectivamente existen diferencias significativas entre los tres tratamientos. En el tercer día hasta aproximadamente el quinto día se ven fluctuaciones en todos los tratamientos (10%v/v, 50%v/v y 100%v/v) debido posiblemente a factores de adaptación como pH, luz, aireación y temperatura (Goldman & Carpenter, 1974); sin embargo la luz y la temperatura se mantuvieron controladas durante todo el periodo de prueba en los tres tratamientos, por ende se deduce que estas fluctuaciones se deben tanto a el medio ácido (Borowitzka & Borowitzka, 1988) generado por la vinazas como a problemas con la aireación. En cuanto al pH, por ser bajo, contribuye a la inhibición de algún proceso metabólico (Ardila & Rodríguez, 2011), por tanto estas fluctuaciones podrían traducirse en una fase de adaptación al pH. Respecto a la aireación, se presentaron problemas de taponamiento en los difusores debido al crecimiento de un biofilm impidiendo la entrada constante de aire afectando el comportamiento heterotrófico de las microalgas, el cual requiere de altas concentraciones de O₂ para realizar de forma eficiente los procesos catabólicos y así obtener energía en forma de ATP para su supervivencia (Campbell & Reece, 2005)

En el día seis se observó en los tres tratamientos un aumento en la biomasa, gracias a que hubo más control en cuanto a la limpieza de los difusores. Sumado a esto el pH en el medio es estabilizado (Figura 6), como consecuencia a la acción de las microalgas que se encargan de realizar el proceso de disociación del ácido en exceso (Ardila & Rodríguez, 2011) presente en las vinazas. Del día nueve en adelante en los tratamientos a 10%v/v y 50%v/v la producción de biomasa disminuye, mientras que en el tratamiento de 100%v/v en el día nueve se presentó el pico más alto de productividad (figura 5). Esto se debe probablemente al mayor contenido de vinazas presente en este tratamiento. A partir de éste punto la productividad decae al igual que en los otros tratamientos (figura 5).

Figura 6. Comportamiento de pH



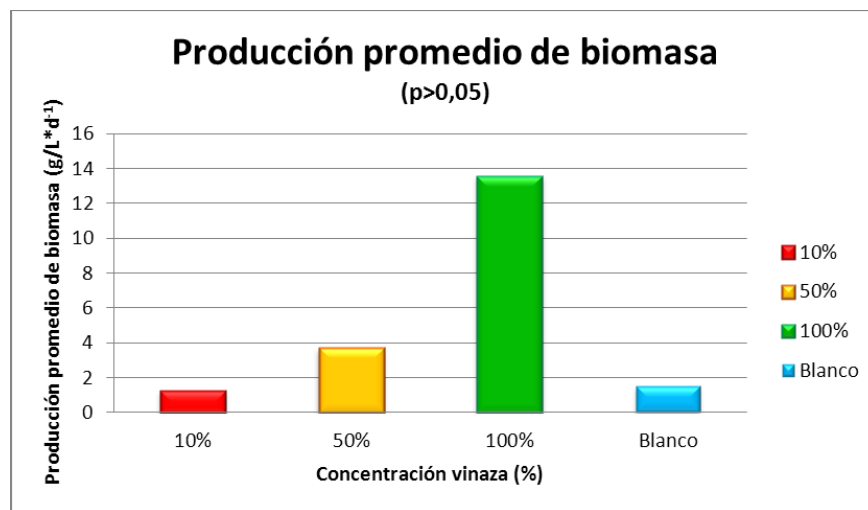
Fuente: Los autores

Para tener una mejor estimación de la productividad de biomasa durante el transcurso experimental se tuvo en cuenta su promedio (Figura 7); evidenciándose que entre los tres tratamientos, el de 100%v/v tuvo una mayor productividad. En principio se podría pensar que la productividad del tratamiento de 50%v/v alcanzaría la mitad de la del tratamiento de 100%v/v y el tratamiento de 10%v/v alcanzaría un 10% de la misma; pero esto no fue lo que ocurrió; en el tratamiento de 100%v/v la productividad de biomasa alcanza un valor de $13,45 \text{ g/L}\cdot\text{d}^{-1}$ (100%), mientras que en los tratamientos con 10%v/v y 50%v/v de concentración de vinaza se obtuvo menor productividad de biomasa con valores de $1,19 \text{ g/L}\cdot\text{d}^{-1}$ (8,85%) y $3,61 \text{ g/L}\cdot\text{d}^{-1}$ (26,84%) respectivamente (Figura 7).

En trabajos como los realizados por (Loera- Quezada & Olguín, 2010, Aslan & Kapdan, 2006, An et al, 2003), se demostró que altos contenidos de nitrógeno en el medio de crecimiento favorece la productividad de biomasa en las microalgas. Esto podría ser la razón por la cual no se presentó el comportamiento esperado en la realización del promedio de la productividad de biomasa, ya que durante el

experimento se pudo controlar las concentraciones de vinazas pero no el contenido de nitrógeno o de otros nutrientes que estas poseían; lo que lleva a inferir que el tratamiento de 100%v/v además de contener gran cantidad de carbono, tiene también alto contenido de nitrógeno elevando así el crecimiento de biomasa, a diferencia de los otros dos tratamiento.

Figura 7. Producción promedio de biomasa durante diez días



Fuente: Los autores

La productividad de biomasa alcanzada utilizando las vinazas oscuras como medio de cultivo sobrepasó los valores obtenidos en otros trabajos como los reportados por Ardila & Rodríguez, 2011 (0,58 g/L*d⁻¹), Godoy & Monrroy, 2011 (0,44 g/L*d⁻¹) y Cepeda, 2011 (0,319 g/L*d⁻¹) en los cuales se utilizaron medios enriquecidos en distintos sustratos como ácido acético, CO₂, y vinazas secundarias o claras respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el alga puede sobrevivir y reproducirse en la vinaza oscura sin dilución (100% v/v).

La tabla 3 muestra la relación de biomasa inicial y final después de transcurrido el periodo experimental en los tres medios con diferentes concentraciones de vinaza.

Tabla 3. Relación de producción de biomasa

Experimento Vinaza / Agua destilada (v/v)	Biomasa inicial (g/L)	Vinaza (mL)	Agua destilada (mL)	Biomasa Final (g/L*d ⁻¹)
10%	0.4	150	1350	1,19
50%	0.4	750	750	3,61
100%	0.4	1500	0	13.45

Fuente: Los autores

4. APLICACIONES

Actualmente, la industria del tratamiento de aguas residuales posee varios métodos para remover tanto fósforo como nitrógeno (Duenas et al., 2003), pero aquellos nutrientes que no pueden ser solubilizados en las aguas residuales terminan en rellenos sanitarios después de quemar la carga orgánica que los acompaña o usado como fertilizante, siempre y cuando el tratamiento elimine patógenos y compuestos nocivos para la humanidad (Martínez et al 2000).

El cultivo de microalgas en agua residuales ofrece el tratamiento de las mismas y la producción de biomasa microalgal, la cual puede luego ser explotada para la obtención de proteínas y aditivos alimenticios (para acuicultura, consumo animal y humano) (Jimenez-Perez et al., 2004), energía como la obtención de biogás y combustibles (Ambati et al., 2006; Baba et al., 2011; Choi et al., 2010; Dayananda et al., 2005, 2006; Eroglu et al., 2010; Gardner et al., 2010; Kita et al., 2010; Rivas et al 2010; Tanoi et al., 2010; Zhang et al., 2011; Zhila et al., 2011), en la agricultura (fertilizantes y acondicionadores de suelos), productos farmacéuticos, cosméticos y otros productos de alto valor agregado.

La tecnología HARP fue desarrollada en California, esencialmente consiste en un tanque de 0.3 a 0.4 m de profundidad, con mezclado mecánico, en el cual las algas y bacterias crecían. Las aguas residuales normalmente secundarias o primarias son alimentadas al reactor, la agitación en este sistema permite que las algas crezcan y previenen la sedimentación (Oswald, 1963, 1988). La remoción de material orgánica en los sistemas HARP se logra a través de una relación mutualista entre las bacterias y algas (Ganapati & Amin, 1972). La demanda de oxígeno requerida por las bacterias aeróbicas es provista a partir de la fotosíntesis, mientras que el carbón, nitrógeno y fósforo necesarios para el crecimiento microalgal son provistos por la descomposición bacteriana de los

elementos presentes en las aguas residuales (Hosetti & Frost 1998; Ahmadi et al. 2005).

A diferencia de los sistemas mencionados anteriormente, el aprovechamiento de un efluente como lo es la vinaza, se concentra esencialmente en lograr que el organismo pueda crecer bajo las condiciones adversas implícitas en el agua residual, es por esto, que los experimentos de Travieso et al. (1999, 2008a, b) se concentran en utilizar vinaza pre-tratada en un sistema de digestión anaeróbica.

Se propuso utilizar la vinaza sin ningún tipo de pre-tratamiento es decir tal cual sale del proceso de obtención del etanol, a diferencia de Travieso et al. (1999, 2008a, b); demostrando con los resultados obtenidos en este trabajo, que este efluente (vinazas) puede ser aprovechado para el cultivo de microorganismos como las microalgas en reactores tubulares sin ser combinada con otros microorganismos.

Para el aprovechamiento de las vinazas como medio de cultivo se prefiere utilizar reactores tipo batch, ya que el trabajo con vinazas supone problemas como: ensuciamiento del equipo o reactor por lo que se requieren paradas o limpiezas frecuentes; además, los resultados obtenidos sugieren un tiempo muy largo de residencia de las vinazas en el reactor, ya que la cantidad de nutrientes presentes son muy altas (Tabla 4), aunque en primera instancia el aumento de biomasa inicial en el reactor puede consumir más nutrientes, existen componentes metabólicos implícitos de la microalga, que le permiten consumir más rápido ciertos nutrientes, esta relación ya ha sido explotada en diferentes experimentos del grupo de investigación, obteniendo buenos resultados en cuanto a la cantidad de biomasa, pero, aún se desconoce la composición de esta biomasa, el cual es el factor de decisión más importante a la hora de dar un valor agregado a la biomasa producida.

Para realizar el cultivo de microalgas en vinazas es importante tener en cuenta condiciones de operación importantes siendo la principal la aireación constante

debido a que el color oscuro de las vinazas impide el paso de luz a los fotobiorreactores afectando el comportamiento autotrófico y por lo tanto el proceso fotosintético de las microalgas, lo que conduce a que la microalga se comporte heterotróficamente teniendo que realizar el proceso de oxidación a los compuestos de carbono para romper las moléculas y así poder consumir los nutrientes de forma más fácil; el pH es otra condición de operación importante pero en este experimento no es necesario tener un control sobre el debido a que las microalgas son capaces de neutralizarlo.

CONCLUSIONES

Se demostró que *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 puede utilizar las vinazas primarias u oscuras (proceso de evaporado) como medio de cultivo, ya que éstas contienen los nutrientes necesarios para que la microalga tenga una alta productividad de biomasa.

La mayor productividad de biomasa se encontró en el tratamiento de 100% v/v, esto demuestra que *C. vulgaris* puede crecer en este residuo sin necesidad de controlar el pH en el medio pero sí, siendo estrictos en mantener el flujo de aire constante.

La mayor productividad de biomasa obtenida ($13,45 \text{ g/L}\cdot\text{d}^{-1}$) superó las expectativas de producción cuando éste valor fue comparado con otros resultados obtenidos en trabajos previos en los cuales se utilizaron medios de cultivo diferentes.

La utilización de microorganismos fotosintéticos como *C.vulgaris* puede ser una alternativa para darle valor agregado a las vinazas oscuras, sin embargo no posee por sí sola la capacidad de eliminar la totalidad de carga orgánica que estas poseen, debido a que al final del periodo experimental las vinazas aún mantenían su color oscuro característico.

RECOMENDACIONES

Diseñar un método de cultivo que permita mejorar la productividad de *Chlorella vulgaris* y la recolección de la biomasa obtenida al utilizar como medio de cultivo este residuo industrial (vinazas oscuras).

Analizar la composición bioquímica de la biomasa obtenida bajo esta metodología.

BIBLIOGRAFÍA

1. An J.-Y., Sim S.-J., Lee J. S. and Kim B. W. (2003) Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* N°15: p185–191
2. Ardila A. M., Rodríguez S. M., (2011) Influencia de una fuente carbono orgánico (ácido acético) en el crecimiento celular en *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores a escala laboratorio. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. CIDES. p 53
3. Ambati, r. Sarada, R. Baskaran, V. Ravishankar, G. (2006). Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated in Vitro Models *J. Agric. Food Chem*, 54: 4593-4599
4. Aslan S., Kapdan I. K. (2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* N° 28: p64–70
5. Ahmadi, A., Riahi, H., & Noori, M. (2005). Studies of the effects of environmental factors on the seasonal change of phytoplankton population in municipal wastewater stabilization ponds. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 87: 543–550.
6. Baba, M. Kikuta, F. Suzuki, I. Watanabe, M. Shiraiwa, Y. (2011). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*.

7. Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. N° 14: p 557-577
8. Borowitzka M.A, Borowitzka L.J. (1988) *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
9. Campbell N., Reece J. (2005). *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Séptima edición
10. Chisti, Y., (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* N°26: p126-131
11. Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R.W., and Das K.C. (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*. N° 101: p 3097-3105
12. Cepeda A. F. (2011) Estudio de la capacidad de secuestro de CO₂ de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en aguas residuales en fotobiorreactores a escala laboratorio. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. CIDES. p 38
13. Choi, G. Kim, B. Ahn, C. Oh, H. (2010). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol*,
14. Dayananda, C. Sarada, R. Bhattacharya, S. Ravishankar, G. (2005). Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry* 40: 3125–3131

15. Dayananda, C. Sarada, R. Srinivas, B. Shamala, T. Ravishankar, G. (2006). Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii*
16. Eroglu, E. Okada, S. Melis, A. (2010). Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *J Appl Phycol*
17. Demain A. (2009) Biosolutions to the energy problema. *J Ind Microbiol Biotechnol.* N°36. Pág:319–332
18. Duenas, J.F., Alonso, J.R., Rey, A.F., Ferrer, A.S., 2003. Characterisation of phosphorous forms in wastewater treatment plants. *J. Hazard Mater.* 97, 1–3.
19. Edberg A. (2010) Growth of *Chlorella Vulgaris* at high carbon dioxide levels in Swedish light conditions. Laboratory testing and development of methods.
20. Goldman JC, Carpenter EJ. (1974) A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnol Oceanogr* N°19: p756–766
21. 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*
22. Gardner, R. Peters, P. Peyton, B. Cooksey, K. (2010). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *J Appl Phycol*
23. Gloria, N.A. DA; Orlando Filho, J. (1983) Aplicacao da vinhaça como fertilizante. *Boletín Técnico PLANALSUCAR* v.5 no.1, p.5-38.

24. 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
25. Godoy C. A., Monrroy J. D. (2011) Influencia en la inyección continua de CO₂ en el crecimiento de *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. CIDES. p 71
26. Ganapati S, Amin P (1972) Studies on algal-bacterial symbiosis in low cost waste treatment systems. In Desikachary TV (ed.) Taxonomy and Biology of Blue-green Algae. University of Madras, Madras: 483–493.
27. Hosetti, B., & Frost, S. (1998). A review of the control of biological waste treatment in stabilization ponds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(2), 193–218.
28. Hammer Ø., Harper D.A.T., and Ryan P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
29. Jimenez-Perez MV, Sanchez-Castillo P, Romera O, Fernandez-Moreno D, Perez-Martinez C (2004) Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 392–398.
30. Kita, k. Okada, S. Sekino, A. Imou, K. Yokoyama, S. Amano, T. (2010). Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest forefficient hydrocarbon recovery. *Applied Energy*, 87: 2420–2423

31. Lezcano P., Mora L. M. Las vinazas de destilería de alcohol contaminación ambiental o tratamiento para evitarlo. Instituto de Ciencia Animal, apdo.24. p 48-52
32. Loera- Quezada M., Olguín E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(1):p 91-11
33. Lustigman B., Lee L.H., Khalil A. (1995) Effects of Nickle and pH on the Growth of *Chlorella vulgaris*. Environmental Contamination and Toxicology N°55: p73-80.
34. Martínez M.E., Sánchez S., Jiménez J.M., Yousfi F.E. and Muñoz L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Biores. Tech. 73: 263–272.
35. Morris Quevedo H. J., Quintana Cabrales M. M., Almarales Arceo A y Hernández Nazario L. (1999) Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba Rev Cubana Aliment Nutr 13(2):123-8
36. Oswald WJ (1963) High rate pond in waste disposal. Develop. Ind. Biotechnol. 4: 112–119.
37. Oswald WJ (1988) The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. In Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds), Micro-algal Biotechnology. Cambridge U.P., Cambridge: 255–282.
38. Quintero R.D., Cadena S.F., Briceño C.O. (2006) Proyectos de investigación sobre uso y manejo de vinazas. Cenicaña

39. Richmond, A., (2004) *Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. N°4
40. Rivas, M. Vargas, P. Riquelme, C. (2010). Interactions of *Botryococcus braunii* Cultures with Bacterial Biofilms. *Microb Ecol*, 60:628–635.
41. Song D., Fu J., Shi D. (2008) Exploitation of oil-bearing Microalgae for Biodiesel. *Chin. Journ. Biotech.* N°24: 341-348.
42. Sorokin C. (1959) Tabular comparative data for the low- and high-temperature strains of *Chlorella*. *Nature* N°184: p613–614.
43. Sayed O.H., El-Shahed A. M. (2000) Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) in response to growth temperature. *Cryptogamie Algologie* N°21: p 283-290.
44. Statistica versión 7. (2004) Statsoft company information [en línea]. Working with projects: Dynamically, Interactively Select and Query Data Directly from Graphs Disponible en Web: <http://www.statsoft.com/>
45. Travieso L., Benítez F., Sánchez E., Borja R., León M., Raposo F. and Rincón B. (2008a) 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
46. Travieso L., Benitez F., Dupeyrón R. (1999) Algae Growth Potential Measurement in Distillery Wastes. *Environmental Contamination and toxicology*. N°62: p 483-489
47. Travieso L., Benítez F., Sánchez E., Borja R., León M., Raposo F. and Rincón B. (2008b) Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for

Secondary. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. N°22: p 467-473

48. Tanoi, T. Kawachi, M. Watanabe, M. (2010). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, *J Appl Phycol*
49. Weiss, T. Johnston, W. Fujisawa, K. Okada, S. Devarenne, T. (2010). Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol*
50. Yang C., Ding., Zhang K. (2008) Growth of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from cassava ethanol fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* N°24:2919–2925
51. Zhang, F. Cheng, L. Gao, W. Xu, X. Zhang, L. Chen, H. (2011). Mechanism of lipid extraction from *Botryococcus braunii* FACHB 357 in a biphasic bioreactor. *Journal of Biotechnology*
52. Zhila, N. Kalacheva, G. Volova, T. (2011). Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J Appl Phycol*, 23:47–52

ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA VINAZA

Tabla 4. 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
2O5 (kg/m ³)	0,19	0,2	0,24
K2O (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
SO4 (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 2. MEDIO BOLD BASAL

Tabla 5. 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 3. TEST DE NORMALIDAD

Tabla 6. Test de normalidad obtenido con el programa PAST; Productividad de biomasa ($\text{g/L}\cdot\text{d}^{-1}$)

Test de normalidad sin transformación de los datos.			
	10%	50%	100%
N	30	30	30
Shapiro-Wilk W	0,9429	0,9691	0,7763
p(normal)	0,1089	0,5147	2,50E-05
Jarque-Bera JB	5,284	0,7446	20,3
p(normal)	0,07121	0,6891	3,91E-05
p(Monte Carlo)	0,0382	0,5975	0,0041
Chi ²	2,5333	1,7333	6
p(normal)	0,11146	0,18799	0,014306
Chi ² OK (N>20)	YES	YES	YES

Fuente: Los autores