

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD
DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIORREACTORES
A ESCALA DE LABORATORIO**

**Paola Andrea Hernández Benítez
Carlos Fernando Rosas Oviedo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2011**

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD
DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES
A ESCALA DE LABORATORIO**

**Paola Andrea Hernández Benítez
Carlos Fernando Rosas Oviedo**

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

Dedicado a Dios por ser mi luz y cubrirme con su infinito amor.

A mi madre Luz Adriana por inspirarme, guiarme, darme su amor y ser mi amiga incondicional.

A Victor Manuel y Christian David por confiar siempre en mí, siempre esperar lo mejor, son inspiración para mi vida y me dan fuerza para seguir.

A Sigifredo por ser un padre ejemplar y enseñarme a poder, queriendo.

A mi novio Danny Alejandro por su amor, compañía y tolerancia.

A mis tíos y primos que han sido como padres y hermanos.

A mis amigos por enseñarme todo lo que no se alcanza con la familia y ser cómplices de muchas alegrías y peleas sin sentido (4LCRDJAM).

PADLA ANDREA HERNÁNDEZ BENÍTEZ

A Dios por la vida, la salud y los triunfos.

Con mucho cariño a Amparo por sus consejos, valores y enseñanzas. Por la motivación para lograr todos mi objetivos, pero más que nada por todo su amor.

A mi padre por su apoyo incondicional, su confianza y afecto.

A mi NMML porque siempre he contado con ella, por ser una luz en vida, por su inmensa ternura y amor.

A mi hermana Karol, por creer en mí, por la confianza que nos hemos tenido y su sincera amistad.

A Alvaro por estar conmigo en todo este tiempo, por ser un amigo, por su paciencia y preocupación.

Y a todos mis familiares y amigos que me impulsaron para llegar a este lugar.

FERNANDO ROSAS.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	16
1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	16
1.1.1 <i>C. vulgaris</i> como un organismo fotoautótrofo.....	16
1.1.2 <i>C. vulgaris</i> como un organismo heterótrofo.....	18
1.1.3 <i>C. vulgaris</i> como un organismo mixótrofo.	19
1.2 CULTIVO MIXOTRÓFICO DE <i>C. VULGARIS</i>	21
1.3 RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO (C/N)	22
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
2.1 CEPA MICROALGAL.....	24
2.2 FOTOBIOREACTORES.....	24
2.3 MÉTODOS DE CULTIVO	24
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	25
2.4.1 Concentración de biomasa.....	25
2.4.2 Concentración de clorofila total	25
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
4. CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Test de homogeneidad de varianza para el día 5 (mañana y tarde) efecto acetato/nitrato sobre la productividad de biomasa.	33
Tabla 2. Test de significancia para productividad de biomasa en el día 5.	33
Tabla 3. Test de homogeneidad de varianza para el día 5 (mañana y tarde) efecto acetato/nitrato sobre la concentración de clorofila.	35
Tabla 4. Test de significancia para la concentración de clorofila en el día 5.	36
Tabla 5. Resumen del análisis de varianza tratamiento 20/0,97mM.	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Células de <i>C. vulgaris</i> en cultivo autotrófico (1000x).	16
Figura 2. Representación del modelo de crecimiento mixotrófico.	19
Figura 3. Etapas del desarrollo experimental, métodos de cultivo empleados.	23
Figura 4. Productividad de biomasa para condiciones iniciales de acetato/nitrato.	27
Figura 5. Mejores productividades en cada nivel nitrato en comparación con el cultivo control.	28
Figura 6. Concentración de biomasa durante los días de cultivo, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrato y comparadas con el cultivo control.	29
Figura 7. Concentración promedio de clorofila total ($a+b$) en mg/L en los 5 días de cultivo, para las condiciones iniciales de acetato/nitrato.	30
Figura 8. Resumen de concentraciones finales de clorofila en cada nivel nitrato en comparación con el cultivo control.	31
Figura 9. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 5 en la mañana).	34
Figura 10. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 5 en la tarde).	35
Figura 11. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 5 en la mañana).	36
Figura 12. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 5 en la tarde).	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Reactivos y equipos	47
ANEXO B. Medio de cultivo <i>bold basal</i>	50
ANEXO C. Montaje del cultivo de <i>c. Vulgaris</i>	51
ANEXO D. Mediciones realizadas	53
ANEXO E. Calculo del coeficiente másico de extinción	55
ANEXO F. Datos experimentales	56
ANEXO G. Análisis estadístico	58

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITROGENO EN LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO.*

AUTORES: Paola Andrea Hernández Benítez, Carlos Fernando Rosas Oviedo.**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Cultivo Mixotrófico, *Chlorella vulgaris*, relación carbono/nitrógeno.

Se estudió el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *C. vulgaris* a escala de laboratorio, mediante la variación programada de las concentraciones de acetato y nitrato en cultivos mixotróficos utilizando como cultivo de crecimiento el medio *Bold Basal*.

En la primera etapa se realizaron cultivos autotróficos, los cuales fueron tomados como referencia o control. En la segunda etapa se efectuaron cultivos mixotróficos con acetato de sodio (5, 10, y 20mM), posteriormente, con el fin de encontrar la relación carbono/nitrógeno adecuada para mejorar la productividad, se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio estipulada en el medio ya mencionado, (para obtener concentraciones de 0; 0,97; 1,94 y 2,78mM de NaNO₃) manteniendo las concentraciones de acetato utilizadas en la etapa anterior.

La disminución del nitrógeno en el medio, tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa, además se encontraron resultados sobresalientes para la concentración de acetato 20mM para todos los niveles de nitrógeno excepto en 0mM.

Entre los resultados se destaca la productividad obtenida en el tratamiento 20mM acetato/0,97mM nitrato, el cual fue superior en productividad de biomasa (aproximadamente 0,69 g L⁻¹ día⁻¹) y concentración de clorofila de todos los tratamientos; además se observaron diferencias significativas desde la tarde del día 1 hasta la finalización del experimento.

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 FísicoQuímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D.

Viatcheslav Kafarov y M.Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas S.

ABSTRACT

TÍTULO: EFFECT OF CARBON/NITROGEN RATIO ON BIOMASS PRODUCTIVITY OF *Chlorella vulgaris* IN LABORATORY-SCALE PHOTOBIOREACTORS.*

AUTHORS: Paola Andrea Hernández Benítez, Carlos Fernando Rosas Oviedo.**

KEYS WORDS: Microalgae, Mixotrophic culture, *Chlorella vulgaris*, Carbon/Nitrogen ratio.

The effect of the carbon / nitrogen ratio in biomass productivity of *Chlorella vulgaris* was studied in laboratory-scale, by modifying the acetate and nitrate concentrations in mixotrophic cultures. In order to find the appropriate carbon/nitrogen ratio which improves productivity, the concentrations of sodium nitrate in the medium were changed (0, 0.97, 1.94 and 2.78 mM of NaNO₃) keeping steady the acetate concentrations used in the previous stage. Nitrogen reduction had a positive effect on biomass production. There were also outstanding results using 20 mM acetate for all the treatments except 0mM. Results highlight the productivity observed at the 20 mM acetate / 0.97 mM nitrate, which was higher in biomass and chlorophyll productivity. All treatments also had significant differences from the afternoon of day 1 until the end of the experiment. The best run (20 mM acetate / 0.97 mM nitrate) reached the maximum productivity (approximately 0.69 g L⁻¹ day⁻¹) due to the metabolism of C/N in *C. vulgaris*.

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.

* Research project

** Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ph.D. Viatcheslav Kafarov and M.Sc. Crisóstomo Barajas. Ph.D student research assistant: Andrés Fernando Barajas S.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son de gran interés en biotecnología por ser fuente de recursos de alto valor en diferentes áreas como: nutrición, acuicultura, farmacéuticos y biocombustibles [1]. Sin embargo la baja productividad total del cultivo impide su producción a gran escala, esto se debe a que en la mayoría de configuraciones de los fotobiorreactores no hay una uniforme incidencia de luz, limitando así la fijación de dióxido de carbono y por consiguiente la velocidad de crecimiento de las microalgas [2]. Por esto se ha implementado el uso de cultivos mixotróficos de microalgas que además de hacer fotosíntesis pueden crecer mediante el uso de sustratos orgánicos como fuente de energía y de carbono para el crecimiento celular [3]. Estos sustratos pueden proporcionar la energía necesaria en situaciones de limitación de luz [4].

La mixotrofia es entonces, el crecimiento en el que se asimila carbono orgánico en presencia de luz, al mismo tiempo que se fija CO_2 , por lo tanto los metabolismos celulares (fotosintético y fosforilación oxidativa) tienen que funcionar simultáneamente [5-6]. La mayoría de estudios sobre el crecimiento mixotrófico se han enfocado en las algas verdes como *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1980 [3, 7-11], confirmando que ésta, tiene la capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas, sin embargo ha mostrado una mayor productividad de biomasa en el cultivo mixotrófico [12].

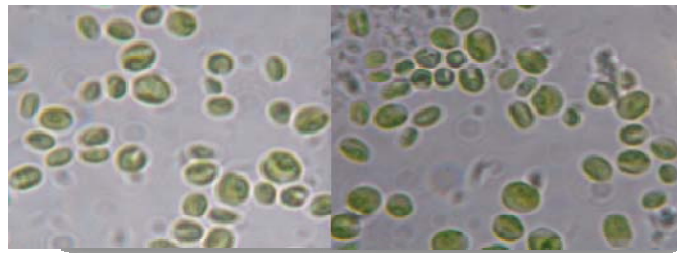
En este estudio se presenta la influencia de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *C. vulgaris* en cultivos mixotróficos a escala de laboratorio. Se empleó el acetato como recurso energético y de carbono orgánico debido a que este es un sustrato empleado para la síntesis celular de acetil-CoA, el cual interviene en múltiples rutas metabólicas, incluyendo la síntesis de ácidos grasos [13-15].

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 *Chlorella vulgaris*

Este microorganismo pertenece al reino eucariota en la división *Chlorophyta* o algas verdes [16], contiene clorofilas tipo *a* y *b* en los cloroplastos [17]. Tiene forma esférica (Figura 1), cerca de 3-5 μm de diámetro, sin flagelo [18]. Se reproduce de forma asexual, cuando la célula alcanza su tamaño máximo, el núcleo se divide formando en el interior de la célula madre 4 u 8 células más pequeñas, liberadas por la ruptura de la pared celular de la madre [19-20]. Sus ciclos de vida y necesidades nutricionales son simples [21]; al ser unicelulares, la energía se dirige a través de la fotosíntesis al crecimiento y la reproducción, ya que no es necesario formar y mantener tejidos y órganos muy complejos [22].

Figura 1. Células de *C. vulgaris* en cultivo autotrófico (1000x).



Fuente: los autores

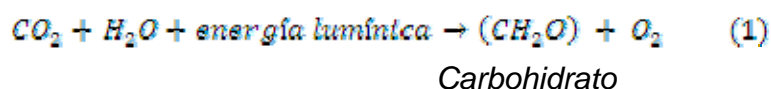
1.1.1 *C. vulgaris* como un organismo fotoautótrofo. *C. vulgaris* puede desempeñarse como un organismo fotosintético para producir oxígeno en forma

similar a las plantas, utilizando la luz como fuente de energía para sintetizar moléculas orgánicas, a partir de dióxido de carbono y agua. [23].

El proceso de la fotosíntesis empieza con la denominada *fase de luz*, cuando los fotones son captados por la clorofila, sustancia verde que se encuentra comúnmente como clorofila *a* o clorofila *b* en los cloroplastos [24]. Esta energía fotónica excita las moléculas de clorofila, induciendo una cascada de reacciones en las que se obtiene oxígeno molecular del agua, con la formación de dos compuestos bioquímicos importantes, utilizados para transportar la energía durante el metabolismo: NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) y el ATP (trifosfato de adenosina) [25].

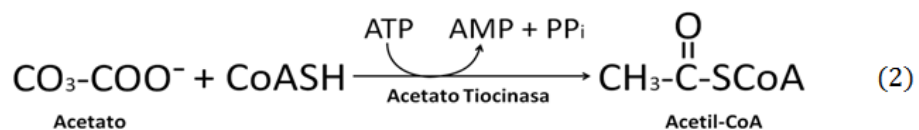
Las moléculas de energía producidas durante la fase de la luz se utilizan en una segunda cascada de reacciones que se conoce como la *fase oscura*, esta parte del proceso implica la producción de moléculas de hidratos de carbono a partir del dióxido de carbono gaseoso, se lleva a cabo fuera de la membrana fotosintética y no depende directamente de la luz, de hecho, puede ocurrir simultáneamente con la *fase de luz* [24].

Los cultivos fototróficos, por lo general, presentan dificultades para alcanzar tasas altas de crecimiento y productividad [26]. Esto se debe a que en la mayoría de fotobiorreactores no se logra una homogénea incidencia de luz y como consecuencia disminuyen las tasas de fijación de dióxido de carbono y de crecimiento [27-29]. Este efecto de la luz se explica con la Ecuación 1, donde se muestra la reacción de la fotosíntesis [14].



La dificultad para distribuir uniformemente la luz está relacionada con los efectos de sombra generados dentro del sistema, ya sea por las mismas células o por las burbujas, la intensidad lumínica decrece exponencialmente desde las paredes del reactor hacia el centro, lo cual crea una larga zona oscura en el centro del reactor y una pequeña zona iluminada cerca de la superficie del fotobiorreactor [30-31].

1.1.2 *C. vulgaris* como un organismo heterótrofo. Se ha demostrado que *C. vulgaris* puede oxidar y utilizar el acetato como fuente de carbono y energía para el crecimiento en la oscuridad [32-35], provocando cambios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a que el Acetil-CoA no es obtenido a partir del piruvato, sino del ión acetato, según la reacción [36]:

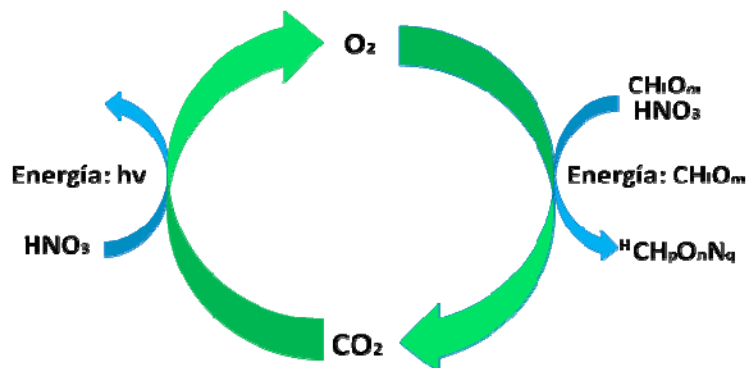


El mecanismo bioquímico que le permite a *C. vulgaris* crecer mediante la conversión de acetato, se conoce como ciclo de glioxilato [35, 37-38]. A diferencia del cultivo fotoautótrofo, al emplear un sustrato orgánico como fuente de carbono y energía, se reducen las limitaciones técnicas y fisiológicas asociadas con el suministro y distribución de la luz y el dióxido de carbono que afectan la fotosíntesis del cultivo [39], también ofrece la posibilidad de aumentar la concentración de células y la productividad tal como se ha reportado en estudios anteriores de cultivos heterotróficos [40]. Además las microalgas cultivadas heterotróficamente por lo general acumulan más lípidos que las cultivadas fotoautotróficamente [41-44].

1.1.3 *C. vulgaris* como un organismo mixótrofo. La capacidad para asimilar compuestos orgánicos como fuente de carbono en presencia de luz, hace de *C. vulgaris* un organismo mixótrofo [39], en el cual la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa de las sustancias orgánicas de carbono, parecen funcionar de manera independiente, esto hace que la tasa de crecimiento en condiciones mixotróficas, sea aproximadamente igual a la suma de las contribuciones individuales de los cultivos fotoautótrofos y heterótrofos [5-7,45]. Por tratarse de un organismo unicelular, el crecimiento de *C. vulgaris* se refiere al aumento de biomasa total en el cultivo [46].

En el crecimiento mixotrófico, como se muestra en la figura 2, la baja concentración de oxígeno puede influir en el metabolismo heterótrofo [47]. Sin embargo, el metabolismo autótrofo produce oxígeno en el proceso de la fotosíntesis y el metabolismo heterótrofo produce el CO_2 que se utilizará en el crecimiento autótrofo [48], de este modo se complementan las dos rutas tróficas. El lado izquierdo de la figura 2 representa el metabolismo fotosintético y el derecho el metabolismo heterótrofo, el O_2 se produce por la fotosíntesis y el CO_2 por descomposición oxidativa de compuestos orgánicos.

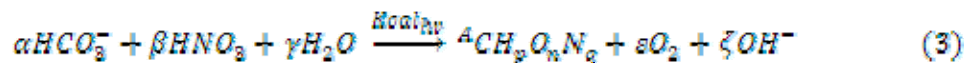
Figura 2. Representación del modelo de crecimiento mixotrófico.



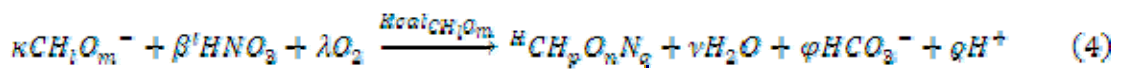
Fuente: Chojnacka, K y Marquez, F. (2004).

En el crecimiento fotoautotrófico, las algas utilizan el CO₂ como su única fuente de carbono, dependen de la luz como única fuente de energía disponible para su crecimiento y mantenimiento; en el crecimiento heterotrófico los compuestos orgánicos (como la glucosa, acetato, etc.) son las únicas fuentes de energía, las células producen CO₂ y consumen O₂. Las ecuaciones estequiométricas 3, 4 y 5 representan el metabolismo de las microalgas en condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas respectivamente [14,36,49].

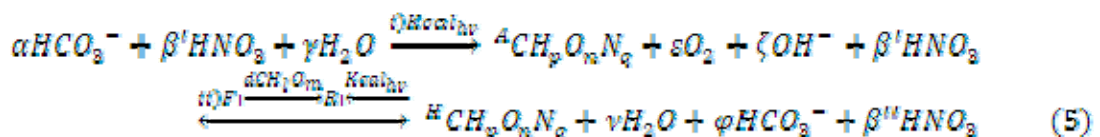
Autotrófico:



Heterotrófico:



Mixotrófico



Donde: ii) F significa adelante y R la reacción inversa.

Esta última ecuación, surge cuando se asume que el crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico de las células es el mismo (CH_pO_nN_q) y no hay formación de producto, ni consumo externo de O₂, entonces el O₂ utilizado para la heterotrofia se origina en la fotoautotrofia [49].

En el balance inicial, ϵO_2 es la cantidad de oxígeno producido por la fotosíntesis, $\beta' HNO_3$ es la cantidad de fuente de nitrato disponible para el crecimiento [49]. El término αHCO_3^- es la cantidad de dióxido de carbono producido por el metabolismo oxidativo de el consumo de la fuente de carbono orgánico, esto es sugerido como una cantidad disponible para la fotosíntesis y $\beta'' HNO_3$ es la cantidad de fuente de nitrato que está disponible para el crecimiento. El CO_2 producido heterotróficamente y el O_2 producido fotoautotróficamente son usados en dos pasos, hacia adelante en los que la biomasa es producida heterotróficamente y en la fase inversa en los que la biomasa se produce fotoautotróficamente a expensas del CO_2 procedente del metabolismo oxidativo de la glucosa [49].

1.2 CULTIVO MIXOTRÓFICO DE *C. vulgaris*

Mediante cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* se integran algunas ventajas de las configuraciones fototróficas y heterotróficas [50], al tiempo que se superan las dificultades asociadas a estas dos formas de cultivo [51]; las ventajas están relacionadas con incremento en la tasa crecimiento y productividad [4,33,52] debido a una alta incorporación de carbono orgánico dentro de la célula, en particular en la formación de lípidos, polisacáridos y proteínas [53-54]; esto es especialmente importante, pues se han reportado aumentos de estas sustancias (al final de los experimentos de Syrett et al 1963) de hasta cinco veces el valor en las células autótrofas [33]. Otra ventaja del cultivo mixotrófico es la iluminación, que induce y regula la producción de macromoléculas de alto valor como pigmentos [55-56] y ácidos grasos [57-60], además disminuye la producción de dióxido de carbono en comparación con las células que metabolizan sustratos orgánicos en la oscuridad (cultivo heterotrófico) [33,35].

1.3 RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO (C/N)

Generalmente se considera que la relación C/N influye en el contenido de lípidos en las células [61]. Se ha reportado que las fuentes de nitrógeno son un factor de estrés para el crecimiento de algas donde el suministro limitado podría cambiar significativamente la composición del organismo [62-63]. Además se ha indicado que las especies *Chlorella* cuando se cultivan en un medio pobre en nitrógeno, pero con suficiente luz y / o de fuentes orgánicas de carbono acumulan lípidos o almidón dentro de sus células [64].

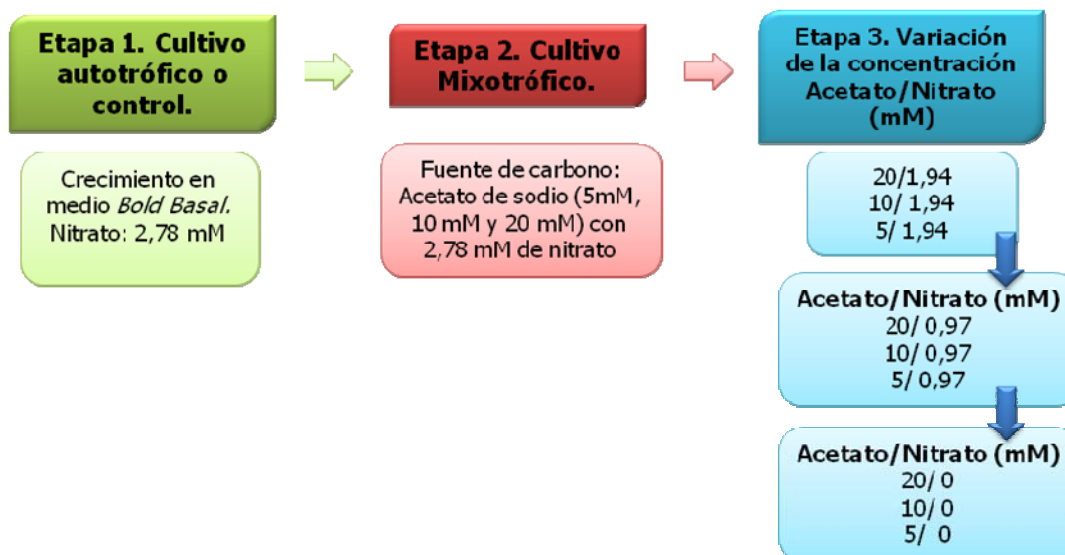
El estrés generado por déficit de nitrógeno, en comparación con el recurso de carbono, puede afectar la respuesta de las células a la disponibilidad de nutrientes y por tanto afectar las tasas de crecimiento y la fijación de CO₂ [65]. Esto se relaciona con la historia previa de nutrición de la célula, se ha reportado en estudios anteriores, que algunas células que sufrieron estrés por una ligera disminución en la disponibilidad de nitrógeno (afecta el transporte y las funciones de asimilación de nitrato, aunque no necesariamente la limita la tasa de crecimiento), no pueden utilizar el nitrato en la noche; en contraste, las células que tuvieron altas limitaciones de nitrato pueden hacerlo [66], esto probablemente refleja cambios en el metabolismo y el almacenamiento de C/N a mayor estrés.

Aun conociendo su existencia, no es posible generalizar la relación C/N para las microalgas, dado que existe un potencial para perturbar los organismos simplemente alterando el nivel de iluminación durante el muestreo, la manipulación de la muestra e incubaciones experimentales [67]. También hay, sin duda, diferencias entre las especies y grupos de microalgas, tanto en la rapidez y magnitud de las respuestas como en el umbral que hace significativas estas respuestas [65].

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo se realizaron por triplicado y se dividieron en tres etapas como se muestra en la figura 3, primero se realizaron cultivos autotróficos con los nutrientes requeridos por el medio *Bold Basal* como se muestra en el anexo B, los cuales fueron tomados como referencia o control. A continuación se efectuaron cultivos mixotróficos con acetato de sodio a tres concentraciones diferentes 5, 10, y 20mM, los demás nutrientes fueron suministrados tal como se indica en el *Bold Basal*. Posteriormente, se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio (0; 0,97; 1,94mM) estipulada en el medio ya mencionado, para cambiar la disponibilidad de nitrógeno al tiempo que se agregó acetato de sodio a las mismas concentraciones del cultivo anterior, con el fin de encontrar la relación carbono/nitrógeno adecuada para mejorar la productividad de biomasa de *C. vulgaris*.

Figura 3. Etapas del desarrollo experimental, métodos de cultivo empleados.



Fuente: los autores

2.1 CEPA MICROALGAL

C. vulgaris UTEX 1803 se obtuvo de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Texas en Austin. Se mantuvo en medio *Bold Basal* (ANEXO B) a 23 °C y pH 8.

2.2 FOTOBIORREACTORES

Se usaron botellas plásticas transparentes de 2½ litros con diámetro interno de 32 cm. El volumen del cultivo fue de 2 litros. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo (tubo-difusor) para mejorar la distribución de nutrientes y evitar la sedimentación de las células (ANEXO C). Todos los cultivos se realizaron con luz natural y 23°C de temperatura.

2.3 MÉTODOS DE CULTIVO

Inicialmente *C. vulgaris* se cultivo de forma autotrófica en medio *Bold Basal*, sin suministro adicional de CO₂. Posteriormente, en los cultivos mixotróficos se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio establecida para el medio *Bold Basal*, entre (0; 0,97; 1,94; 2,78mM). Además se suministró acetato de sodio, para obtener concentraciones de 5, 10 y 20 mM en el cultivo (ANEXO C). El inóculo suministrado al iniciar cada cultivo fue el necesario para obtener una absorbancia de aproximadamente 0,800 a 500nm.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Todos los montajes se hicieron por triplicado, de igual forma en todas las mediciones se tomaron muestras de cada una de las copias.

2.4.1 Concentración de biomasa. La concentración de biomasa se calculó indirectamente, con el coeficiente másico de extinción, el cual relaciona la densidad óptica o absorbancia (ANEXO D) con la concentración de células, calculada mediante peso seco (ANEXO D) de las mismas. La absorbancia se midió para una muestra original y tres diluciones de la misma en un espectrofotómetro (ANEXO A) a 500nm cada 12 horas. Los valores de absorbancia se graficaron en función de sus respectivos pesos secos, para obtener una línea recta, cuya pendiente es el coeficiente másico de extinción K . (ANEXO E). La relación está dada por la ley de Beer-Lambert: $Abs = K * X * L$

Donde, Abs es la absorbancia, K es el Coeficiente másico de extinción X la concentración y L el espesor de la cubeta.

2.4.2 Concentración de clorofila total. La concentración de clorofila se calculó a partir de un extracto de clorofila disuelta en etanol absoluto anhidro, que fue preparado en etapa previa a la medición (ANEXO D). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda diferentes 650 y 665nm para cada extracto. Posteriormente se calculó la clorofila total mediante la ecuación 6 [68]:

$$Clorofila (a + b) = (4 * A_{665}) + (25,5 * A_{650}) \quad (6)$$

Los datos de clorofila total son de gran importancia en el seguimiento del cultivo, dado que evidencian la actividad de los sistemas fotosintéticos.

2.4.3 Otros métodos. Además de la concentración de biomasa y clorofila, se hicieron mediciones de peso seco de células y pH cada 24 horas. (ANEXO D).

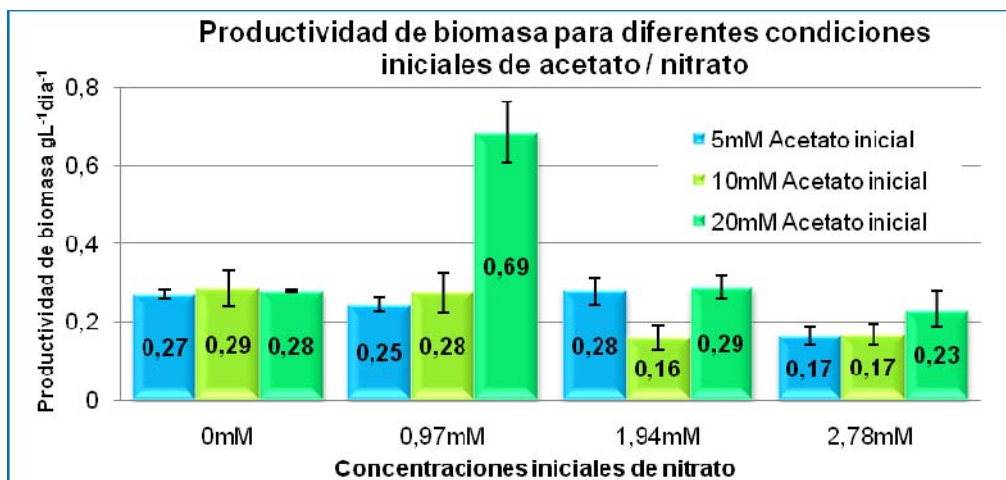
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la influencia del carbono y el nitrógeno, involucrados en la productividad de biomasa de *C. vulgaris* en cultivos mixotróficos, mediante dos análisis de varianza factorial (ANOVA) utilizando el *software* STATISTICA 7, para 3 niveles de Acetato (5; 10 y 20mM) y 4 niveles de nitrógeno (0; 0,97; 1,94 y 2,78mM), teniendo como variable de respuesta para el primer análisis la productividad de biomasa, y para el segundo la concentración de clorofila total en el cultivo. En ANOVA se evaluaron todos los tratamientos, agrupando los datos por días y ciclos luz/oscuridad. Los datos del ciclo de luz fueron tomados en las tardes y los del ciclo de oscuridad en las mañanas durante los 5 días de cultivo.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la figura 4 se comparan las productividades después de cinco días de cultivo, a partir de las concentraciones iniciales de acetato/nitrato en los experimentos. Las concentraciones bajas de nitrógeno favorecieron la productividad de biomasa comparadas con el medio que contenía la mayor concentración de este. En cada nivel de nitrato, se aprecia que la concentración de acetato de 20mM presentó productividades superiores, excepto en los cultivos que carecían de nitrato (0mM), donde fue superada por los cultivos con 10mM de acetato. La máxima productividad se alcanzó para el cultivo con 20mM de acetato y 0,97mM de nitrato.

Figura 4. Productividad de biomasa para condiciones iniciales de acetato/nitrato.

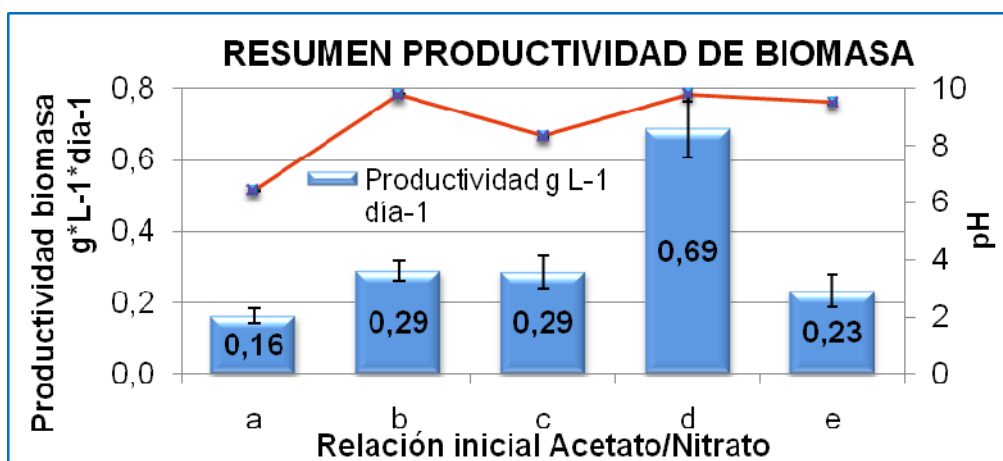


Fuente: los autores

En la figura 5, se eligió la productividad más alta en cada nivel de nitrógeno y se comparó con la productividad alcanzada mediante el cultivo autotrófico o control. Este último tenía una concentración de 2,78mM de nitrato de sodio como se indica en el medio *Bold Basal* y 0mM de carbono orgánico (acetato) obteniéndose la menor productividad de biomasa, tal como se encontró en la literatura [26,69].

La presencia de acetato en los cultivos mixotróficos genera altos valores de pH, sin embargo las productividades en los diferentes experimentos no se vieron afectadas por este, como se muestra en la figura 5, para valores similares de pH se obtuvieron productividades variables.

Figura 5. Mejores productividades en cada nivel nitrato en comparación con el cultivo control.



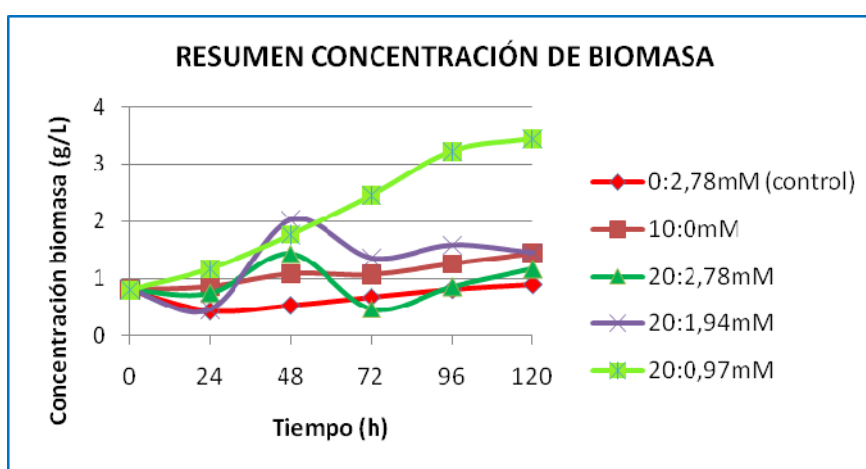
Fuente: los autores

Las relaciones Carbono/nitrógeno presentadas: Relaciones Acetato/Nitrato presentadas: a→0 /2,78 mM control; b→ 10/0 mM; c→ 20/1,94 mM; d→ 20/0,97 mM; e→20/0 mM.

Los cultivos reportados en la figura 5 se presentan nuevamente en la figura 6, mostrando el aumento de biomasa con el transcurrir de los días, se hace evidente que la relación 20/0,97 mM, fue superior en producción de biomasa durante todos los días del experimento. Las relaciones acetato/nitrato restantes mostraron un comportamiento similar al cultivo control. Sin embargo en todos los experimentos mixotróficos se nota un incremento marcado en la concentración de biomasa en el segundo día (48h) y son superiores al control al concluir el periodo de

experimentación (120h) estos resultados son congruentes con los presentados en estudios anteriores [3,12,39,64].

Figura 6. Concentración de biomasa durante los días de cultivo, para las mejores productividades obtenidas en cada nivel de nitrato y comparadas con el cultivo control.



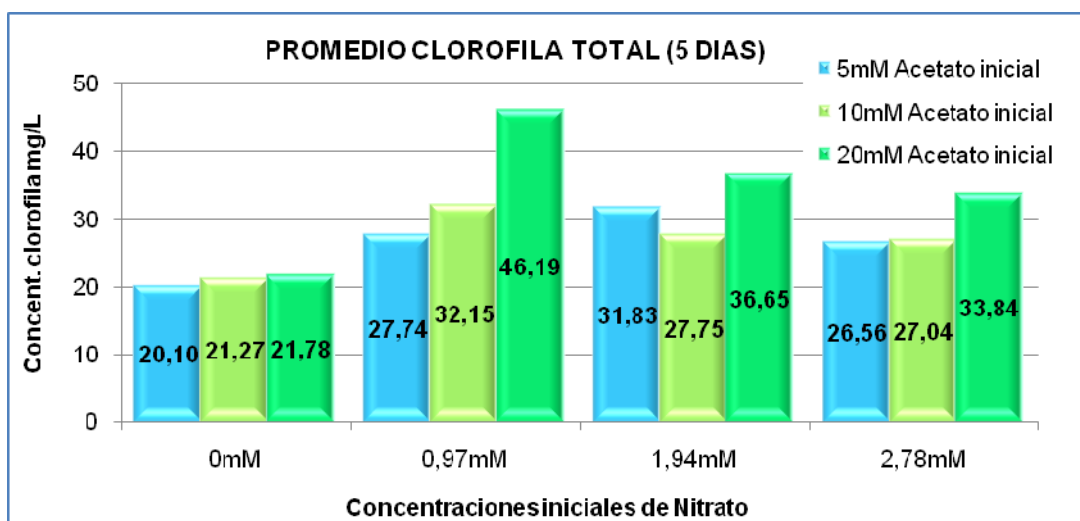
Fuente: los autores

La medición de la concentración de clorofila permite confirmar la actividad de los aparatos fotosintéticos, y se espera que en cultivos mixotróficos su concentración decaiga con el tiempo [70] principalmente por la incorporación de carbono orgánico [26,71], que permite a las células regular la síntesis de clorofila para ahorrar energía [72-73]; lo anterior no es aplicable en el presente estudio (Figura 7), donde la concentración de clorofila fue superior en los cultivos con acetato, además en todos los tratamientos la concentración de clorofila fue cercana o mayor a la producida en el control (Figura 8).

Los resultados de este experimento mostraron una actividad fotosintética más alta en 20/0,97mM, esto se debe a que la fosforilación oxidativa del acetato produce CO₂ disponible para su uso en la fotosíntesis [49]. De igual forma, la productividad

de biomasa fue mayor en los cultivos mixotróficos comparado con el cultivo autotrófico, lo que ratifica que las células obtuvieron sus recursos de energía y carbono no solo por fotosíntesis del CO₂ presente en el aire, sino también de los aportados por la fosforilación oxidativa del acetato tal como se indica en la literatura [7,64], demostrando que los dos rutas metabólicas están activas. Estos resultados coinciden con los publicados por Syrett et al. [33] Cuyos experimentos emplearon aire libre de CO₂ para los cultivos mixotróficos.

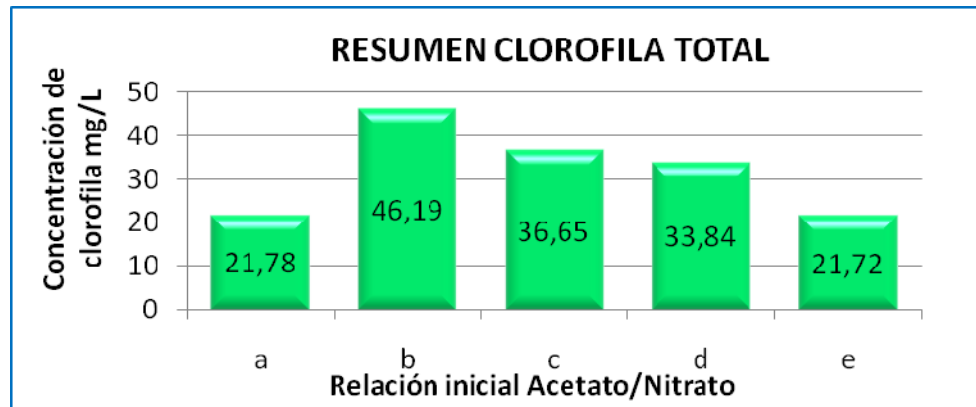
Figura 7. Concentración promedio de clorofila total (*a+b*) en mg/L en los 5 días de cultivo, para las condiciones iniciales de acetato/nitrato.



Fuente: los autores

En la figura 8 se resumen las concentraciones de clorofila más altas de cada nivel de nitrógeno y se comparan con la concentración de clorofila del cultivo control. Notándose que todos los cultivos mixotróficos estuvieron por encima del este último.

Figura 8. Resumen de concentraciones finales de clorofila en cada nivel nitrato en comparación con el cultivo control.



Fuente: los autores

Relaciones Acetato/Nitrato presentadas: a→ 20/0mM; b→ 20/0,97 mM; c→ 20/1,94 mM; d→ 20/2,78 mM; e→ 0/ 2,78 mM control.

En experimentos anteriores realizados en el laboratorio de biomasa, se encontró que la mayor productividad se alcanza inyectando CO₂ 10,99 g/L cada 15 minutos, en un periodo de 12 horas durante 5 días de experimentación, de este modo se obtuvo una concentración final de biomasa de aproximadamente 0,055 gramos de biomasa por litro de cultivo, con 439,6 gramos de CO₂/litro de cultivo, con un costo de \$2182 pesos. Empleando el mismo tiempo experimental, pero utilizando como fuente de carbono el acetato a una concentración 20mM (2,72 g/L) se obtuvo una concentración final de biomasa de aproximadamente 3,45 gramos de biomasa por litro de cultivo, con 2,72 gramos de acetato/litro de cultivo, con un costo de \$15,78 pesos.

Lo que implica un ahorro en la producción de biomasa a escala de laboratorio considerando que la bala de CO₂ tiene un costo de \$124120 pesos colombianos y que el costo de 25 Kg de acetato es de \$145000 pesos colombianos.

A continuación se reportan los datos obtenidos en el análisis de varianza para el último día del experimento.

Las pruebas realizadas muestran que existe homogeneidad de varianza, significancia y diferencias significativas, entre los tratamientos, además el comportamiento particular de los ciclos de luz es diferente al de los ciclos de oscuridad en el transcurso de todo el experimento, como se muestra en el Anexo H, para las dos variables de respuesta estudiadas.

Tal como se muestra en el Anexo H, en el día 1, no es posible establecer diferencias significativas para la productividad de biomasa entre los tratamientos en la medición de la mañana, posiblemente por tratarse de un periodo de adaptación, sin embargo en la medición de la tarde, el tratamiento 20/0,97mM muestra diferencias significativas. La clorofila se ve afectada por la relaciones 20/0,97mM y 20/2,78mM, que presentan un nivel de significancia para la mañana y la tarde respectivamente.

Se observa que a partir del tercer día los niveles de 0,97mM de nitrato y 20mM de acetato, marcaron una gran diferencia en relación con los demás tratamientos para la productividad de biomasa; a si mismo este efecto significativo presentó continuidad en el transcurso de las etapas del cultivo, favoreciendo la productividad de biomasa.

Los tratamientos de 20/1,94mM y 20/2,78mM mostraron significancias en la producción de biomasa en el día 2 de cultivo, pero su efecto no es constante sino que decae rápidamente, ya que a partir del día 3 la influencia de estas concentraciones no se evidencia.

- Variable de respuesta: Productividad de biomasa.

Primero se aplicó un test de homogeneidad de varianza del efecto acetato/nitrato sobre la productividad, como se muestra en la Tabla 1, los métodos empleados

por el *software* STATISTICA 7 incluyen Hartley F-máx, Cochran C y Bartlett Chi cuadrado. De este análisis se concluyó que hay homogeneidad de varianza entre los tratamientos, porque la varianza explicada es superior a la no explicada ($p > 0,05$).

Tabla 1. Test de homogeneidad de varianza para el día 5 (mañana y tarde).

Test Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre productividad biomasa ($g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
56,16327	0,410226	13,14006	11	0,284270	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
353,8163	0,346525	14,53381	11	0,204849	SI

Fuente: los autores

Tabla 2. Test de significancia para productividad de biomasa en el día 5.

DIA 5 MAÑANA						
EFEECTO	SC	GL	MC	F	p	Resultado
INTERCEPTO	2,392198	1	2,392198	3214,145	0,000000	SI
NITRATO	0,123228	3	0,041076	55,189	0,000000	SI
ACETATO	0,134633	2	0,067316	90,446	0,000000	SI
ACETATO/ NITRATO	0,141612	6	0,023602	31,711	0,000000	SI
ERROR	0,017863	24	0,000744			
DIA 5 TARDE						
EFEECTO	SC	GL	MC	F	p	Resultado
INTERCEPTO	2,793065	1	2,793065	2012,777	0,000000	SI
NITRATO	0,221041	3	0,073680	53,097	0,000000	SI
ACETATO	0,158890	2	0,079445	57,251	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,244682	6	0,040780	29,388	0,000000	SI
ERROR	0,033304	24	0,001388			

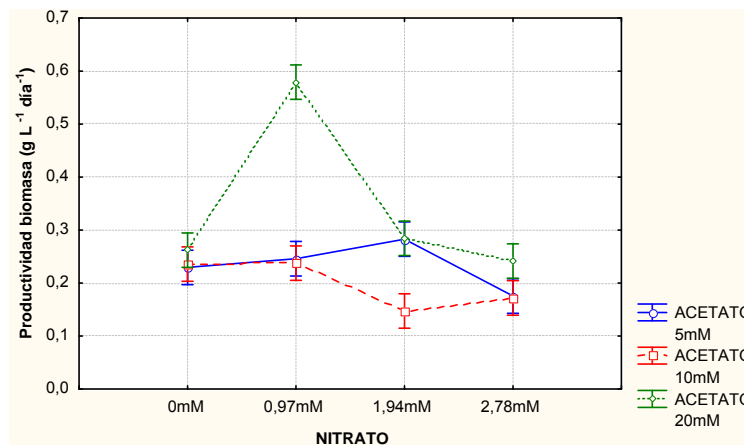
Fuente: los autores

Posteriormente se aplicó el Test de significancia para determinar si los tratamientos, Acetato y Nitrato de forma individual y su interacción, tienen significancia sobre la variable de respuesta, los resultados se pueden observar en la Tabla 2, donde $p < 0,05$. La tabla 2 muestra la suma de cuadrados, los grados de

libertad, la media de cuadrados, la función de probabilidad y el valor de la probabilidad p. Todas las $p < 0,05$ fueron tomadas como significativas y por tanto se continuó con el análisis de varianza.

Las interacciones de los tratamientos acetato/nitrato en el quinto día de cultivo se representan mediante las figuras 9 y 10; donde $p < 0,05$, indicando que la productividad de biomasa de *C. vulgaris* se ve afectada por la relación carbono/nitrógeno. En la figura 9 se aprecia que el tratamiento 20mM acetato-0,97mM nitrato tiene diferencias significativas sobre la productividad de biomasa, confirmando los resultados obtenidos anteriormente. Los tratamientos en el nivel 0 y 2,78mM de nitrato se descartan, debido a que ninguno tuvo diferencias significativas, indicando que no son relaciones carbono/nitrógeno apropiadas para aumentar la productividad de la biomasa.

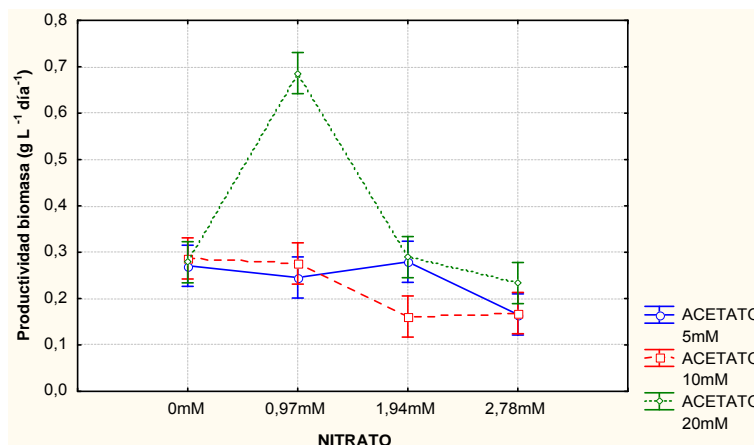
Figura 9. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 5 en la mañana).



Fuente: los autores

Efectos presentes $F(6, 24) = 37,711$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

Figura 10. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 5 en la tarde).



Fuente: los autores

Efectos presentes $F(6, 24) = 29,388$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

- Variable de respuesta: Concentración de clorofila total.

Tabla 3. Test de homogeneidad de varianza para el día 5 (mañana y tarde) efecto acetato/nitrato sobre la concentración de clorofila total (mg/L)

Test Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la clorofila (mg/L)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
45,92901	0,422538	10,94984	11	0,447475	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 5 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
72,98702	0,270893	18,21376	11	0,076751	SI

Fuente: los autores

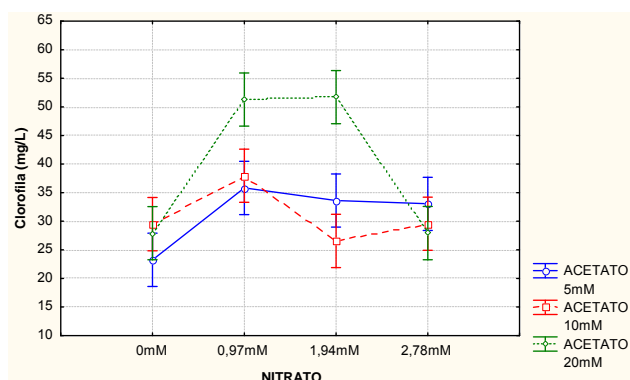
Tabla 4. Test de significancia para la concentración de clorofila total (mg/L) en el día 5.

DIA 5 MAÑANA						
EFECTO	SC	GL	MC	F	p	Resultado
INTERCEPTO	41648,71	1	41648,71	2729,875	0,000000	SI
NITRATO	1218,78	3	406,26	26,628	0,000000	SI
ACETATO	585,60	2	292,80	19,192	0,000011	SI
ACETATO/NITRATO	948,44	6	158,07	10,361	0,000011	SI
ERROR	366,16	24	15,26			
DIA 5 TARDE						
EFECTO	SC	GL	MC	F	P	Resultado
INTERCEPTO	54379,91	1	54379,91	1527,219	0,000000	SI
NITRATO	4848,04	3	1616,01	45,385	0,000000	SI
ACETATO	1373,39	2	686,70	19,285	0,000010	SI
ACETATO/NITRATO	1361,41	6	226,90	6,372	0,000409	SI
ERROR	854,57	24	35,61			

Fuente: los autores

En la figura 11 se observa que la concentración más alta de acetato (20mM), favoreció la actividad fotosintética, es por esto que se encuentran concentraciones de clorofila altas comparadas con los demás tratamientos. Sin embargo por tratarse de la primera medición del día los datos corresponden al comportamiento de la microalga en la oscuridad, es por esto que se aprecian rangos de clorofila más altos en la figura 12 (medición de la tarde), correspondiente a la exposición a la luz.

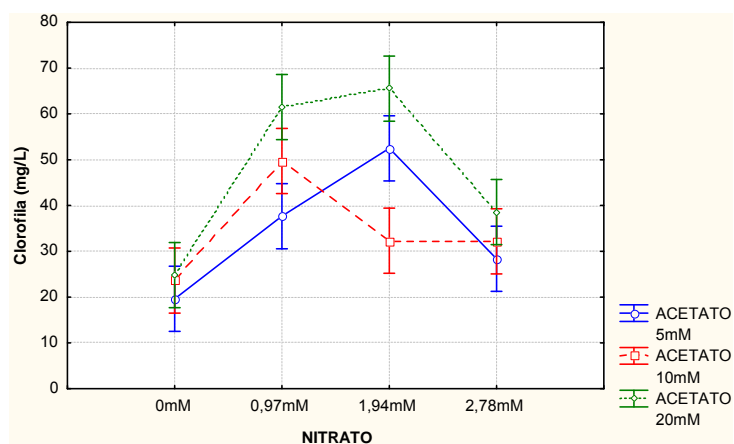
Figura 11. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 5 en la mañana).



Fuente: los autores

Efectos presentes $F(6, 24) = 10,361$; $p = 0,00001$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

Figura 12. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 5 en la tarde).



Fuente: los autores

Efectos presentes $F(6, 24) = 6,3723$; $p = 0,00041$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

Tabla 5. Resumen del análisis de varianza tratamiento 20/0,97mM.

PROD. DE BIOMASA EFECTO INTERACCIÓN C/N				CLOROFILA EFECTO INTERACCIÓN C/N		
DIA	TEST H.V.	TEST SIGN. C/N	DIF. SIGNIF C/N	TEST H.V.	TEST SIGN. C/N	DIF. SIGNIF C/N
1 MAÑA	NO $p < 0,05$	NO $p > 0,05$	NO $p > 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
1 TARD	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
2 MAÑA	NO $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	NO $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
2 TARD	NO $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	NO $p > 0,05$	NO $p > 0,05$
3 MAÑA	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
3 TARD	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	NO $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
4 MAÑA	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
4 TARD	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	NO $p > 0,05$	NO $p > 0,05$
5 MAÑA	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$
5 TARD	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p > 0,05$	SI $p < 0,05$	SI $p < 0,05$

Según el análisis estadístico, esta relación carbono/nitrógeno tuvo un comportamiento casi invariante durante los cinco días de experimentación, a diferencia de los demás tratamientos. Permitiendo alcanzar los mejores resultados en productividad de biomasa y concentración de clorofila.

4. CONCLUSIONES

Se encontró una relación inicial de Acetato/Nitrato de 20/0,97mM que mejora la productividad de biomasa de *C. vulgaris* superando en gran medida las productividades obtenidas en anteriores investigaciones a escala de laboratorio.

Los resultados del análisis de contenido de clorofila y productividad de biomasa, demostraron la actividad del metabolismo fotosintético y de fosforilación oxidativa en *C. vulgaris*, confirmando que fueron cultivos de comportamiento mixotrófico.

La implementación de cultivos mixotróficos usando la relación encontrada en este estudio, disminuye el costo de producción de biomasa a escala de laboratorio, comparado con el suministro de CO₂ que se ha venido empleando, debido al bajo costo del acetato de sodio y a la reducción de la concentración de nitrato de sodio en el medio de cultivo.

RECOMENDACIONES

La productividad de biomasa aumentó significativamente con los tratamientos aplicados en este trabajo, sin embargo se recomienda hacer un barrido en el intervalo de relaciones cercanas a la que se encontró como superior en este estudio.

Para confirmar el consumo total del acetato suministrado a los cultivos de *C. vulgaris* se sugiere realizar un seguimiento a la variación de la concentración de este sustrato en el medio de cultivo.

Para posteriores estudios se recomienda determinar la concentración de lípidos almacenados por las células de *C. vulgaris* mediante esta forma de cultivo, ya que el acetato de sodio ha sido empleado en múltiples estudios para mejorar la producción de lípidos en las células de *C. vulgaris* [15,34,64].

BIBLIOGRAFÍA

1. **Rosenberg, J., Oyler, G., Wilkinson, L. and Betenbaugh, M.** 2008. *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution.* Current Opinion in Biotechnology, 19:430-436.
2. **Ugwu, C., and Aoyagi H.** 2008. *Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of C. sorokiniana.* Photosynthetica, 46:283-285.
3. **Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cay, Z. and Hu, Z.** 2009. *Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of Phaeodactylum tricorutum.* Journal of Applied Phycology, 21:239-246.
4. **Martínez, Ma., Camacho, F., Jiménez, J. and Espínola, J.** 1997. *Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of Chlorella pyrenoidosa mixotrophic growth.* Process Biochemistry, 32:93-98.
5. **Ogawa, T. and Aiba, S.** 1981. *Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in Chlorella vulgaris and Scenedesmus acutus.* Biotechnology and Bioengineering, 23:1121–1132.
6. **Marquez, F., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. and Nagai, S.** 1993. *Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 76:408-410.
7. **Endo H., Sansawa H. and Nakajima K.** 1977. *Studies on Chlorella regularis: heterotrophic fast-growing strain. II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration.* Plant Cell Physiology.
8. **Lalucat, J., Imperial, J. and Parés, R.** 1984. *Utilization of light for the assimilation of organic matter in Chlorella sp. VJ79.* Biotechnology and Bioengineering, 26:677–681.
9. **Chen, T., Wenjie Zheng, W., Wong Y., Yang, F., Bai, Y.** 2006. *Accumulation of selenium in mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose.* Bioresource Technology, 97:2260–2265.
10. **Po-Fung Ip, Chen F.** 2005. *Production of astaxanthin by the green microalga Chlorella zofingiensis in the dark.* Process Biochemistry, 40:733–738.

11. **Po-Fung Ip a, Chen F.** 2005. *Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in Chlorella zofingiensis in heterotrophic culture.* Process Biochemistry, 40:3491–3496.
12. **Borowitzka, M.** 1999. *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters.* Journal of Biotechnology, 70:313–321.
13. **Colman, B.** 1977. Microbodies. H. Smith. *The molecular biology of plant cells*, 6:136-158.
14. **Buchanan, B., Gruissem, W, Jones, R.** 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, 630-728.
15. **Qiao, H. and Wang, G.** 4, 2009. *Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in Chlorella sorokiniana.* Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 27:762-768.
16. **Barsanti, L., Gualtieri, P.** General Overview. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.* 2006.
17. **Hoek, C. Van Den.** Chlorophyta: Morphology and classification. C., Wynne, M. Lobban. *The Biology of seaweeds.* 3.
18. **Feng Chen, Yue Jiang.** Algae and their biotechnological potential: proceedings of the 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. Hong Kong : s.n., 2000.
19. **Abbayes, H. Des.** 1989. Clasificación de las algas. *Botánica: vegetales inferiores.*
20. **Robert Edward Lee.** 2008. Cambridge University. Chlorophyta. *Phycology.* 5.
21. **Iwamoto, H.** Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species: Chlorella. A. Richmond. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* 2004, 11.
22. **Xu, L., Weathers, P., Xiong, X. and Liu, C.** 3, 2009. *Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities.* Engineering in Life Sciences, 9:178–189.
23. **Nobel, Park S.** Physicochemical and environmental plant physiology. 2009.
24. **Patiño, R., Janssen, M. and von Stockar, U.** 2007. *A study of the growth for the microalga Chlorella vulgaris by photo-bio-calorimetry and other on-line and off-line techniques.* Biotechnology and Bioengineering, 96:757–767.

25. **Govindjee, Krogmann, D.** 2004. *Discoveries in oxygenic photosynthesis (1727–2003): a perspective*. *Photosynthesis Research*, 80:15-57.
26. **Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C., Wu, Q.** 2010. *Double CO₂ fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production*. *Bioresource Technology*, 101:2287–2293.
27. **Fernández, F., Camacho, F., Pérez, J., Sevilla, J., and Grima, E.** 1997. *A Model for Light Distribution and Average Solar Irradiance Inside Outdoor Tubular Photobioreactors for the Microalgal Mass Culture*. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:701-714.
28. **Fernández, F., Camacho, F., Pérez, J., Sevilla, J. and Grima, E.** 1998. *Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance*. *Biotechnology and Bioengineering*, 58:605–616.
29. **Fernández, F., Pérez, J., Sevilla, J., Camacho, F. and Grima, E.** 2000. *Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68:173–183.
30. **Luo, H. , Al-Dahhan, M.** 2004. *Analysing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85:382–393.
31. **Barber, J., Andersson, B.** 1992. *Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis*. *Trends in Biochemical Sciences*, 17:61–66.
32. **Merrett, M. J. and Syrett, P. J.** 1960. *The Relationship Between Glucose Oxidation and Acetate Oxidation in *Chlorella vulgaris**. *Physiologia Plantarum*, 13:237–249.
33. **Syrett, P., Bocks, S. and Merrett, M.** 1963. *The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris**. *Journal of Experimental Botany*, 36-47.
34. **Huang, G., Chen, F., Dong Wei, D., Zhang, X., Chen, G.** 2010 *Biodiesel production by microalgal biotechnology*. *Applied Energy*, 87:38–46.
35. **Goulding, K. and Merrett, M.** 1966. *The Photometabolism of Acetate by *Chlorella pyrenoidosa**. *Journal of Experimental Botany*.

36. **Voet, J., Voet, D.** 2006. Ciclo del ácido cítrico. *Bioquímica*. s.l.: Panamericana, 21.
37. **Kornberg, H. and Krebs, H.** 1957. *Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle*. *Nature*, 179:988-991.
38. **Kornberg, H. and Elsdén, S.** 1961. *The Metabolism of 2-Carbon Compounds by Microorganisms*. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 23.
39. **Liang, Y. N., Sarkany, N., & Cui, Y.** 2009. *Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. *Biotechnological Letters*, 31:1043–1049.
40. **Gladue, R., y Maxey, J.** 1994. *Microalgal feeds for aquaculture.*, *Journal Applied Phycology*.
41. **Miao, X. L., Wu, Q. Y.** 2006. *Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil*. *Bioresource Technology*, 97.
42. **Miao, X., Wu, Q.** 2004. *High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides**. *Journal Biotechnology*, 110:85–93.
43. **Xu, H., Miao, X., Wu, Q.** 2006. *High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters*. *Journal Biotechnology*, 126:499–507.
44. **Li, X., Xu, H., Wu, Q.** 2007. *Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors*. *Biotechnology Bioeng*, 98:764–771.
45. **Martinez, F. and Orus, M.** 1991. *Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101*. *Plant Physiology*, 95:1150–1155.
46. **Tomaselli, L.** The Microalgal Cell. A. Richmond. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. 2004.
47. **Jeon, Y., Cho, C. and Yun, Y.** 2006. *Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:490-495.

48. **Lee, H., Lee, S. and Park, B.** 1989. *The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation.* *Biomass*, 18:153-160.
49. **Chojnacka, K. y Marquez, F. 1,** 2004. *Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae.* *Biotechnology*, 3:21-34.
50. **Lee., Yuan-Kun.** 4. *Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential.* *Journal of Applied Phycology*, 13:307-315.
51. **Lee, Y., Ding, S., Hoe, C. and Low, C.** 1996. *Mixotrophic growth of Chlorella sorokiniana in outdoor enclosed photobioreactor.* *Journal of Applied Phycology*, 8:163-169 .
52. **Pringsheim, E., Wiessner, W.** 1960. *Photo-assimilation of acetate by green organisms.* *Nature*, 188.
53. **Nichols, B. W., James, A. T., Breuer, J.** 1967. *Interrelationships between fatty Acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in Chlorella vulgaris.* *Journal Biochemistry*, 104:486–496.
54. **Harris, P., James, A.** 1969. *The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants.* *Journal Biochemistry*, 112:325–330.
55. **Chen, F. and Zhang, Y.** 1997. *High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system.* *Enzyme and Microbial Technology*, 20.
56. **Lee, Y. and Zhang, D.** 1999. *Production of astaxanthin by Haematococcus.* *Chemicals from Microalga*, 41–56.
57. **Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T.** 1989. *Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte Nannochloropsis sp.* *Journal of Phycology*, 25:686–692.
58. **Cohen, Z.** 1999. *Porphyridium cruentum.* *Chemicals from microalgae*, 41-56.
59. **Sukenik, A.** 1999. *Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte Nannochloropsis.* *Chemicals from Microalga*, 41–56.

60. **Khotimchenko, S. V., & Yakovleva, I. M.** 2005. *Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance.* *Phytochemistry*, 66:73–79.
61. **Lin, C. Y., & Lay, C. H.** 2004. *Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora.* *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:41-45.
62. **Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., and Merzlyak, M.** 3. *Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*.* *Journal of Applied Phycology*, 20:245-251.
63. **Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., & Yoshida, T.** 2000. *Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp UTEX LB1999.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:112-117.
64. **Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B.** 2010. *Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*.* *Applied Biochemistry Biotechnology*, 162:1978–1995.
65. **Flynn, K.** 2, 1991. *Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake.* *Journal of Plankton Research*, 13:373-387.
66. **Caperon, J.** 1968. *Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations.* *Ecology*, 49:866-872.
67. **Hitchcock, G., Goldman C. and Dennett, M.** 1986. *Photosynthate partitioning in cultured marine phytoplankton metabolic patterns in a marine diatom under constant and variable light intensities.* *Marine Ecology Progress Series*, 30:77-84.
68. **Becker, E.** 1994. *Measurement of alga growth.* *Microalgae: Biotechnology and Microbiology.*
69. **Ogbonna, J., Ichige, E. and Tanaka, H.** 2002. *Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:532–538.
70. **Yang C, Hua Q, Shimizu K.** 2000. *Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-*

autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal, 102-106.

71. **Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh, M, Das k. s.n.**, 2011. *Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters*. Applied Energy, p. In press.

72. **Chen F, Johns MR.** 1991. *Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic Chlorella sorokiniana*. Applied Phicology, 203-209.

73. **Engel, N., Jenny, T., Mooser, V., Gossauer, A.** 1991. *Chlorophyll Catabolism in Chlorella*. Febs Letters, 131-133.

ANEXOS

ANEXO A. REACTIVOS Y EQUIPOS

Tabla A1. Reactivos

REACTIVO	FORMULA
Nitrato de sodio	NaNO_3
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Cloruro de sodio	NaCl
Fosfato monoácido de potasio	K_2HPO_4
Fosfato diácido de potasio	KH_2PO_4
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Trióxido de molibdeno	MoO_3
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Nitrato de cobalto hexahidratado	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Ácido bórico	H_3BO_3
Etilen-diaminotetraacetato	EDTA
Hidróxido de potasio	KOH
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Acido sulfúrico	H_2SO_4
Acido clorhídrico	HCl
Hidróxido de sodio	NaOH
Acetato de sodio trihidratado	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Alcohol etílico	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$

Figura A1. Equipos empleados



ESPECTROFOTOMETRO

Spectroquant® Pharo 300, un rango de longitud de onda de 190-1100 nm.



BALANZA ANALITICA

Serie 320XB, marca Precisa Gravimetrics AG, máx. 220 g e=0,001, min. 0,01 g d=0,0001 g.



PH- METRO

Handylab pH 11 SCHOTT Instruments



CENTRIFUGADORA

PowerSpin™ MX, velocidad variable 1000 a 3400 rpm, rotor para 24 tubos de 2 a 10 ml.



HORNO

Marca WTC binder, 115 V 60 Hz, 1,20 kW, temperatura máxima 300 °C.



PLACA DE CALENTAMIENTO
Modelo MSH-20D



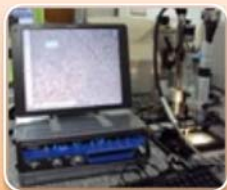
DESECADOR
Desecador con gel de sílice.



COMPRESOR
Potencia 350 watts. 1650 rpm



AUTOCLAVE CILÍNDRICA
Capacidad 25 litros , Modelo 25-X



Microscopio digital HIROX, KH7700

ANEXO B. MEDIO DE CULTIVO *BOLD BASAL*

Tabla B1. Preparación de las soluciones *Stock*

Macronutrientes		
Soluciones Stock		Para 400 mL
(1) NaNO ₃		10,0 g
(2) MgSO ₄ ·7H ₂ O		3,0 g
(3) NaCl		1,0 g
(4) K ₂ HPO ₄		3,0 g
(5) KH ₂ PO ₄		7,0 g
(6) CaCl ₂ ·2H ₂ O		1,0 g
Micronutrientes		
Soluciones Stock		Para 1 L
Soluciones de elementos de traza (autoclave para disolverse)	(7) ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44 g
	MoO ₃	0,71 g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49 g
	(8) H ₃ BO ₃	11,42 g
	(9) EDTA	50,0 g
	KOH	31,0 g
	(10) FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98 g
	H ₂ SO ₄ (concentrado)	1,0 mL
Medio <i>Bold Basal</i>		
Soluciones Stock		Para 1 L
Macronutrientes		10,0 mL de cada uno
Micronutrientes		1,0 mL de cada uno

Para los cultivos mixotróficos se varió la cantidad de *Stock* 1 (solución de NaNO₃). Con el fin de obtener concentraciones de 0; 0,97; 1,94 y 2,78mM de nitrato con relación al medio *Bold Basal* original.

ANEXO C. MONTAJE DEL CULTIVO DE *C. vulgaris*

Figura C1. Preparación del inoculo

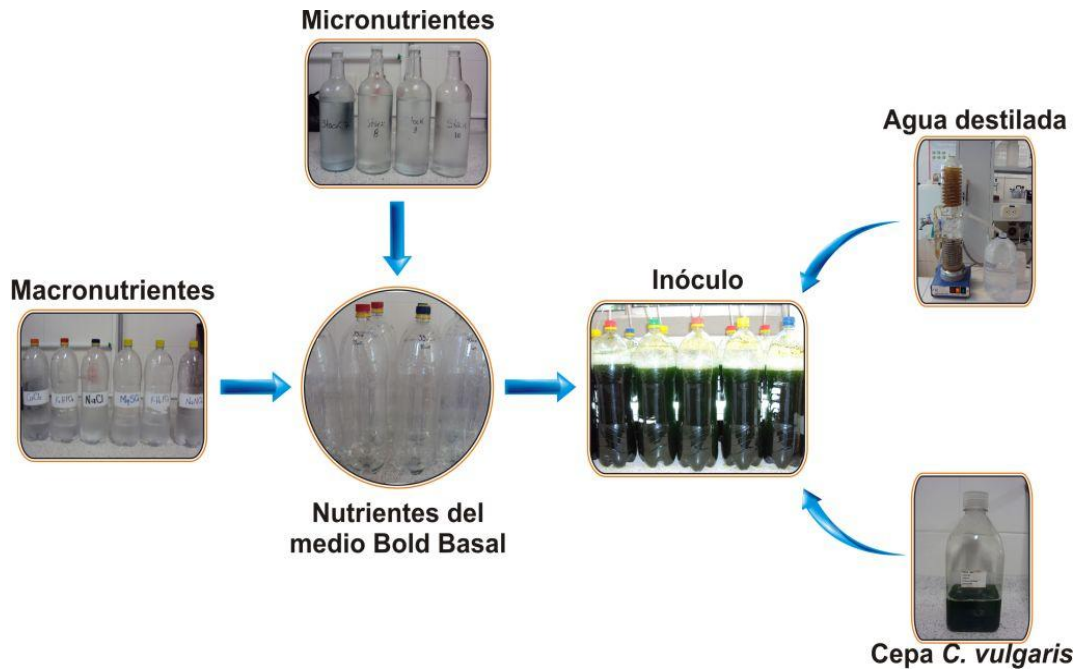
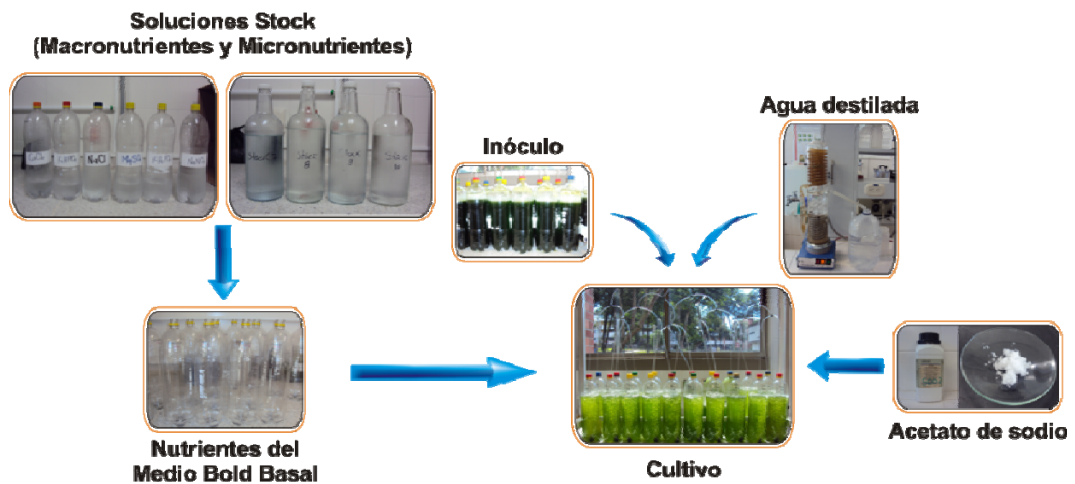


Figura C2. Adecuación del sistema de aireación

El sistema de aireación consistió en un acople “*tubo-difusor*”, por el cual se suministró aire de manera continua. Diámetro aproximado de burbuja 2,5 mm.



Figura C3. Montaje de los cultivos mixotróficos



Cantidades de acetato de sodio trihidratado para dos litros:

- 100% → 20mM → 5,4432 g
- 50% → 10mM → 2,7216 g
- 25% → 5mM → 1,3608 g

Las variaciones de nitrógeno, se hicieron mediante la manipulación de la cantidad de solución de nitrato de sodio (*stock 1*).

- 100% → 20ml de stock 1 → 2,78mM de nitrato → 2,78mM de nitrógeno
- 70% → 14ml de stock 1 → 1,94mM de nitrato → 1,94mM de nitrógeno
- 35% → 7ml de stock 1 → 0,97mM de nitrato → 0,97mM de nitrógeno
- 0% → 0ml de stock 1 → 0mM de nitrato → 0mM de nitrógeno

ANEXO D. MEDICIONES REALIZADAS

Figura D1. Medición de la densidad óptica (cada 12 horas).

Se tomó una muestra de 6 mL de cada uno de los cultivos, a la que se le realizó una dilución a la mitad 3 veces. Las diluciones se llevaron a un espectrofotómetro y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 500 nm.

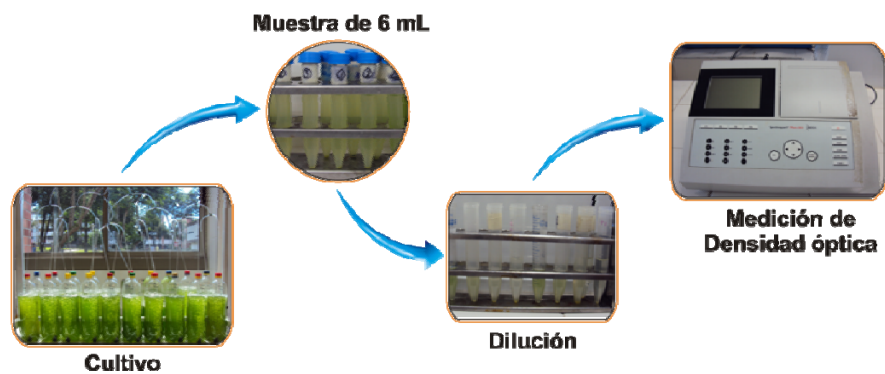


Figura D2. Medición de clorofilas *a* y *b* (cada 12 horas).

Se tomó una muestra de 10 mL de cada cultivo, se centrifugó durante 7 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó 3 mL de etanol para disolver la clorofila. Este extracto fue sometido a baño maría por 5 minutos, luego diluido con 2 mL más de etanol, para ser analizado en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda diferentes, 650 y 665 nm.

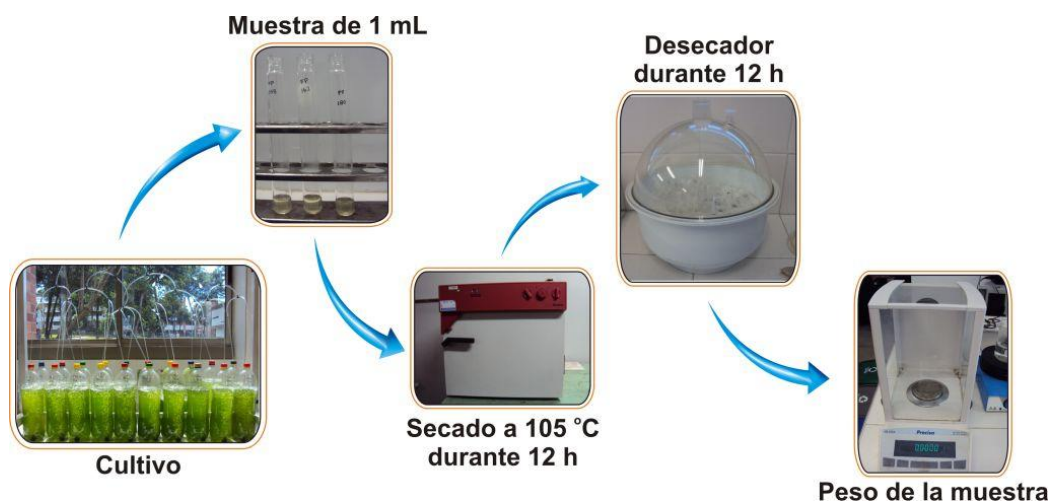


Figura D3. Medición de pH (cada 24 horas).



Figura D4. Medición de peso seco de células (cada 24 horas).

Se tomó una muestra de 1 mL en un tubo previamente pesado, la cual se mantuvo 12 horas en el horno a 105 °C y posteriormente 12 horas en el desecador, por último se peso para calcular la diferencia entre el peso inicial y el final.

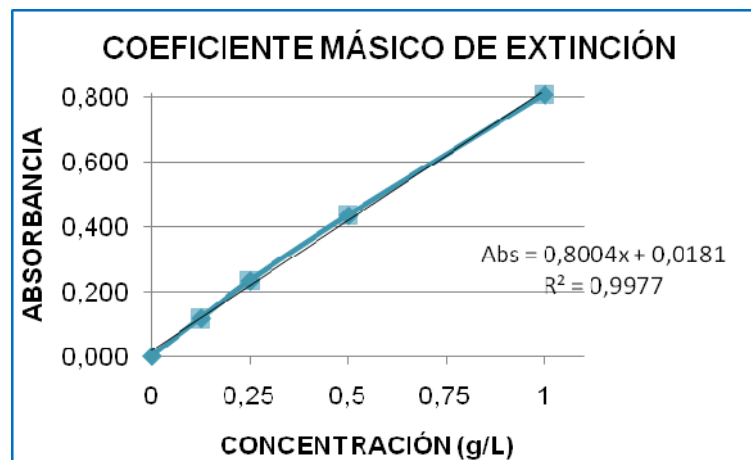


ANEXO E. CALCULO DEL COEFICIENTE MÁSIICO DE EXTINCIÓN

Tabla E1. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra.

Peso seco por vol. de muestra (concentración g/L)	Absorbancia
0	0
1	0,807
0,5	0,434
0,25	0,233
0,125	0,117

Figura E1. Grafica de los datos de absorbancia en función de la concentración, para el cálculo del coeficiente másico de extinción.



ANEXO F. DATOS EXPERIMENTALES

Figura F1. Producción de biomasa durante los 5 días de cultivo.

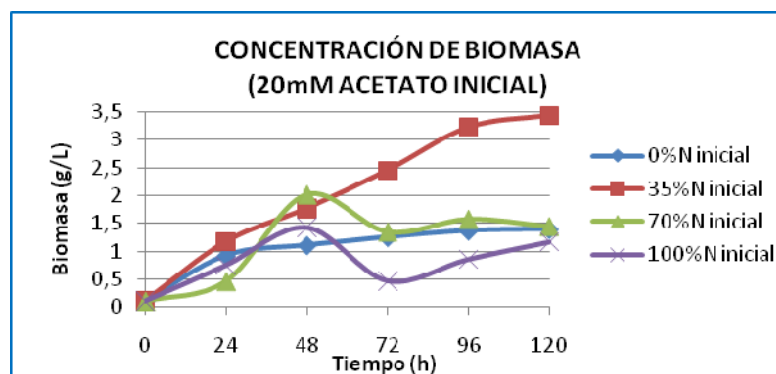
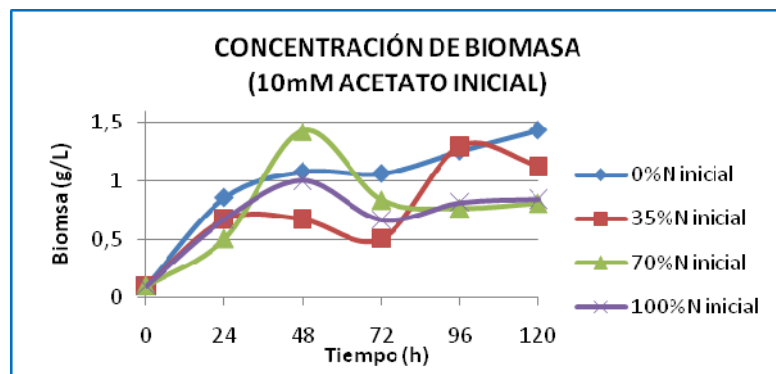
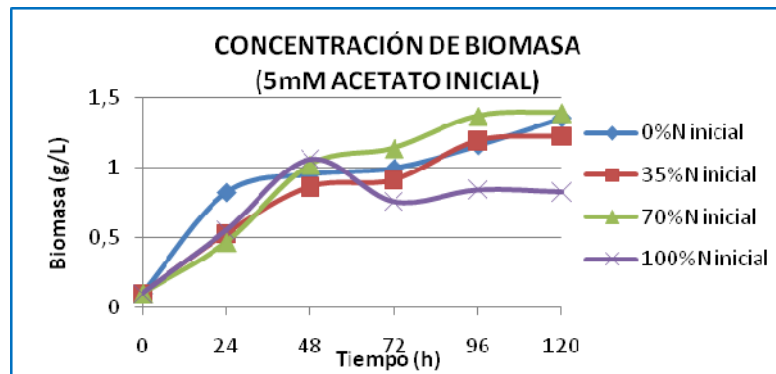
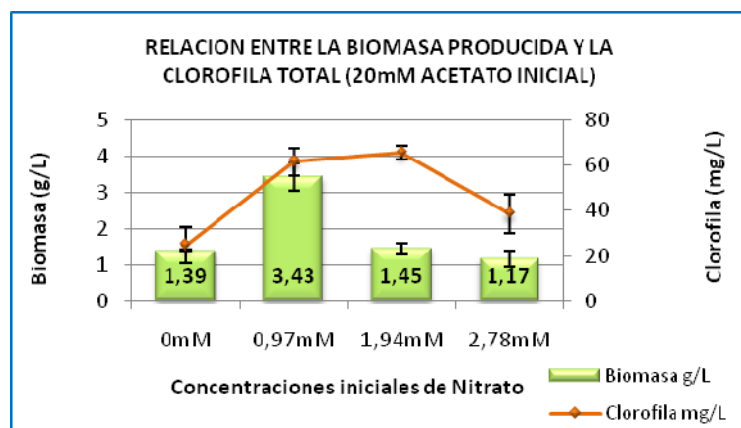
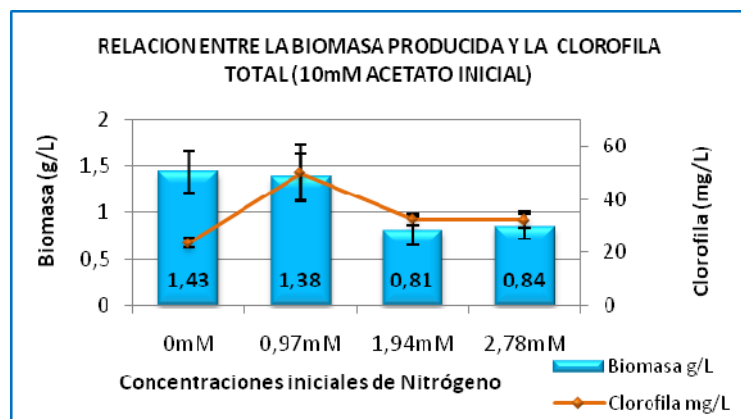
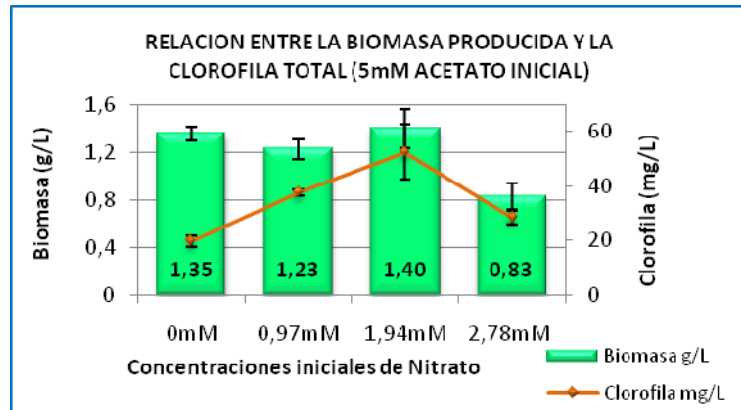


Figura F2. Relación entre la concentración de biomasa y clorofila para cada nivel de acetato en el último día del experimento.



ANEXO G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla G1. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato sobre la productividad de biomasa para las dos mediciones del día 1.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 1 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la productividad de biomasa (g L ⁻¹ día ⁻¹)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
360,5385	0,478067	37,17815	11	0,000108	NO
Test de Homogeneidad de Varianza (día 1 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
12,77953	0,321960	6,025114	11	0,871683	SI

Los números en rojo en la tabla G1, cuando $p < 0,05$, indican que no hubo homogeneidad de varianza entre los tratamientos, la varianza no explicada es superior a la explicada; por tanto los valores de la variable de respuesta están dispersos dentro de un mismo tratamiento.

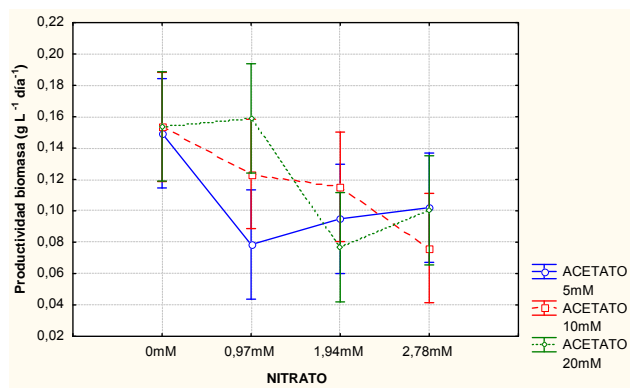
Tabla G2. Test de significancia sobre la productividad de biomasa para las dos mediciones del día 1.

Test de significancia para productividad de biomasa (g L ⁻¹ día ⁻¹) (día 1 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	0,478459	1	0,478459	559,2823	0,000000	SI
NITRATO	0,020529	3	0,006843	7,9988	0,000722	SI
ACETATO	0,001655	2	0,000828	0,9676	0,394345	NO
ACETATO/NITRATO	0,011618	6	0,001936	2,2634	0,071440	NO
ERROR	0,020532	24	0,000855			
Test de significancia para productividad de biomasa (g L ⁻¹ día ⁻¹) (día 1 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	0,574219	1	0,574219	3916,292	0,000000	SI
NITRATO	0,029956	3	0,009985	68,102	0,000000	SI
ACETATO	0,014997	2	0,007498	51,141	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,023589	6	0,003931	26,813	0,000000	SI
ERROR	0,003519	24	0,000147			

En la tabla G2 se muestran los resultados del test de significancia, los números en rojo, $p < 0,05$, indican que hubo una respuesta significativa a los tratamientos por

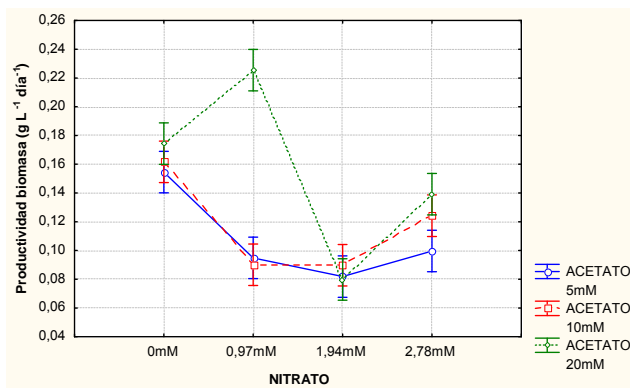
parte de la variable de respuesta. En es este caso la interacción de interés, acetato/nitrato no presenta significancia sobre productividad de biomasa en la medición de la mañana.

Figura G1. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 1 en la mañana). Efectos presentes $F(6, 24) = 2,2634$; $p = 0,07144$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.



En la figura G1, se presentan las interacciones de los 3 niveles acetato con los 4 niveles de nitrato, no es posible observar ninguna diferencia significativa entre los tratamientos en la medición de la mañana.

Figura G2. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 1 en la tarde). Efectos presentes $F(6, 24) = 26,813$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.



En la figura G2, se presentan las interacciones de los 3 niveles acetato con los 4 niveles de nitrato, todos los tratamientos se encuentran distribuidos de forma similar, excepto para 20mM de acetato y 0,97mM de nitrato, donde se observa una diferencia significativa en la variable de respuesta.

Al final de este capítulo se presentan las interacciones detalladas entre los doce tratamientos aplicados. El *software* compara cada tratamiento con los once restantes y resalta en rojo sus diferencias significativas, cuando $p < 0,05$.

Tabla G3. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato sobre la clorofila para las dos mediciones del día 1.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 1 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre clorofila (mg/L)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
260,4090	0,351581	16,20410	11	0,133721	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 1 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
37,89764	0,341536	11,84811	11	0,375168	SI

Los números en negro en la tabla G3, cuando $p > 0,05$, indican que hubo homogeneidad de varianza entre los tratamientos, la varianza no explicada es inferior a la explicada; por tanto los valores de la variable de respuesta son similares dentro de un mismo tratamiento.

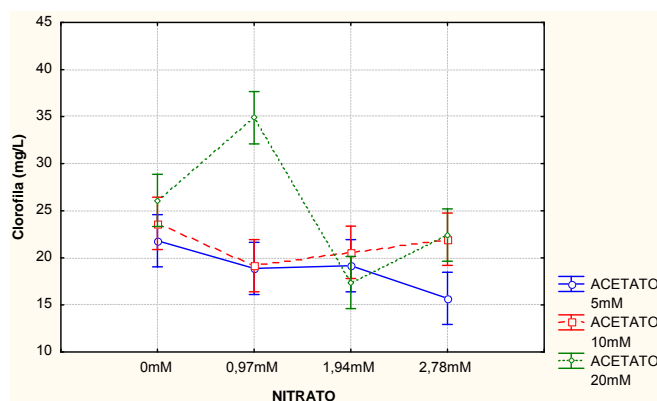
En la tabla G4 se muestran los resultados del test de significancia, los números en rojo, $p < 0,05$, indican que hubo una respuesta significativa de variable de respuesta a todos los tratamientos.

En la figura G3, se presentan las interacciones de los 3 niveles acetato con los 4 niveles de nitrato, todos los tratamientos se encuentran distribuidos de forma similar, excepto para 20mM de acetato y 0,97mM de nitrato, donde se observa una diferencia significativa en la variable de respuesta.

Tabla G4. Test de significancia sobre la clorofila para las dos mediciones del día 1.

Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 1 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	17118,63	1	17118,63	3154,021	0,000000	SI
NITRATO	191,55	3	63,85	11,764	0,000062	SI
ACETATO	242,92	2	121,46	22,379	0,000003	SI
ACETATO/NITRATO	388,88	6	64,81	11,942	0,000003	SI
ERROR	130,26	24	5,43			
Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 1 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	19800,55	1	19800,55	750,3399	0,000000	SI
NITRATO	1153,84	3	384,61	14,5749	0,000013	SI
ACETATO	581,13	2	290,57	11,0109	0,000405	SI
ACETATO/NITRATO	537,57	6	89,59	3,3952	0,014392	SI
ERROR	633,33	24	26,39			

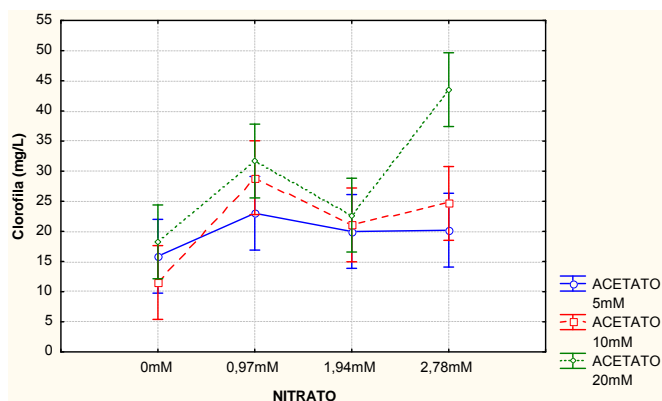
Figura G3. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 1 en la mañana). Efectos presentes $F(6, 24) = 11,946$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.



En la figura G4, se presentan las interacciones de los 3 niveles acetato con los 4 niveles de nitrato, todos los tratamientos se encuentran distribuidos de forma similar, excepto para 20mM de acetato y 2,78mM de nitrato, donde se observa una diferencia significativa en la variable de respuesta.

Al final de este capítulo se presentan las interacciones detalladas entre los doce tratamientos aplicados. El *software* compara cada tratamiento con los once restantes y resalta en rojo sus diferencias significativas, cuando $p < 0,05$.

Figura G4. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 1 en la tarde). Efectos presentes $F(6, 24) = 3,3952$; $p = 0,01439$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.



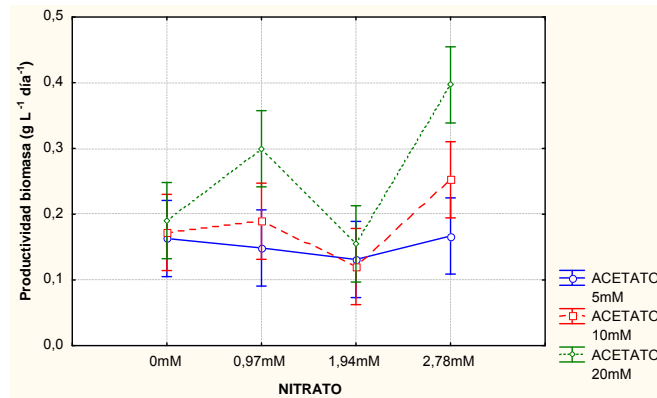
A continuación se resumen los test realizados desde los días 2 en adelante para las dos variables de respuesta y las dos mediciones diarias.

Tabla G5. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato y Test de significancia sobre la productividad para las dos mediciones del día 2.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 2 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
333,4060	0,544928	26,68847	11	0,005120	NO
Test de Homogeneidad de Varianza (día 2 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
1356,063	0,365706	28,22088	11	0,002994	NO

Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 2 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	1,422860	1	1,422860	601,1605	0,000000	SI
NITRATO	0,091037	3	0,030346	12,8210	0,000034	SI
ACETATO	0,074074	2	0,037037	15,6482	0,000045	SI
ACETATO/NITRATO	0,046466	6	0,007744	3,2720	0,017023	SI
ERROR	0,056805	24	0,002367			
Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 2 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	2,258126	1	2,258126	1372,255	0,000000	SI
NITRATO	0,039529	3	0,013176	8,007	0,000718	SI
ACETATO	0,089502	2	0,044751	27,195	0,000001	SI
ACETATO/NITRATO	0,034054	6	0,005676	3,449	0,013380	SI
ERROR	0,039493	24	0,001646			

Figura G5. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 2 en la mañana). Efectos presentes $F(6, 24) = 3,2720$; $p = 0,01702$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.



En la figura G5, se presentan las interacciones de los 3 niveles acetato con los 4 niveles de nitrato, todos los tratamientos se encuentran distribuidos de forma similar, excepto para 20mM de acetato y 2,78mM de nitrato, donde se observa una diferencia significativa en la variable de respuesta. En 20mM de acetato y 0,97mM de nitrato, se presentan diferencias con algunos tratamientos, esto se muestra claramente en las tablas de interacciones al final del capítulo.

Figura G6. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 2 en la tarde). Efectos presentes $F(6, 24) = 3,4490$; $p = 0,01338$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

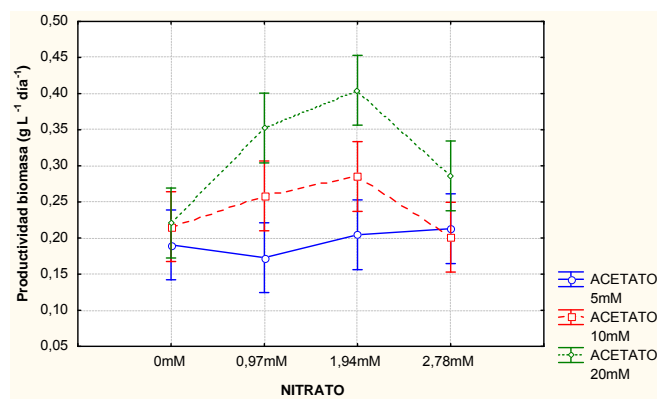


Tabla G6. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato y Test de significancia sobre la clorofila para las dos mediciones del día 2.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 2 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre clorofila (mg/L)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
313,8334	0,528870	22,64013	11	0,019857	NO
Test de Homogeneidad de Varianza (día 2 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
178,7536	0,392234	14,96886	11	0,183927	SI

Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 2 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	25966,05	1	25966,05	903,1598	0,000000	SI
NITRATO	1004,21	3	334,74	11,6430	0,000066	SI
ACETATO	758,60	2	379,30	13,1930	0,000136	SI
ACETATO/NITRATO	656,24	6	109,37	3,8043	0,008342	SI
ERROR	690,01	24	28,75			
Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 2 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	P	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	28076,60	1	28076,60	1117,978	0,000000	SI
NITRATO	1597,18	3	532,39	21,199	0,000001	SI
ACETATO	236,60	2	118,30	4,710	0,018807	SI
ACETATO/NITRATO	175,24	6	29,21	1,163	0,358237	NO
ERROR	602,73	24	25,11			

Figura G7. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 2 en la mañana y la tarde). Mañana: Efectos presentes $F(6, 24) = 3,8043$; $p = 0,00834$. Tarde: Efectos presentes $F(6, 24) = 1,1630$; $p = 0,35824$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

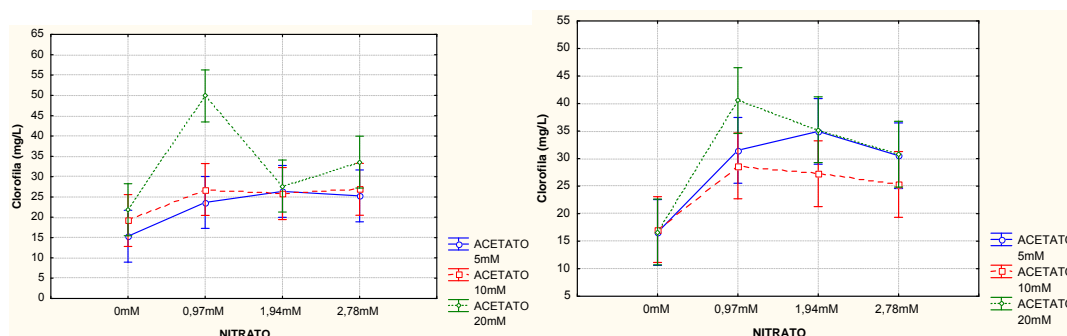


Tabla G7. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato y Test de significancia sobre la productividad para las dos mediciones del día 3.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 3 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
122,7248	0,390159	15,51875	11	0,159958	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 3 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
1542,250	0,284561	17,90642	11	0,083778	SI

Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 3 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	1,761384	1	1,761384	1852,213	0,000000	SI
NITRATO	0,158717	3	0,052906	55,634	0,000000	SI
ACETATO	0,070513	2	0,035257	37,075	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,086239	6	0,014373	15,114	0,000000	SI
ERROR	0,022823	24	0,000951			
Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 3 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	1,693531	1	1,693531	2816,486	0,000000	SI
NITRATO	0,134470	3	0,044823	74,545	0,000000	SI
ACETATO	0,062845	2	0,031422	52,258	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,128943	6	0,021490	35,740	0,000000	SI
ERROR	0,014431	24	0,000601			

Figura G8. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 3 en la mañana y la tarde). Mañana: Efectos presentes $F(6, 24) = 15,114$; $p = 0,00000$. Tarde: Efectos presentes $F(6, 24) = 35,740$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

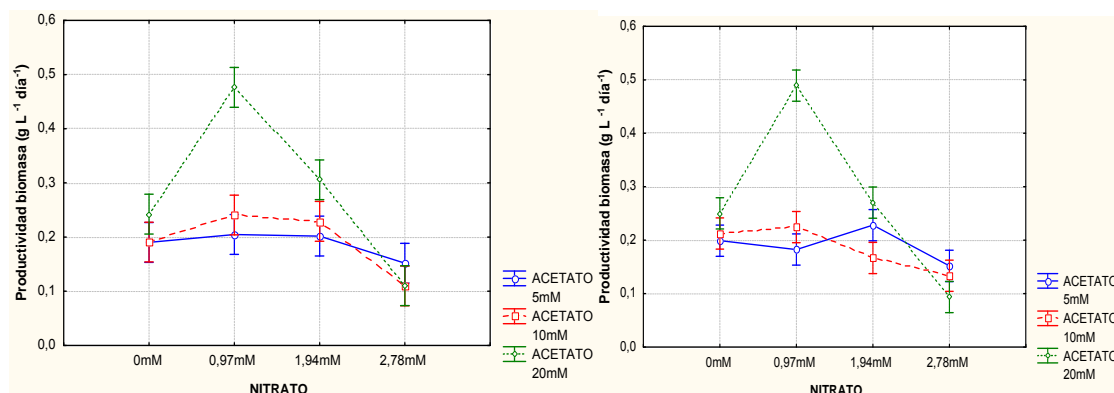


Tabla G8. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato y Test de significancia sobre la clorofila para dos mediciones del día 3.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 3 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la clorofila (mg/L)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
3792,810	0,210016	13,83235	11	0,242409	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 3 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
428,1123	0,322270	23,58594	11	0,014596	NO

Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 3 medición de la mañana)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	P	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	51823,54	1	51823,54	2481,427	0,000000	SI
NITRATO	1883,42	3	627,81	30,061	0,000000	SI
ACETATO	286,60	2	143,30	6,862	0,004398	SI
ACETATO/NITRATO	1105,95	6	184,32	8,826	0,000039	SI
ERROR	501,23	24	20,88			
Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 3 medición de la tarde)						
EFEECTO	SS	GL	MS	F	P	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	17893,32	1	17893,32	2381,136	0,000000	SI
NITRATO	375,53	3	125,18	16,658	0,000005	SI
ACETATO	403,50	2	201,75	26,847	0,000001	SI
ACETATO/NITRATO	850,41	6	141,73	18,861	0,000000	SI
ERROR	180,35	24	7,51			

Figura G9. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 3 en la mañana y tarde). Mañana: Efectos presentes $F(6, 24) = 8,8259$; $p = 0,00004$. Tarde: Efectos presentes $F(6, 24) = 18,861$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

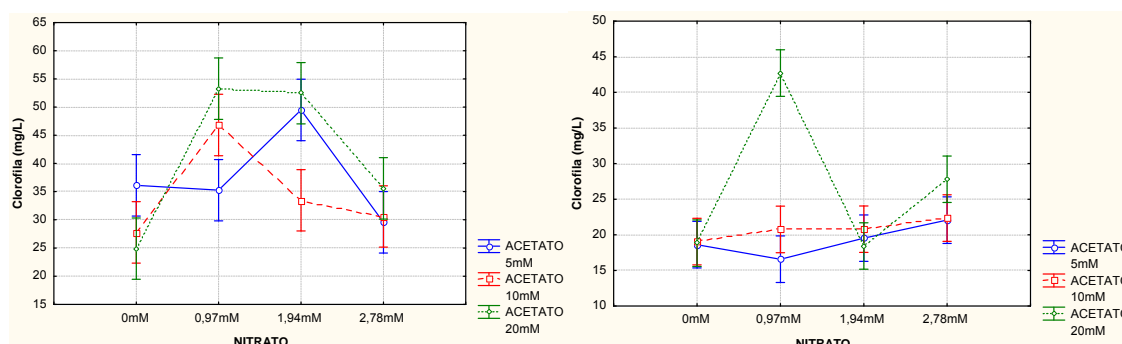


Tabla G9. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato y Test de significancia sobre la productividad para las dos mediciones del día 4.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 4 medición de la mañana)					
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
91,61538	0,254441	14,91220	11	0,186552	SI
Test de Homogeneidad de Varianza (día 4 medición de la tarde)					
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza
79,83582	0,180697	10,64140	11	0,473776	SI

Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 4 medición de la mañana)						
EFFECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	1,610061	1	1,610061	1771,628	0,000000	SI
NITRATO	0,120981	3	0,040327	44,374	0,000000	SI
ACETATO	0,081859	2	0,040929	45,037	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,108200	6	0,018033	19,843	0,000000	SI
ERROR	0,021811	24	0,000909			
Test de significancia para productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (día 4 medición de la tarde)						
EFFECTO	SS	GL	MS	F	p	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	2,445034	1	2,445034	2977,952	0,000000	SI
NITRATO	0,198051	3	0,066017	80,406	0,000000	SI
ACETATO	0,150428	2	0,075214	91,608	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	0,218603	6	0,036434	44,375	0,000000	SI
ERROR	0,019705	24	0,000821			

Figura G80. Efecto acetato/nitrato sobre productividad (día 4 en la mañana y tarde). Mañana: Efectos presentes $F(6, 24) = 19,843$; $p = 0,00000$. Tarde: Efectos presentes $F(6, 24) = 44,375$; $p = 0,00000$. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de 0,95.

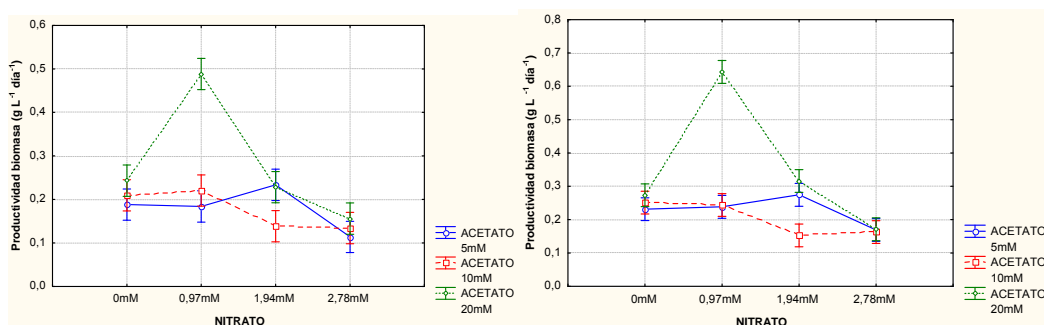
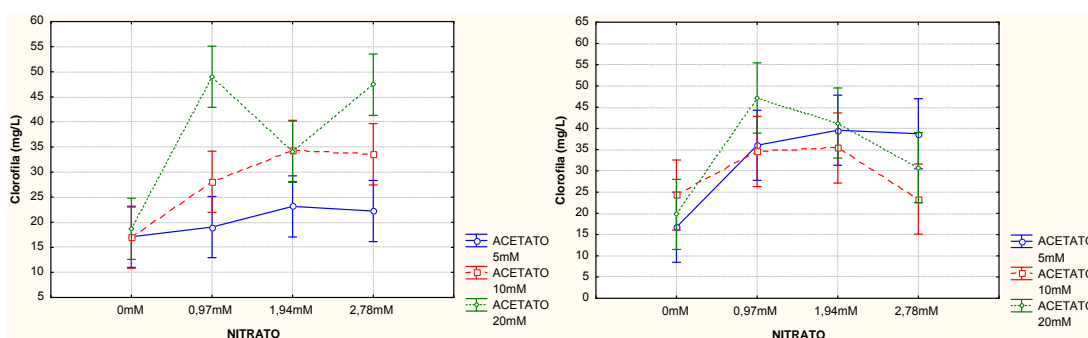


Tabla G10. Test de homogeneidad de varianza del efecto: Acetato/Nitrato sobre la clorofila para las dos mediciones del día 4.

Test de Homogeneidad de Varianza (día 4 medición de la mañana)						
Efecto: Acetato/Nitrato sobre la clorofila (mg/L)						
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza	
316,7729	0,42760 0	18,8496 9	11	0,063846	SI	
Test de Homogeneidad de Varianza (día 4 medición de la tarde)						
Hartley F-máx.	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	GL	p	Homogeneidad de varianza	
320,0763	0,46616 6	24,4476 6	11	0,010972	SI	
Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 4 medición de la mañana)						
EFFECTO	SS	GL	MS	F	P	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	29488,7 9	1	29488,7 9	1126,213	0,000000	SI
NITRATO	1533,34	3	511,11	19,520	0,000001	SI
ACETATO	1720,51	2	860,26	32,854	0,000000	SI
ACETATO/NITRATO	899,23	6	149,87	5,724	0,000824	SI
ERROR	628,42	24	26,18			
Test de significancia para clorofila (mg/L) (día 4 medición de la tarde)						
EFFECTO	SS	GL	MS	F	P	SIGNIFICANTE
INTERCEPTO	37578,6 0	1	37578,6 0	782,4295	0,000000	SI
NITRATO	2130,86	3	710,29	14,7890	0,000012	SI
ACETATO	174,53	2	87,26	1,8169	0,184177	NO
ACETATO/NITRATO	605,83	6	100,97	2,1024	0,090546	NO
ERROR	1152,67	24	48,03			

Figura G11. Efecto acetato/nitrato sobre clorofila (día 4 en la mañana y la tarde).

Mañana: Efectos presentes $F(6, 24) = 5,7238$; $p = 0,00082$. Tarde: Efectos presentes $F(6, 24) = 2,1024$; $p = 0,09055$.



Tablas de interacciones entre los tratamientos sobre la productividad y la clorofila para todos los días.

Tabla G11. Interacciones día 1 para productividad y clorofila.

Tukey HSD test; variable Productividad biomasa (g L-1 día-1) (día 1 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados= 0,00086, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
N mM	Ac mM	0,15	0,15	0,15	0,08	0,12	0,16	0,09	0,12	0,08	0,10	0,08	0,10	
1	0	5		1,00	1,00	0,18	0,99	1,00	0,51	0,95	0,16	0,70	0,15	0,65
2	0	10	1,00		1,00	0,13	0,98	1,00	0,41	0,89	0,11	0,59	0,11	0,55
3	0	20	1,00	1,00		0,13	0,98	1,00	0,40	0,89	0,11	0,58	0,11	0,54
4	0,97	5	0,18	0,13	0,13		0,76	0,08	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00
5	0,97	10	0,99	0,98	0,98	0,76		0,93	0,98	1,00	0,72	1,00	0,70	1,00
6	0,97	20	1,00	1,00	1,00	0,08	0,93		0,29	0,79	0,07	0,45	0,07	0,41
7	1,94	5	0,51	0,41	0,40	1,00	0,98	0,29		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,94	10	0,95	0,89	0,89	0,91	1,00	0,79	1,00		0,89	1,00	0,88	1,00
9	1,94	20	0,16	0,11	0,11	1,00	0,72	0,07	1,00	0,89		0,99	1,00	1,00
10	2,78	5	0,70	0,59	0,58	1,00	1,00	0,45	1,00	1,00	0,99		0,99	1,00
11	2,78	10	0,15	0,11	0,11	1,00	0,70	0,07	1,00	0,88	1,00	0,99		1,00
12	2,78	20	0,65	0,55	0,54	1,00	1,00	0,41	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

Test deTukey HSD; variable Productividad de biomasa (g L-1 día-1) (día 1 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,0015, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
N mM	Ac mM	0,15	0,16	0,17	0,09	0,09	0,23	0,08	0,09	0,08	0,10	0,12	0,14	
1	0	5		1,000	0,689	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,148	0,910
2	0	10	1,000		0,975	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,517
3	0	20	0,689	0,975		0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,056
4	0,97	5	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,969	1,000	0,921	1,000	0,180	0,007
5	0,97	10	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,999	1,000	0,995	0,997	0,070	0,002
6	0,97	20	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,000	0,000	0,000	0,969	0,999	0,000		1,000	1,000	0,806	0,011	0,000
8	1,94	10	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000		0,996	0,996	0,065	0,002
9	1,94	20	0,000	0,000	0,000	0,921	0,995	0,000	1,000	0,996		0,689	0,007	0,000
10	2,78	5	0,001	0,000	0,000	1,000	0,997	0,000	0,806	0,996	0,689		0,394	0,021
11	2,78	10	0,148	0,033	0,002	0,180	0,070	0,000	0,011	0,065	0,007	0,394		0,921
12	2,78	20	0,910	0,517	0,056	0,007	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,021	0,921	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 1 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados=15,257, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
N mM	Ac mM	21,81	23,66	26,10	18,87	19,16	34,88	19,16	20,58	17,38	15,69	21,97	22,42	
1	0	5		0,997	0,531	0,912	0,954	0,000	0,954	1,000	0,484	0,112	1,000	1,000
2	0	10	0,997		0,974	0,375	0,462	0,000	0,461	0,884	0,094	0,013	0,999	1,000
3	0	20	0,531	0,974		0,033	0,046	0,005	0,046	0,201	0,005	0,001	0,585	0,728
4	0,97	5	0,912	0,375	0,033		1,000	0,000	1,000	0,999	1,000	0,864	0,881	0,768
5	0,97	10	0,954	0,462	0,046	1,000		0,000	1,000	1,000	0,998	0,790	0,933	0,846
6	0,97	20	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,954	0,461	0,046	1,000	1,000	0,000		1,000	0,998	0,791	0,932	0,845
8	1,94	10	1,000	0,884	0,201	0,999	1,000	0,000	1,000		0,860	0,348	1,000	0,997
9	1,94	20	0,484	0,094	0,005	1,000	0,998	0,000	0,998	0,860		0,999	0,433	0,308
10	2,78	5	0,112	0,013	0,001	0,864	0,790	0,000	0,791	0,348	0,999		0,094	0,058
11	2,78	10	1,000	0,999	0,585	0,881	0,933	0,000	0,932	1,000	0,433	0,094		1,000
12	2,78	20	1,000	1,000	0,728	0,768	0,846	0,000	0,845	0,997	0,308	0,058	1,000	

Test deTukey HSD; variable Clorofila mg/L) (día 1 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 26,389 Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	15,88	11,53	18,26	23,01	28,93	31,68	19,99	21,08	22,70	20,20	24,66	43,53
1	0	5		0,995	1,000	0,851	0,137	0,035	0,997	0,979	0,882	0,995	0,632	0,000
2	0	10	0,995		0,891	0,267	0,015	0,003	0,678	0,516	0,301	0,647	0,132	0,000
3	0	20	1,000	0,891		0,990	0,362	0,116	1,000	1,000	0,994	1,000	0,919	0,000
4	0,97	5	0,851	0,267	0,990		0,950	0,649	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,003
5	0,97	10	0,137	0,015	0,362	0,950		1,000	0,608	0,765	0,931	0,640	0,996	0,065
6	0,97	20	0,035	0,003	0,116	0,649	1,000		0,246	0,371	0,603	0,268	0,863	0,231
7	1,94	5	0,997	0,678	1,000	1,000	0,608	0,246		1,000	1,000	1,000	0,991	0,001
8	1,94	10	0,979	0,516	1,000	1,000	0,765	0,371	1,000		1,000	1,000	0,999	0,001
9	1,94	20	0,882	0,301	0,994	1,000	0,931	0,603	1,000	1,000		1,000	1,000	0,002
10	2,78	5	0,995	0,647	1,000	1,000	0,640	0,268	1,000	1,000	1,000		0,994	0,001
11	2,78	10	0,632	0,132	0,919	1,000	0,996	0,863	0,991	0,999	1,000	0,994		0,007
12	2,78	20	0,000	0,000	0,000	0,003	0,065	0,231	0,001	0,001	0,002	0,001	0,007	

Tabla G12. Interacciones día 2 para productividad y clorofila.

Tukey HSD test; variable Productividad biomasa (g L-1 día-1) (día 2 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00237, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,16	0,17	0,19	0,15	0,19	0,30	0,13	0,12	0,15	0,17	0,25	0,40
1	0	5		1,000	1,000	1,000	1,000	0,072	0,999	0,993	1,000	1,000	0,533	0,000
2	0	10	1,000		1,000	1,000	1,000	0,115	0,995	0,970	1,000	1,000	0,678	0,001
3	0	20	1,000	1,000		0,994	1,000	0,263	0,928	0,823	0,999	1,000	0,906	0,001
4	0,97	5	1,000	1,000	0,994		0,995	0,033	1,000	1,000	1,000	1,000	0,327	0,000
5	0,97	10	1,000	1,000	1,000	0,995		0,252	0,936	0,836	0,999	1,000	0,897	0,001
6	0,97	20	0,072	0,115	0,263	0,033	0,252		0,012	0,006	0,046	0,087	0,985	0,415
7	1,94	5	0,999	0,995	0,928	1,000	0,936	0,012		1,000	1,000	0,998	0,152	0,000
8	1,94	10	0,993	0,970	0,823	1,000	0,836	0,006	1,000		0,999	0,987	0,090	0,000
9	1,94	20	1,000	1,000	0,999	1,000	0,999	0,046	1,000	0,999		1,000	0,410	0,000
10	2,78	5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,087	0,998	0,987	1,000		0,593	0,000
11	2,78	10	0,533	0,678	0,906	0,327	0,897	0,985	0,152	0,090	0,410	0,593		0,047
12	2,78	20	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,415	0,000	0,000	0,000	0,000	0,047	

Test deTukey HSD; variable Productividad de biomasa (g L-1 día-1)(día2 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados= ,00165, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,19	0,22	0,22	0,17	0,26	0,35	0,20	0,29	0,40	0,21	0,20	0,29
1	0	5		0,999 7	0,998 3	1,000 0	0,657 7	0,002 7	1,000 0	0,218 7	0,000 2	0,9999	1,000 0	0,2075
2	0	10	0,999 7		1,000 0	0,971 6	0,973 1	0,015 8	1,000 0	0,632 7	0,000 5	1,0000	1,000 0	0,6137
3	0	20	0,998 3	1,000 0		0,940 9	0,989 3	0,022 3	1,000 0	0,724 8	0,000 6	1,0000	1,000 0	0,7069
4	0,97	5	1,000 0	0,971 6	0,940 9		0,340 1	0,000 8	0,997 4	0,079 1	0,000 2	0,9832	0,999 0	0,0742
5	0,97	10	0,657 7	0,973 1	0,989 3	0,340 1		0,226 4	0,881 6	0,999 5	0,008 1	0,9572	0,837 8	0,9992
6	0,97	20	0,002 7	0,015 8	0,022 3	0,000 8	0,226 4		0,007 2	0,670 2	0,900 7	0,0128	0,005 7	0,6886
7	1,94	5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,997 4	0,881 6	0,007 2		0,422 4	0,000 3	1,0000	1,000 0	0,4052
8	1,94	10	0,218 7	0,632 7	0,724 8	0,079 1	0,999 5	0,670 2	0,422 4		0,049 6	0,5758	0,366 5	1,0000
9	1,94	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,900	0,000	0,049		0,0004	0,000	0,0529

			2	5	6	2	1	7	3	6			2	
10	2,78	5	0,999 9	1,000 0	1,000 0	0,983 2	0,957 2	0,012 8	1,000 0	0,575 8	0,000 4		1,000 0	0,5568
11	2,78	10	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,999 0	0,837 8	0,005 7	1,000 0	0,366 5	0,000 2	1,0000		0,3505
12	2,78	20	0,207 5	0,613 7	0,706 9	0,074 2	0,999 2	0,688 6	0,405 2	1,000 0	0,052 9	0,5568	0,350 5	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 2 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 28,750, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	15,32	19,18	21,85	23,65	26,83	49,87	26,37	25,83	27,69	25,26	26,89	33,56
1	0	5		0,999	0,929	0,747	0,318	0,000	0,372	0,442	0,231	0,521	0,312	0,014
2	0	10	0,999		1,000	0,996	0,830	0,000	0,877	0,921	0,724	0,955	0,823	0,098
3	0	20	0,929	1,000		1,000	0,989	0,000	0,995	0,998	0,966	1,000	0,988	0,296
4	0,97	5	0,747	0,996	1,000		1,000	0,000	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	0,524
5	0,97	10	0,318	0,830	0,989	1,000		0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,915
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001		0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,039
7	1,94	5	0,372	0,877	0,995	1,000	1,000	0,001		1,000	1,000	1,000	1,000	0,876
8	1,94	10	0,442	0,921	0,998	1,000	1,000	0,001	1,000		1,000	1,000	1,000	0,820
9	1,94	20	0,231	0,724	0,966	0,998	1,000	0,002	1,000	1,000		1,000	1,000	0,964
10	2,78	5	0,521	0,955	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000		1,000	0,750
11	2,78	10	0,312	0,823	0,988	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000		0,919
12	2,78	20	0,014	0,098	0,296	0,524	0,915	0,039	0,876	0,820	0,964	0,750	0,919	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 2 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados=25,114, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	16,59	17,11	16,67	31,50	28,66	40,54	34,94	27,25	35,25	30,52	25,32	30,80
1	0	5		1,000	1,000	0,046	0,185	0,000	0,007	0,330	0,006	0,077	0,606	0,066
2	0	10	1,000		1,000	0,061	0,232	0,000	0,009	0,398	0,008	0,100	0,686	0,087
3	0	20	1,000	1,000		0,048	0,192	0,000	0,007	0,340	0,006	0,080	0,619	0,069
4	0,97	5	0,046	0,061	0,048		1,000	0,558	0,999	0,995	0,998	1,000	0,923	1,000
5	0,97	10	0,185	0,232	0,192	1,000		0,201	0,916	1,000	0,889	1,000	0,999	1,000
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,558	0,201		0,959	0,105	0,972	0,413	0,039	0,453
7	1,94	5	0,007	0,009	0,007	0,999	0,916	0,959		0,760	1,000	0,993	0,471	0,996
8	1,94	10	0,330	0,398	0,340	0,995	1,000	0,105	0,760		0,716	0,999	1,000	0,999
9	1,94	20	0,006	0,008	0,006	0,998	0,889	0,972	1,000	0,716		0,988	0,426	0,992
10	2,78	5	0,077	0,100	0,080	1,000	1,000	0,413	0,993	0,999	0,988		0,975	1,000
11	2,78	10	0,606	0,686	0,619	0,923	0,999	0,039	0,471	1,000	0,426	0,975		0,965
12	2,78	20	0,066	0,087	0,069	1,000	1,000	0,453	0,996	0,999	0,992	1,000	0,965	

Tabla G13. Interacciones día 3 para productividad y clorofila.

Tukey HSD test; variable Productividad biomasa (g L-1 día-1) (día 3 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00095, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,19	0,19	0,24	0,20	0,24	0,48	0,20	0,23	0,31	0,15	0,11	0,11
1	0	5		1,000	0,642	1,000	0,683	0,000	1,000	0,911	0,005	0,920	0,118	0,121
2	0	10	1,000		0,658	1,000	0,699	0,000	1,000	0,920	0,006	0,911	0,112	0,115
3	0	20	0,642	0,658		0,928	1,000	0,000	0,888	1,000	0,378	0,051	0,001	0,001
4	0,97	5	1,000	1,000	0,928		0,946	0,000	1,000	0,997	0,021	0,625	0,035	0,036
5	0,97	10	0,683	0,699	1,000	0,946		0,000	0,911	1,000	0,343	0,059	0,001	0,001
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	1,000	1,000	0,888	1,000	0,911	0,000		0,993	0,016	0,699	0,045	0,047
8	1,94	10	0,911	0,920	1,000	0,997	1,000	0,000	0,993		0,156	0,149	0,004	0,004
9	1,94	20	0,005	0,006	0,378	0,021	0,343	0,000	0,016	0,156		0,000	0,000	0,000
10	2,78	5	0,920	0,911	0,051	0,625	0,059	0,000	0,699	0,149	0,000		0,866	0,872
11	2,78	10	0,118	0,112	0,001	0,035	0,001	0,000	0,045	0,004	0,000	0,866		1,000
12	2,78	20	0,121	0,115	0,001	0,036	0,001	0,000	0,047	0,004	0,000	0,872	1,000	

Test deTukey HSD; variable Productividad de biomasa (g L-1 día-1) (día 3 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00060, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,20	0,21	0,25	0,18	0,22	0,49	0,23	0,17	0,27	0,15	0,13	0,09
1	0	5		1,000	0,361	0,999	0,976	0,000	0,941	0,888	0,055	0,464	0,099	0,001
2	0	10	1,000		0,760	0,927	1,000	0,000	1,000	0,515	0,204	0,161	0,024	0,000
3	0	20	0,361	0,760		0,081	0,974	0,000	0,992	0,015	0,996	0,003	0,000	0,000
4	0,97	5	0,999	0,927	0,081		0,630	0,000	0,515	1,000	0,008	0,917	0,416	0,008
5	0,97	10	0,976	1,000	0,974	0,630		0,000	1,000	0,210	0,505	0,048	0,006	0,000
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,941	1,000	0,992	0,515	1,000	0,000		0,151	0,619	0,032	0,004	0,000
8	1,94	10	0,888	0,515	0,015	1,000	0,210	0,000	0,151		0,001	1,000	0,867	0,045
9	1,94	20	0,055	0,204	0,996	0,008	0,505	0,000	0,619	0,001		0,000	0,000	0,000
10	2,78	5	0,464	0,161	0,003	0,917	0,048	0,000	0,032	1,000	0,000		0,998	0,198
11	2,78	10	0,099	0,024	0,000	0,416	0,006	0,000	0,004	0,867	0,000	0,998		0,692
12	2,78	20	0,001	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,045	0,000	0,198	0,692	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 3 en la mañana)														
Probabilidades aploximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados=25,114, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	36,13	27,77	24,89	35,26	46,82	53,27	49,49	33,46	52,46	29,56	30,60	35,58
1	0	5		0,540	0,166	1,000	0,215	0,005	0,053	1,000	0,009	0,823	0,932	1,000
2	0	10	0,540		1,000	0,685	0,002	0,000	0,000	0,919	0,000	1,000	1,000	0,633
3	0	20	0,166	1,000		0,249	0,000	0,000	0,000	0,505	0,000	0,978	0,918	0,216
4	0,97	5	1,000	0,685	0,249		0,141	0,003	0,032	1,000	0,005	0,918	0,978	1,000
5	0,97	10	0,215	0,002	0,000	0,141		0,838	1,000	0,053	0,923	0,005	0,009	0,165
6	0,97	20	0,005	0,000	0,000	0,003	0,838		0,996	0,001	1,000	0,000	0,000	0,004
7	1,94	5	0,053	0,000	0,000	0,032	1,000	0,996		0,011	1,000	0,001	0,002	0,038
8	1,94	10	1,000	0,919	0,505	1,000	0,053	0,001	0,011		0,002	0,995	1,000	1,000
9	1,94	20	0,009	0,000	0,000	0,005	0,923	1,000	1,000	0,002		0,000	0,000	0,006
10	2,78	5	0,823	1,000	0,978	0,918	0,005	0,000	0,001	0,995	0,000		1,000	0,888
11	2,78	10	0,932	1,000	0,918	0,978	0,009	0,000	0,002	1,000	0,000	1,000		0,966
12	2,78	20	1,000	0,633	0,216	1,000	0,165	0,004	0,038	1,000	0,006	0,888	0,966	

Test deTukey HSD; variable Clorofila mg/L(día 3 en la tarde)

Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados=15,257, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	18,63	19,05	18,83	16,57	20,77	42,71	19,53	20,79	18,43	22,07	22,35	27,80
1	0	5		1,000	1,000	0,998	0,997	0,000	1,000	0,997	1,000	0,915	0,867	0,017
2	0	10	1,000		1,000	0,991	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,963	0,934	0,026
3	0	20	1,000	1,000		0,996	0,999	0,000	1,000	0,999	1,000	0,942	0,903	0,021
4	0,97	5	0,998	0,991	0,996		0,762	0,000	0,967	0,757	0,999	0,410	0,341	0,002
5	0,97	10	0,997	1,000	0,999	0,762		0,000	1,000	1,000	0,995	1,000	1,000	0,129
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	0,000		1,000	1,000	0,990	0,977	0,041
8	1,94	10	0,997	1,000	0,999	0,757	1,000	0,000	1,000		0,994	1,000	1,000	0,132
9	1,94	20	1,000	1,000	1,000	0,999	0,995	0,000	1,000	0,994		0,884	0,828	0,014
10	2,78	5	0,915	0,963	0,942	0,410	1,000	0,000	0,990	1,000	0,884		1,000	0,352
11	2,78	10	0,867	0,934	0,903	0,341	1,000	0,000	0,977	1,000	0,828	1,000		0,422
12	2,78	20	0,017	0,026	0,021	0,002	0,129	0,000	0,041	0,132	0,014	0,352	0,422	

Tabla G14. Interacciones día 4 para productividad y clorofila.

Tukey HSD test; variable Productividad biomasa (g L-1 día-1) (día 4 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00091, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,19	0,21	0,24	0,18	0,22	0,49	0,23	0,14	0,23	0,11	0,13	0,16
1	0	5		0,999	0,544	1,000	0,969	0,000	0,782	0,679	0,884	0,164	0,569	0,969
2	0	10	0,999		0,959	0,995	1,000	0,000	0,997	0,209	1,000	0,027	0,152	0,578
3	0	20	0,544	0,959		0,437	0,998	0,000	1,000	0,012	1,000	0,001	0,008	0,057
4	0,97	5	1,000	0,995	0,437		0,930	0,000	0,679	0,782	0,803	0,224	0,679	0,989
5	0,97	10	0,969	1,000	0,998	0,930		0,000	1,000	0,089	1,000	0,010	0,062	0,320
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,782	0,997	1,000	0,679	1,000	0,000		0,029	1,000	0,003	0,019	0,127
8	1,94	10	0,679	0,209	0,012	0,782	0,089	0,000	0,029		0,046	0,996	1,000	1,000
9	1,94	20	0,884	1,000	1,000	0,803	1,000	0,000	1,000	0,046		0,005	0,032	0,190
10	2,78	5	0,164	0,027	0,001	0,224	0,010	0,000	0,003	0,996	0,005		0,999	0,849
11	2,78	10	0,569	0,152	0,008	0,679	0,062	0,000	0,019	1,000	0,032	0,999		0,999
12	2,78	20	0,969	0,578	0,057	0,989	0,320	0,000	0,127	1,000	0,190	0,849	0,999	

Test deTukey HSD; variable Productividad de biomasa (g L-1 día-1)(día 4 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00082, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N mM	Ac mM	0,23	0,25	0,27	0,24	0,24	0,64	0,27	0,15	0,32	0,17	0,16	0,17
1	0	5		0,999	0,813	1,000	1,000	0,000	0,784	0,084	0,050	0,295	0,191	0,344
2	0	10	0,999		0,998	1,000	1,000	0,000	0,996	0,013	0,257	0,061	0,035	0,075
3	0	20	0,813	0,998		0,932	0,978	0,000	1,000	0,001	0,791	0,007	0,004	0,009
4	0,97	5	1,000	1,000	0,932		1,000	0,000	0,915	0,045	0,094	0,177	0,109	0,211
5	0,97	10	1,000	1,000	0,978	1,000		0,000	0,970	0,027	0,147	0,115	0,068	0,139
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,784	0,996	1,000	0,915	0,970	0,000		0,001	0,821	0,006	0,003	0,008
8	1,94	10	0,084	0,013	0,001	0,045	0,027	0,000	0,001		0,000	1,000	1,000	1,000
9	1,94	20	0,050	0,257	0,791	0,094	0,147	0,000	0,821	0,000		0,000	0,000	0,000
10	2,78	5	0,295	0,061	0,007	0,177	0,115	0,000	0,006	1,000	0,000		1,000	1,000
11	2,78	10	0,191	0,035	0,004	0,109	0,068	0,000	0,003	1,000	0,000	1,000		1,000
12	2,78	20	0,344	0,075	0,009	0,211	0,139	0,000	0,008	1,000	0,000	1,000	1,000	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 4 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 26,184, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
N mM	Ac mM	17,08	16,95	18,70	19,04	28,06	49,00	23,16	34,22	34,06	22,22	33,54	47,42	
1	0	5		1,000	1,000	1,000	0,319	0,000	0,939	0,017	0,018	0,981	0,024	0,000
2	0	10	1,000		1,000	1,000	0,303	0,000	0,930	0,015	0,017	0,977	0,022	0,000
3	0	20	1,000	1,000		1,000	0,540	0,000	0,994	0,040	0,043	0,999	0,056	0,000
4	0,97	5	1,000	1,000	1,000		0,590	0,000	0,997	0,047	0,051	1,000	0,067	0,000
5	0,97	10	0,319	0,303	0,540	0,590		0,002	0,986	0,934	0,944	0,953	0,969	0,005
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002		0,000	0,058	0,053	0,000	0,041	1,000
7	1,94	5	0,939	0,930	0,994	0,997	0,986	0,000		0,309	0,329	1,000	0,394	0,000
8	1,94	10	0,017	0,015	0,040	0,047	0,934	0,058	0,309		1,000	0,213	1,000	0,125
9	1,94	20	0,018	0,017	0,043	0,051	0,944	0,053	0,329	1,000		0,228	1,000	0,116
10	2,78	5	0,981	0,977	0,999	1,000	0,953	0,000	1,000	0,213	0,228		0,280	0,000
11	2,78	10	0,024	0,022	0,056	0,067	0,969	0,041	0,394	1,000	1,000	0,280		0,091
12	2,78	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	1,000	0,000	0,125	0,116	0,000	0,091	

Test deTukey HSD; variable Clorofila mg/L) (día 4 en la tarde)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 48,028, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
N mM	Ac mM	16,73	24,29	19,75	36,04	34,57	47,17	39,57	35,39	41,29	38,74	23,39	30,77	
1	0	5		0,965	1,000	0,075	0,127	0,001	0,019	0,095	0,010	0,027	0,986	0,395
2	0	10	0,965		0,999	0,643	0,794	0,019	0,284	0,713	0,168	0,357	1,000	0,989
3	0	20	1,000	0,999		0,210	0,323	0,003	0,063	0,256	0,032	0,085	1,000	0,721
4	0,97	5	0,075	0,643	0,210		1,000	0,710	1,000	1,000	0,998	1,000	0,541	0,998
5	0,97	10	0,127	0,794	0,323	1,000		0,549	0,999	1,000	0,985	1,000	0,703	1,000
6	0,97	20	0,001	0,019	0,003	0,710	0,549		0,964	0,639	0,995	0,930	0,013	0,203
7	1,94	5	0,019	0,284	0,063	1,000	0,999	0,964		1,000	1,000	1,000	0,217	0,909
8	1,94	10	0,095	0,713	0,256	1,000	1,000	0,639	1,000		0,995	1,000	0,614	0,999
9	1,94	20	0,010	0,168	0,032	0,998	0,985	0,995	1,000	0,995		1,000	0,124	0,772
10	2,78	5	0,027	0,357	0,085	1,000	1,000	0,930	1,000	1,000	1,000		0,278	0,951
11	2,78	10	0,986	1,000	1,000	0,541	0,703	0,013	0,217	0,614	0,124	0,278		0,970
12	2,78	20	0,395	0,989	0,721	0,998	1,000	0,203	0,909	0,999	0,772	0,951	0,970	

Tabla G15. Interacciones día 5 para productividad y clorofila.

Tukey HSD test; variable Productividad biomasa (g L-1 día-1) (día 5 en la mañana)														
Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc														
Error: Entre Media de cuadrados = 0,00074, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
N mM	Ac mM	0,23	0,24	0,26	0,25	0,24	0,58	0,28	0,15	0,28	0,18	0,17	0,24	
1	0	5		1,000	0,936	1,000	1,000	0,000	0,446	0,041	0,403	0,429	0,339	1,000
2	0	10	1,000		0,986	1,000	1,000	0,000	0,622	0,022	0,575	0,281	0,213	1,000
3	0	20	0,936	0,986		1,000	0,991	0,000	0,998	0,001	0,996	0,027	0,019	0,998
4	0,97	5	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,869	0,008	0,836	0,126	0,091	1,000
5	0,97	10	1,000	1,000	0,991	1,000		0,000	0,669	0,019	0,622	0,248	0,187	1,000
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,446	0,622	0,998	0,869	0,669	0,000		0,000	1,000	0,003	0,002	0,774
8	1,94	10	0,041	0,022	0,001	0,008	0,019	0,000	0,000		0,000	0,975	0,991	0,012
9	1,94	20	0,403	0,575	0,996	0,836	0,622	0,000	1,000	0,000		0,003	0,002	0,732

10	2,78	5	0,429	0,281	0,027	0,126	0,248	0,000	0,003	0,975	0,003		1,000	0,182
11	2,78	10	0,339	0,213	0,019	0,091	0,187	0,000	0,002	0,991	0,002	1,000		0,134
12	2,78	20	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	0,000	0,774	0,012	0,732	0,182	0,134	
Test deTukey HSD; variable Productividad de biomasa (g L-1 día-1)(día 5 en la tarde) Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc Error: Entre Media de cuadrados = 0,00139, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	N mM	Ac mM	0,27	0,29	0,28	0,25	0,28	0,69	0,28	0,16	0,29	0,17	0,17	0,23
1	0	5		1,000	1,000	0,999	1,000	0,000	1,000	0,052	1,000	0,070	0,085	0,981
2	0	10	1,000		1,000	0,961	1,000	0,000	1,000	0,016	1,000	0,022	0,028	0,827
3	0	20	1,000	1,000		0,993	1,000	0,000	1,000	0,030	1,000	0,041	0,050	0,933
4	0,97	5	0,999	0,961	0,993		0,996	0,000	0,991	0,258	0,942	0,324	0,375	1,000
5	0,97	10	1,000	1,000	1,000	0,996		0,000	1,000	0,036	1,000	0,049	0,061	0,954
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	1,000	1,000	1,000	0,991	1,000	0,000		0,028	1,000	0,038	0,047	0,923
8	1,94	10	0,052	0,016	0,030	0,258	0,036	0,000	0,028		0,013	1,000	1,000	0,462
9	1,94	20	1,000	1,000	1,000	0,942	1,000	0,000	1,000	0,013		0,018	0,023	0,782
10	2,78	5	0,070	0,022	0,041	0,324	0,049	0,000	0,038	1,000	0,018		1,000	0,550
11	2,78	10	0,085	0,028	0,050	0,375	0,061	0,000	0,047	1,000	0,023	1,000		0,612
12	2,78	20	0,981	0,827	0,933	1,000	0,954	0,000	0,923	0,462	0,782	0,550	0,612	

Test deTukey HSD; variable Clorofila (mg/L) (día 5 en la mañana) Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc Error: Entre Media de cuadrados=15,257, Grados de libertad= 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	N mM	Ac mM	23,24	29,49	27,90	35,83	37,97	51,29	33,62	26,57	51,70	33,05	29,57	27,94
1	0	5		0,714	0,937	0,024	0,005	0,000	0,104	0,995	0,000	0,147	0,699	0,934
2	0	10	0,714		1,000	0,697	0,302	0,000	0,972	0,998	0,000	0,991	1,000	1,000
3	0	20	0,937	1,000		0,394	0,126	0,000	0,807	1,000	0,000	0,888	1,000	1,000
4	0,97	5	0,024	0,697	0,394		1,000	0,003	1,000	0,201	0,002	0,999	0,712	0,399
5	0,97	10	0,005	0,302	0,126	1,000		0,014	0,960	0,053	0,010	0,913	0,314	0,128
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,003	0,014		0,001	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
7	1,94	5	0,104	0,972	0,807	1,000	0,960	0,001		0,557	0,000	1,000	0,975	0,812
8	1,94	10	0,995	0,998	1,000	0,201	0,053	0,000	0,557		0,000	0,670	0,998	1,000
9	1,94	20	0,000	0,000	0,000	0,002	0,010	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000
10	2,78	5	0,147	0,991	0,888	0,999	0,913	0,000	1,000	0,670	0,000		0,992	0,892
11	2,78	10	0,699	1,000	1,000	0,712	0,314	0,000	0,975	0,998	0,000	0,992		1,000
12	2,78	20	0,934	1,000	1,000	0,399	0,128	0,000	0,812	1,000	0,000	0,892	1,000	
Test deTukey HSD; variable Clorofila mg/L)(día 5 en la tarde) Probabilidades aproximadas por el Test Post Hoc Error: Entre Media de cuadrados = 35,607, Grados de libertad = 24														
TRATAMIENTO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	N mM	Ac mM	19,63	23,62	24,79	37,67	49,73	61,51	52,50	32,33	65,52	28,35	32,16	38,58
1	0	5		0,999	0,994	0,041	0,000	0,000	0,000	0,329	0,000	0,808	0,347	0,027
2	0	10	0,999		1,000	0,208	0,001	0,000	0,000	0,809	0,000	0,997	0,826	0,148
3	0	20	0,994	1,000		0,310	0,002	0,000	0,000	0,911	0,000	1,000	0,923	0,228
4	0,97	5	0,041	0,208	0,310		0,399	0,003	0,156	0,992	0,000	0,741	0,990	1,000
5	0,97	10	0,000	0,001	0,002	0,399		0,432	1,000	0,054	0,106	0,009	0,050	0,510
6	0,97	20	0,000	0,000	0,000	0,003	0,432		0,777	0,000	0,999	0,000	0,000	0,004
7	1,94	5	0,000	0,000	0,000	0,156	1,000	0,777		0,015	0,297	0,002	0,014	0,219
8	1,94	10	0,329	0,809	0,911	0,992	0,054	0,000	0,015		0,000	0,999	1,000	0,974
9	1,94	20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,106	0,999	0,297	0,000		0,000	0,000	0,001
10	2,78	5	0,808	0,997	1,000	0,741	0,009	0,000	0,002	0,999	0,000		1,000	0,627
11	2,78	10	0,347	0,826	0,923	0,990	0,050	0,000	0,014	1,000	0,000	1,000		0,968
12	2,78	20	0,027	0,148	0,228	1,000	0,510	0,004	0,219	0,974	0,001	0,627	0,968	