

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO EN EL  
RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR  
A ESCALA LABORATORIO

FRANCY TATIANA PEÑA TRILLOS  
EUSEBIO JOSÉ OROZCO CERA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2010

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO EN EL  
RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR  
A ESCALA LABORATORIO

FRANCY TATIANA PEÑA TRILLOS  
EUSEBIO JOSÉ OROZCO CERA

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

Director  
Ph.D Viatcheslav Kafarov

Co-director  
Biólogo. Andrés Fernando Barajas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2010

*Dedico este logro a Dios  
Por darme tantas bendiciones  
Y llenarme de su sabiduría.*

*A mis padres por su apoyo, esfuerzo  
Y perseverancia en este largo camino.*

*A mis hermanos por sus consejos  
Y el apoyo moral en la  
Trayectoria de este recorrido,  
Sin ellos hubiese sido imposible lograrlo.*

*A mi novio por su solidaridad, apoyo  
Y respaldo en muchos momentos difíciles.*

*A mis amigos y a todas las personas,  
Que de una u otra manera contribuyeron  
A la obtención de este nuevo logro.*

*TATIANA*

*Mi tesis la dedico con toda mi voluntad y disposición.  
Al Deus Sol Invictus por darme la oportunidad de disminuir  
la entropía local todos estos largos años.  
A mis padres Rosita y Jesús que me dieron la vida y han estado  
apoyándome desde siempre y para siempre; me enseñaron que  
no hay meta suficiente alta para aquellos llenos de fe y  
esperanzas en un futuro mejor.  
A mis hermanos Humberto (el vato), Efraín (el ángel del cielo),  
Karen (Karenchuu), José Gregorio (el gollo) y todos mis demás  
hermanos y hermanas que siempre tendré presentes y siempre  
llevaré en mi mente.  
A mis amigos de toda la vida que no solo me acompañaron en  
estos últimos años sino que siempre me brindaron respeto y  
confianza, cosas que no tienen precio y sabré nunca olvidar.  
A todos aquellos que colaboraron a que este humilde servidor  
lograra un paso más en su corta vida y además me enseñaron  
que el éxito es inevitable...*

*El pasado solo sirve para dos cosas: planificar el futuro y aprender a no  
desperdiciar el presente*

*Eusebio José Orozco Cera*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios, puesto que gracias a él tenemos la oportunidad de cumplir con uno de nuestros sueños, y sabemos que él será artífice de cada uno de los logros que alcancemos de hoy en adelante.

A nuestros padres por su amor y apoyo incondicional en este sueño.

Al profesor Viatcheslav Kafarov por su grandiosa colaboración en la culminación de este proyecto, al Biólogo Andrés Fernando Barajas, por su entrega, amistad y ayuda incondicional guiando y orientando nuestro trabajo.

A la escuela de Ingeniería Química y a todas las personas que hacen parte de ella, Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por su aporte económico y al Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), por su colaboración y apoyo en este proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel; código 2008D32006-6710.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	18
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	20
<b>1.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DEL CRECIMIENTO</b>	20
1.1.1 Crecimiento celular	20
<b>1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO</b>	21
1.2.1 Efecto de la temperatura	21
1.2.2 Efectos del pH	21
1.2.3 Efecto de la concentración de sustrato	21
1.2.4 Efecto de la concentración alta de sustrato o de producto	24
<b>1.3 PARÁMETROS DE CULTIVO</b>	26
1.3.1 Nutrientes	26
1.3.2 Luz	27
1.3.3 Salinidad	27
1.3.4 Agitación o mezclado	27
<b>2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	28
<b>2.1 DEFINICIÓN DEL TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL ETAPA 1</b>	28
2.1.1 Variable dependiente	28
2.1.2 Variable independiente	28
2.1.3 Niveles del factor	29
2.1.4 Medida de variable dependiente	29
2.1.5 Numero de replicas	29
2.1.6 Aleatorización	29
<b>2.2 SELECCIÓN TIPO DE DISEÑO ESTADÍSTICO</b>	30
2.2.1 Modelo experimento estadísticamente diseñado	30
<b>2.3 DETERMINACIÓN DEL COMPONENTE MAS EFECTIVO ENTRE NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL SUSTRATO BOLD ETAPA 3</b>	31

2.3.1 Variable dependiente	31
2.3.2 Variable independiente	31
2.3.3 Niveles de los factores:	31
2.3.4 Medida de variable dependiente:	31
2.3.5 Número de replicas:	31
2.4 SELECCIÓN TIPO DE DISEÑO ESTADÍSTICO	32
2.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA EXPERIMENTACIÓN	33
2.6 ASPECTOS GENERALES PARA LAS ETAPAS EXPERIMENTALES	34
2.6.1 Materiales	34
2.6.2 Caracterización	34
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	36
3.1 DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO OPTIMO DE 3 TIPOS DE MEDIOS DISPONIBLES EN LABORATORIO ETAPA 1	36
3.1.1 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 1	36
3.1.2 Determinación $\mu$ medio Peptona etapa 1	37
3.1.3 Determinación $\mu$ medio Watanabe etapa 1	37
3.2 ANÁLISIS DE DATOS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL	39
3.3 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA LOS 2 MEDIOS SELECCIONADOS ETAPA 2	39
3.3.1 Determinación $\mu$ medio Bold	40
3.3.2 Determinación $\mu$ medio Watanabe	40
3.4 DETERMINACIÓN DEL COMPONENTE MAS EFECTIVO ENTRE NITRÓGENO(N) Y FÓSFORO (P) EN EL SUSTRATO BOLD ETAPA 3	41
3.4.1 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 5N 5P	41
3.4.2 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 5N 10P	42
3.4.3 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 10N 5P	42
3.4.4 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 10N 10P	43
3.4.5 Aplicación la metodología estándar para el análisis de un diseño 2 <sup>2</sup>	43
3.5 APRECIACIONES RESPECTO A LOS MEDIOS ESTUDIADOS	44
3.5.1 Bold basal	44
3.5.2 Peptona	45
3.5.3 Watanabe	45
4. CONCLUSIONES	46
5. RECOMENDACIONES	47

**BIBLIOGRAFÍA**

**48**

**ANEXOS**

**51**

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1 Efecto de la concentración de sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2 Fases del crecimiento celular</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3 Diagrama general del proceso</b>	<b>33</b>
<b>Figura 4 [ ] vs t para medio Bold Basal original</b>	<b>21</b>
<b>Figura 5 [ ] vs t para medio Bold Basal replica</b>	<b>36</b>
<b>Figura 6 [ ] vs t para medio Peptona original</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7 [ ] vs t para medio Peptona original</b>	<b>37</b>
<b>Figura 8 [ ] vs t para medio Watanabe original</b>	<b>22</b>
<b>Figura 9 [ ] vs t para medio Watanabe replica</b>	<b>37</b>
<b>Figura 10 [ ] vs t para medio Bold Basal Etapa 2</b>	<b>40</b>
<b>Figura 11 [ ] vs t para medio Watanabe Etapa 2</b>	<b>40</b>
<b>Figura 12 [ ] vs t tratamiento 5N5P original</b>	<b>26</b>
<b>Figura 13 [ ] vs t tratamiento 5N5P replica</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14 [ ] vs t tratamiento 5N10P original</b>	<b>27</b>
<b>Figura 15 [ ] vs t tratamiento 5N10P replica</b>	<b>42</b>
<b>Figura 16 [ ] vs t tratamiento 10N5P original</b>	<b>27</b>
<b>Figura 17 [ ] vs t tratamiento 10N5P replica</b>	<b>42</b>
<b>Figura 18 [ ] vs t tratamiento 10N10P original</b>	<b>28</b>
<b>Figura 19 [ ] vs t tratamiento 10N10P replica</b>	<b>43</b>
<b>Figura 20 Diagrama de Pareto preliminar datos etapa 3</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABLA

	Pág.
<b>Tabla 1 Requerimientos principales de cultivos de microalgas</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 2 Modelo experimento unifactorial aleatorio</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 3 Modelo experimento factorial</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 4 Resumen niveles estequiometricos modificados</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5 Resumen De Las Velocidades Especificas De Crecimiento (<math>\mu</math>) determinadas</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 6 Resumen de análisis de varianza</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 7 Resumen Velocidades especificas de crecimiento etapa 3</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 8 Anova resumido datos etapa 3</b>	<b>43</b>

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO B. COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO C. GENERALIDADES ACERCA DE LAS DILUCIONES</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO D. DETERMINACIÓN DE DERIVADAS NUMÉRICAS</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO E. DATOS EXPERIMENTALES</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO F. RESUMEN METODOLOGÍA APLICADA AL CÁLCULO DE LAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO EN ETAPA 1.</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO G: TABLA ANÁLISIS DE DATOS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO H. APLICACIÓN PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO I. CÁLCULOS VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO ZONA EXPONENCIAL ETAPA 2.</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO J. GENERALIDADES SOBRE LA ABSORBANCIA</b>	<b>77</b>

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO EN EL RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE MICROALGAS EN UN FOTOBIOREACTOR A ESCALA LABORATORIO\*

**AUTORES:** Francy Tatiana Peña Trillos,  
Eusebio José Orozco Cera\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Microalgas, Influencia del sustrato, Crecimiento celular, Bold basal, watanabe, peptona, diseño experimental, Chlorella vulgaris.

Considerando la producción de biocombustibles entre otras propiedades atribuidas a Chlorella vulgaris, el presente trabajo tenía como objetivo identificar el medio en el cual esta microalga crece con mayor rapidez. Tres clases diferentes de medios fueron evaluados a escala de laboratorio: Bold basal, Peptona y Watanabe.

La metodología usada en la primera etapa fue seleccionar el medio con la mayor productividad mediante el uso de un diseño unifactorial aleatorio; calculando la velocidad específica de crecimiento usando la medida alternada de las concentraciones de biomasa, y con esta información determinar exhaustivamente el lugar del crecimiento exponencial con lo cual se pudieron comparar los medios.

Posteriormente como una etapa adicional se evaluó el valor de las velocidades específicas de crecimiento para dos medios seleccionados (Bold basal y Watanabe), de los cuales se obtuvieron resultados similares a la primera etapa; estos procedimientos se completaron con un análisis teórico acerca de los tres medios.

Del análisis estadístico se pudo comprobar que los 3 tipos de medios afectan significativamente la productividad de la microalga, verificándose experimental y estadísticamente que el medio Bold basal de los disponibles en el laboratorio es el que presenta mayor productividad presentando una velocidad específica de crecimiento superior a los otros dos medios estudiados.

La etapa final se realizó enfocada a la determinación del componente más efectivo entre nitrógeno(N) y fósforo (P) en el sustrato bold basal, esto mediante un experimento factorial 2<sup>2</sup>, concluyendo estadísticamente la superioridad del efecto en la mejora de la productividad de el componente fósforo (P) contra el componente nitrógeno(N).

Este trabajo fue realizado en el Centro de investigación para el Desarrollo Sostenible de Industria y Energía (CIDES) de la Universidad Industrial del Santander apoyado por el Ministerio de la Agricultura y Desarrollo Rural y el Instituto colombiano del petróleo (ICP-ECOPETROL).

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas Escuela de Ingeniería Química Director Ph.D Viatcheslav Kafarov. Co-director Biólogo. Andrés Fernando Barajas.

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF THE INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF THE SUBSTRATUM IN THE PERFORMANCE OF THE CULTURE OF MICROALGAE IN A FOTOBIORREACTOR TO LABORATORY SCALE \*

**AUTHORS:** Francy Tatiana Peña Trillos,  
Eusebio José Orozco Cera\*\*

**KEY WORDS:** Microalgae, Influence of the substratum, cellular Growth, Bold basal, Watanabe, Peptona, experimental design, Chlorella vulgaris.

Given the production of biocombustibles between other properties attributed to Chlorella vulgaris, the present work had as aim identify the way in which this microalga grows with major rapidity. Three different kinds of culture were evaluated to laboratory scale: basal Bold, Peptona and Watanabe.

The methodology used in the first stage had as aim to select the way with major productivity using a design unifactorial randomized; calculating the specific speed of growth using the measurement alternated of the concentrations of biomass, and with this information to determine exhaustively the place of the exponential growth then to compare the mediums.

Later as an additional stage there was evaluated the value of the specific speeds of growth for two mediums selected (Bold basal and Watanabe), of which there were obtained results similar to the first stage; these procedures were completed by a theoretical analysis it brings over of three mediums.

Of the statistical analysis it was possible to verify that 3 types of substratum affect significantly the productivity of the microalgae, happening experimentally and statistically that the way Bold basal of the available ones in the laboratory is the one that presents major productivity as a specific speed of growth top to other two studied mediums.

The final stage was realized focused on the determination of the most effective component between nitrogen (N) and phosphorus (P) in the substratum bold basal, this by means of an experiment factorial 2<sup>2</sup>, concluding statistically the superiority of the effect in the improvement of the productivity of the component phosphorus (P) against the component nitrogen (N).

This work was performed in the Research Center for Sustainable Development of Industry and Energy (CIDES) of the Universidad Industrial de Santander supported by the Colombian Agriculture and Rural Development Ministry and the Colombian Petroleum Institute (ICP-ECOPETROL).

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas Escuela de Ingeniería Química Director Ph.D Viatcheslav Kafarov. Co-director Biólogo. Andrés Fernando Barajas.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos aptos para captar carbono en forma de CO<sub>2</sub>; son fotoautótrofos con estructura eucariota, capaces de transformar la luz solar en energía química mediante el proceso de fotosíntesis oxigénica; presentan altas tasas de producción, se adaptan a distintas condiciones ambientales y están presentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura. [1]

Los estudios más recientes han encontrado una alta gama de aplicaciones en la producción de compuestos dentro de los cuales se destacan los polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, esteroides, enzimas, antibióticos, productos químicos y farmacéuticos, biocombustibles y en tratamientos de aguas residuales [2], lo cual ha permitido desarrollar varios engranajes que han contribuido con el mejoramiento de vida, de tal manera que los estudios realizados han demostrado eficiencia y usos significativos de estos microorganismos en diferentes sectores.[1]

Debido a que el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las microalgas, depende estrictamente de los medios y componentes que estos contengan como son: N, P, K, Mg, S, Fe, Ca, Zn, Cu, y Mn, existen varios medios de cultivos, que pueden proporcionarle características similares en su crecimiento, pero no las más óptimas, que faciliten su adaptación y reproducción.[3]

El uso de estos microorganismos en los diversos procesos como la obtención de productos químicos, farmacéuticos, biocombustibles y el tratamiento de aguas residuales, ayudan a reducir considerablemente los riesgos de contaminación ambiental, que generan la utilización de otros productos o procesos análogos, y a

la vez permita armonizar la relación existente entre el medio natural y el hombre.[1]

Las algas producen aceites vegetales que se pueden transformar en biodiesel y, al contrario de otros cultivos usados para la producción de biocombustibles, las algas no necesitan extensos terrenos de cultivo, ya que pueden crecer en casi cualquier espacio cerrado y de forma muy rápida, de este modo, podrían desarrollarse en cualquier localización [4,5].

Los lípidos de las microalgas podrían utilizarse en diferentes procesos para la explotación de la energía, incluyendo la combustión simple en caldera o en motores diesel. Sin embargo, el mejor uso posible de este aceite es, sin duda su transformación en biocombustible [6,7], especialmente el biodiesel; la producción de biodiesel y otros biocombustibles a partir de algas podría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, ayudar a la sociedad a lidiar con las futuras carencias de combustibles [8].

Tomando en cuenta estas consideraciones, la Universidad Industrial de Santander y el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) con apoyo del Ministerio Nacional de Agricultura, se encuentran investigando nuevas fuentes de biomasa para la obtención de biocombustibles, con el proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel, código 2008D32006-6710.

El presente trabajo está enfocado al estudio de las mejores condiciones para la producción a escala de laboratorio de la microalga *Chorella vulgaris*, donde se busca optimizar la capacidad de crecimiento, sostenibilidad y desarrollo del cultivo dentro del biorreactor.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DEL CRECIMIENTO

Todos los seres vivos desde el más simple hasta el más complejo, poseen una serie de requerimientos nutricionales para su crecimiento y para llevar a cabo las funciones vitales, estos requieren de una fuente de energía. Algunos organismos utilizan compuestos para obtenerla, por lo que se les conoce como quimiotrofos (*trophé*: “alimentación”, “alimento”) otros utilizan la luz y se les llama fototrofos (*photo*: “luz”).

Una fuente de carbono también es esencial para la síntesis de los componentes celulares, algunos microorganismos utilizan  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono (autótrofos) y otros requieren de compuestos orgánicos como fuente de carbono (heterótrofos).

Asimismo, existen otros elementos indispensables para la vida, ya que son parte de los componentes celulares, como son: el nitrógeno, el oxígeno, el azufre y el fósforo. Estos son obtenidos de diversas fuentes, que van desde compuestos inorgánicos muy simples hasta otros organismos más complejos [9]

#### 1.1.1 Crecimiento celular

El crecimiento celular es un proceso muy complejo de interacción de la célula con el medio ambiente en donde ocurre un aumento de todos los constituyentes químicos del microorganismo, lo cual, genera un aumento en el número de individuos en la población.

Los principales factores que afectan la rapidez de crecimiento son: la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y la inhibición por sustrato o por producto [10].

## **1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO**

### **1.2.1 Efecto de la temperatura**

Las especies más comunes de microalgas cultivadas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto pueda variar con la composición del medio de cultivo y la cantidad cultivada. Un valor intermedio entre 18 y 20°C es el más empleado a menudo; las temperaturas por debajo de 16°C reducirán la velocidad de crecimiento, mientras que aquellas más altas de 35°C son frecuentemente mortales para muchas especies [11].

El aumento de la rapidez de mortalidad (y disminución de  $\mu$ ) a temperaturas altas, se debe principalmente a la desnaturalización térmica de las proteínas, la cual provoca un aumento en el requerimiento energético del mantenimiento celular para mecanismos de reparación. A baja temperaturas, los mecanismos regulatorios de la célula son afectados, además de las limitaciones disfuncionales como el transporte de sustratos hacia y dentro de la célula. Como resultados, la producción de biomasa decae a temperaturas extremas [10].

### **1.2.2 Efectos del pH**

El intervalo de pH para la mayoría de las especies cultivadas de microalgas está entre 7 y 9, la gama óptima normalmente está de 8.2-8.7, aunque haya especies que pueden sobrevivir en ambientes más ácidos o más básicos. Comúnmente una caída completa o interrupción de muchos procesos celulares puede ser debida a un fracaso en el mantenimiento de un pH aceptable. [11]

### **1.2.3 Efecto de la concentración de sustrato**

Jacques Monod (1950) fue el primero en investigar el efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez de crecimiento ( $\mu$ ), algunos términos relacionados con la ecuación de Monod:

**1.2.3.1 La velocidad de crecimiento del microorganismo:** es el aumento en la cantidad de microorganismos por unidad de tiempo. Es proporcional al número de células presente; alcanza un valor máximo y constante siempre y cuando no haya un sustrato que limite su crecimiento; estas características se cumplen cuando el microorganismo se encuentra en su fase logarítmica.

**1.2.3.2 El sustrato limitante (S):** es el sustrato que debido a su concentración va a hacer el que restrinja el crecimiento de los microorganismos. Puede ser la fuente de carbono y energía.

**1.2.3.3 El tiempo de duplicación ( $t_d$ ):** es el tiempo necesario para que las poblaciones de células se dupliquen. Este periodo es constante durante la fase logarítmica.

**1.2.3.4 La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):** es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo. Se mantiene constante durante la fase logarítmica se representa por la pendiente de la línea que simboliza la fase logarítmica.

**1.2.3.5 La velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ):** es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo, en las condiciones en las que está creciendo, esta velocidad es igual a la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , cuando el microorganismo está en la fase logarítmica.

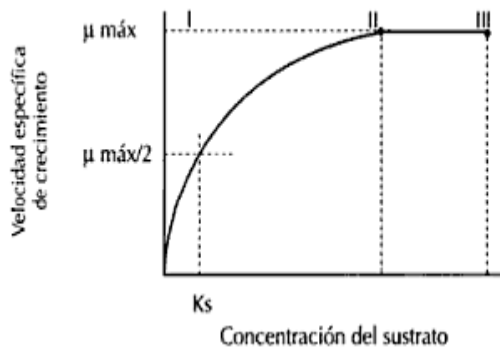
La constante específica de cada sustrato ( $K_s$ ) es la constante de utilización de sustrato limitante y representa la afinidad de los organismos por ese sustrato. La constante  $K_s$  es la concentración del sustrato a la que se producen microorganismos con una velocidad igual a la mitad de la velocidad específica de crecimiento máxima. Si el organismo tiene gran afinidad por el sustrato limitante, el valor de  $K_s$  es bajo.

### 1.2.3.6 Ecuación de Monod

La ecuación de Monod, que se conoce también como el modelo de crecimiento celular, describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la concentración del nutriente limitante (S) en un cultivo microbiano; se representa por la siguiente expresión matemática (ecuación 1):

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{S}{(K_s + S)} \quad (1)$$

Figura 1 Efecto de la concentración de sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento



Con base a la ecuación de monod y al grafico se puede observar:

- ✓ Si la concentración de sustrato limitante (S) es cero, la velocidad específica de crecimiento también lo es.
- ✓ Cuando S es muy grande la velocidad específica de crecimiento tiende a la velocidad máxima. el microorganismo se encuentra en la fase logarítmica, que corresponde a la sección de los puntos I y II (Ver Figura 1).
- ✓ Si por el contrario S es muy pequeña, la velocidad específica de crecimiento depende de S, como se muestra en la sección de la curva entre los puntos I y II [12]

#### **1.2.4 Efecto de la concentración alta de sustrato o de producto**

Si la concentración inicial de sustrato es aumentada a un valor considerablemente más alto que la concentración mínima de saturación, la rapidez de crecimiento puede comenzar a disminuir debido a la inhibición por sustrato. A altas concentraciones de azúcar o sal la inhibición probablemente se debe al alto esfuerzo osmótico impuesto a las células, el cual causa su deshidratación y problemas de difusión.

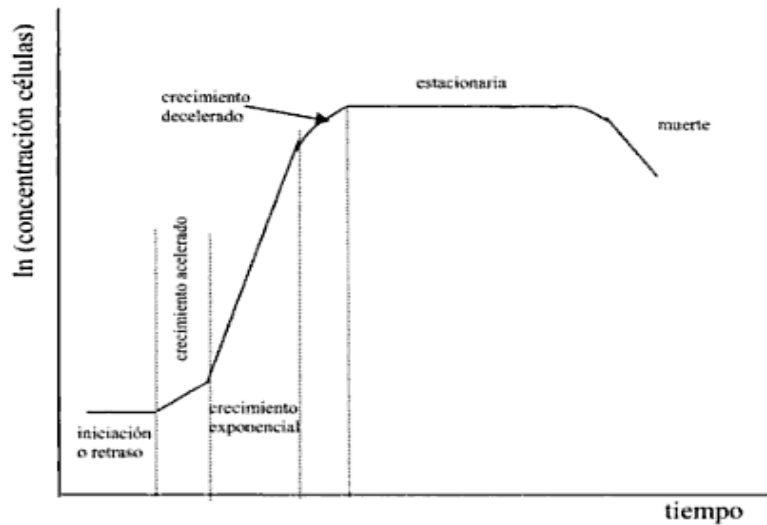
La inhibición del crecimiento a concentraciones bajas de sustrato puede ser el resultado de la inhibición de enzimas metabólicas clave. Algunas veces, el sustrato de crecimiento para algunos organismos es un compuesto tóxico como el fenol, formaldehído, metanol, etc., que apoya el crecimiento a concentraciones bajas, favorece el crecimiento pero se vuelve inhibitorio a concentraciones altas.

El crecimiento de poblaciones microbianas también puede ir acompañado por la formación de productos finales tóxicos que causan la inhibición del crecimiento [10].

El cultivo por lotes, es el modo de operación más simple, esta modalidad de cultivo presenta limitaciones, como la falta de control sobre diversos parámetros del cultivo y el hecho que las células se desarrollan en un estado fisiológico poco definido y cambiante. Es utilizado principalmente en: Sistemas anaerobios, reacciones en fase homogénea.

El proceso de evolución celular se muestra en la figura 2 y puede desglosarse en las siguientes etapas:

Figura 2 Fases del crecimiento celular



1. Inicialmente se produce un proceso de adaptación o fase de retraso en el que no hay crecimiento. Este periodo es más largo, cuanto más dispares son las nuevas condiciones en las que las células deben crecer respecto a las que tenían originalmente. No hay incremento en el número de células, la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) es prácticamente cero.
2. Terminando este periodo se produce una aceleración hasta producirse un crecimiento exponencial de la concentración celular incrementando exponencialmente (primer orden), en ella la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) es máxima y el tiempo de generación es mínimo.
3. Al final de la fase exponencial se llega a una situación estacionaria donde la tasa de crecimiento es cero debido al agotamiento del sustrato, o de algún otro componente necesario para el crecimiento, o debido a la producción de productos inhibidores tóxicos para las células.
4. Finalizada esta etapa se produce la fase de muerte de las células. Se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo [13].

### 1.3 PARÁMETROS DE CULTIVO

Para un alga autótrofa, todo lo que es necesario para el crecimiento es luz, CO<sub>2</sub>, agua, nutrientes y trazas de algunos elementos. Mediante la fotosíntesis, el alga será capaz de sintetizar todos los compuestos bioquímicos necesarios para su crecimiento. Sólo una minoría de algas son sin embargo completamente autotróficas; muchas son incapaces de sintetizar ciertos compuestos bioquímicos (ciertas vitaminas, por ejemplo) y requerirán que estas estén presentes en el medio (algas mixotróficas).

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son la cantidad y la calidad de los nutrientes, la luz, la turbulencia y la salinidad. Los parámetros más óptimos así como las gamas toleradas son valores específicos y varios factores pueden ser interdependientes y un parámetro que es óptimo para unas condiciones no es necesariamente óptimo para otras.

#### 1.3.1 Nutrientes

Tabla 1 Requerimientos principales de cultivos de Microalgas

Requerimientos	Compuestos químicos	Valores
C	CO <sub>2</sub> , CO <sub>3</sub>	g/100 ml
O, H	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	g/100 ml
N	N <sub>2</sub> , NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub>	g/100 ml
P	PO <sub>4</sub>	g/100 ml
S	SO <sub>4</sub>	g/100 ml
Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 ml
Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al, et	Sales	µg/100 ml
Vitaminas	B <sub>12</sub> , Tiamina y Biotina	µg/100 ml

### **1.3.2 Luz**

La luz es la fuente de energía que conduce reacciones fotosintéticas en algas y en cuanto a esto la intensidad, la calidad espectral, y el fotoperíodo tienen que ser considerados. La intensidad de la luz juega un papel importante, pero las exigencias varían enormemente con la profundidad y la densidad del cultivo de algas; en profundidades más grandes y concentraciones de células altas, la intensidad de la luz debe ser aumentada para penetrar por el cultivo. Demasiada intensidad luminosa puede causar la fotoinhibición

La luz puede ser natural o artificial suministrada por tubos fluorescentes que emiten en el espectro azul ó rojo, dado que estos son las partes más activas del espectro de luz para la fotosíntesis. La intensidad de luz y la calidad pueden ser manipuladas con filtros. Muchas especies de microalgas no crecen bien bajo la iluminación constante, aunque el fitoplancton cultivado se ha desarrollado normalmente bajo iluminación constante, o en ciclos luz/oscuridad (el máximo 16:8 LD, o por lo general 14:10 o 12:12).

### **1.3.3 Salinidad**

Las algas de origen Marino son sumamente tolerantes a cambios de salinidad. La mayor parte de las especies se ponen en mayor forma en un medio de salinidad ligeramente inferior al de su hábitat natal, este típicamente es obtenido por dilución del agua de mar con el agua de grifo. Las salinidades de 20-24 g/L son consideradas entre las más óptimas posibles.

### **1.3.4 Agitación o mezclado**

Es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, asegura que todas las células de la población estén igualmente expuestas a la luz y a sustancias nutritivas, y mejora el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. [11]

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 DEFINICIÓN DEL TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL ETAPA 1

El objetivo en esta etapa es seleccionar entre los tres medios dados el que presente mayor productividad.

Se determinara experimentalmente cual de los tres sustratos escogidos previamente es el que mejor resultados da en la productividad de la biomasa en el alga *chlorella vulgaris*, para esto se procedió a definir los tipos de medio:

#### TIPOS DE MEDIO

- ✓ Bold Basal
- ✓ Peptona
- ✓ Watanabe

Esta consideración inicial nos lleva a definir los requerimientos del diseño experimental:

#### 2.1.1 Variable dependiente:

Variable dependiente es la productividad de biomasa relacionada esta con la velocidad específica de crecimiento en fase exponencial y determinada por la relación con la absorbancia y la concentración, esto es la medida particular de tasa de crecimiento  $\mu$  para cada medio en la zona de crecimiento exponencial [14].

#### 2.1.2 Variable independiente:

El factor más importante a tratar es el tipo de medio, en este caso son: Bold Basal, Peptona y Watanabe, claro está que estos están relacionados con su composición estandarizada por los requerimientos nutricionales generales de los tipos de algas en literatura (Anexo B).

### **2.1.3 Niveles del factor**

Los niveles del factor tipo de sustrato en este caso serian 3, equivalentes a los medios a evaluar (Bold Basal, peptona y Watanabe). Está enfocado a los 3 tipos de medios disponibles en el laboratorio.

### **2.1.4 Medida de variable dependiente**

Se escogió como medida de la variable dependiente su concentración verificada con las diluciones subsecuentes de 50% hasta terminar en 6.25% y a partir de estos datos determinar  $\mu$  (Anexo C).

### **2.1.5 Numero de replicas**

Dadas las limitaciones de los insumos y el tiempo en laboratorio se procederá a hacer 2 pruebas lo que equivale a una réplica, Para la subsecuente determinación de las velocidades de crecimiento ( $\mu$ ) para los dos medios Bold Basal y Watanabe se harán replicas considerando la disponibilidad de insumos experimentales.

### **2.1.6 Aleatorización**

Consiste en asignar los sujetos de los distintos niveles de tratamiento al azar, con la expectativa que los efectos indeseados se contrarresten, para este caso se alternaran las mediciones de los valores de cada nivel evitando ir en sentido ascendente [15].

Un error bien común en este procedimiento es el cambiar inadvertidamente los tubos de orden. Es por ello que cada tubo debe estar debidamente rotulado. Evitar la contaminación con sustancias o partículas de polvo; por ello estos deben estar bien limpios antes de ser usados. Recordando que toda materia presenta absorbancia, y si la muestra presenta partículas extrañas, estas alterarán la lectura real de absorbancia. En nuestro caso el aparato hará el ajuste para las moléculas de agua, pero leerá la absorbancia de todo lo demás [16].

## 2.2 SELECCIÓN TIPO DE DISEÑO ESTADÍSTICO

Con estas consideraciones en mente se llega a la determinación que el mejor tipo de diseño es un experimento completamente aleatorizado de un solo factor [17] (el tipo de medio) de la siguiente forma:

### 2.2.1 Modelo experimento estadísticamente diseñado

Tabla 2 Modelo experimento unifactorial aleatorio

Tratamiento	Observaciones	
Bold Basal	$\mu$ original	$\mu$ replica
Peptona	$\mu$ original	$\mu$ replica
Watanabe	$\mu$ original	$\mu$ replica

Para el cálculo de cada medida de la velocidad específica de crecimiento es necesario primero determinar exhaustivamente el lugar del crecimiento exponencial, En la grafica de los datos medidos experimentalmente, esto con la grafica de concentración contra el tiempo y escogiendo la zona [14].

Para realizar la selección de la zona de crecimiento exponencial se parte del cálculo de la velocidad específica para cada punto mediante diferenciación numérica (Anexo D).

## **2.3 DETERMINACIÓN DEL COMPONENTE MAS EFECTIVO ENTRE NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL SUSTRATO BOLD ETAPA 3**

Para esta etapa resumidamente tenemos:

### **2.3.1 Variable dependiente:**

Es la productividad de biomasa relacionada esta con la velocidad específica de crecimiento en fase exponencial y determinada por la relación con la absorbancia y la concentración, esto es la medida particular de tasa de crecimiento  $\mu$  para cada medio en la zona de crecimiento exponencial.

### **2.3.2 Variable independiente:**

Los factores más importante en esta etapa son: composición componente nitrógeno y composición componente fósforo [23].

### **2.3.3 Niveles de los factores:**

En esta etapa los niveles serán definidos respecto a la adición inicial del componente en el medio, esto es alterar dichas composiciones de a 5 y 10 veces más de la estandarizada para su formulación (Anexo B).

### **2.3.4 Medida de variable dependiente:**

Se escogió como medida de la variable dependiente su concentración verificada con las diluciones subsecuentes de 50% hasta terminar en 6.25% y a partir de estos datos determinar  $\mu$ .

### **2.3.5 Número de replicas:**

Dadas las limitaciones de los insumos y el tiempo en laboratorio se procedió con una sola replica y la corrida experimental original.

## 2.4 SELECCIÓN TIPO DE DISEÑO ESTADÍSTICO

Con estas consideraciones en mente se llega a la determinación que el mejor tipo de diseño es un experimento factorial de 2 factores de la siguiente forma:

**Tabla 3 Modelo experimento factorial**

Compuesto	Fósforo			
	5		10	
Nitrógeno				
5	$\mu$ original	$\mu$ replica	$\mu$ original	$\mu$ replica
10	$\mu$ original	$\mu$ replica	$\mu$ original	$\mu$ replica

Nuevamente es necesario para el cálculo de cada medida de la velocidad específica de crecimiento determinar exhaustivamente el lugar del crecimiento exponencial, aplicando la metodología antes expuesta.

Hay que tomar en cuenta que con una sola replica del experimento se tendría 1 grado de libertad por lo que se le pueden hacer test estadísticos, esto para posteriormente comparar los cuadrados medios y hacer el diagrama de pareto estimativo.

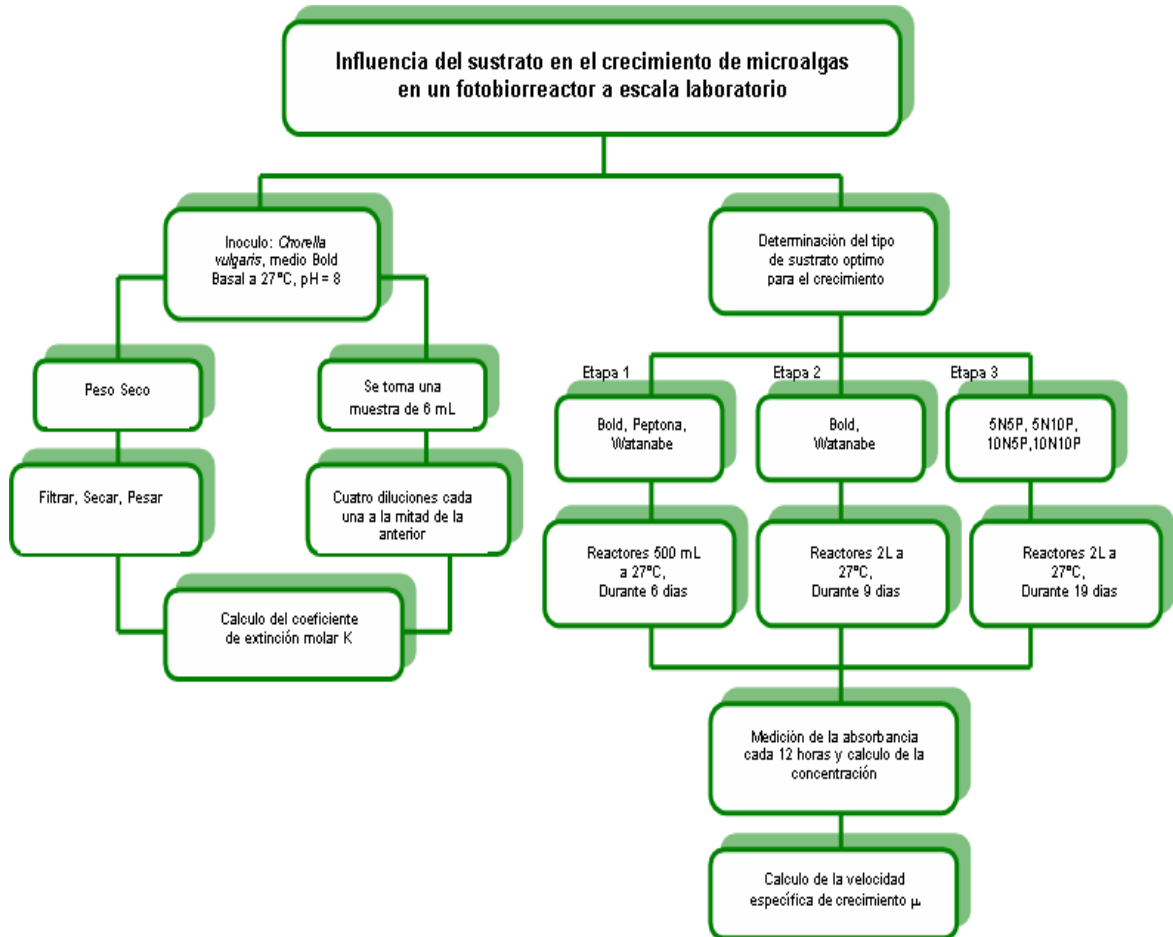
**Tabla 4 Resumen niveles estequimetricos modificados**

	5N5P	5N10P	10N5P	10N10P
N	0,0299	0,0599	0,0299	0,0599
P	0,0599	0,0599	0,1198	0,1198

La tabla 4 relaciona las fracciones molares utilizadas en la modificación de los niveles composicionales para la estimación del diseño factorial.

## 2.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA EXPERIMENTACIÓN

Figura 3 Diagrama general del proceso



## 2.6 ASPECTOS GENERALES PARA LAS ETAPAS EXPERIMENTALES

### 2.6.1 Materiales

**2.6.1.1 Inoculo:** Se trabajo con una microalga verde, *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, perteneciente a *Phylum Chlorophyta*, orden *Chlorellales* obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). La microalga se mantuvo en crecimiento en medio Bold Basal (Anexo E) a 27°C, y pH 8, el cultivo se mantuvo agitado con aireación constante a 2 psi y el equipo utilizado fue un Bioflo 110 (Anexo A, Figura A1).

**2.6.1.2 Fotobiorreactor:** en la primera etapa se usaron botellas de 600ml, en la segunda y tercera etapa se usaron botellas de plástico de 2L ½.

**2.6.1.3 Cultivo de microalga:** se prepararon los diferentes medios en sus respectivos fotobiorreactores en la primera etapa se le agrega al fotobiorreactor un inoculo con una concentración celular igual a 0.012g/L.

En la segunda etapa se procedió de la misma manera se prepararon los medios en sus respectivos fotobiorreactores, pero en este caso la concentración inicial del inoculo fue de 0.0111 g/L, para la tercera y última etapa se procedió de la misma manera, con una concentración inicial del inoculo de 0.012g/L

### 2.6.2 Caracterización

**2.6.2.1 Calculo de peso seco:** Se tomaron 50 ml del inoculo los cuales fueron filtrados al vacío, la biomasa resultante fue secada en una horno (anexo binder 500, Figura A5) durante 24 horas a 105 °C y posteriormente pesada. Dicho peso constituye la concentración inicial de células y la base para el cálculo del coeficiente de extinción molar.

**2.6.2.2 Medición de la absorbancia:** De cada montaje se tomaban muestras de 6 ml cada 12 h con sus replicas y se centrifugaban a 3000 rpm durante 25 min (anexo PowerSpin™ MX; Figura A4), esto se hacía para retirar el medio de cultivo, luego la suspensión (biomasa) era diluida con agua a un volumen de 6 ml con el fin de preparar las muestras que luego serian usadas para la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (anexo Spectroquant 300 Merck, Figura A3).

**2.6.2.3 Balance de biomasa reactor discontinuo**

Después de un corto período de adaptación al nuevo ambiente (fase lag) los microorganismos se comienzan a reproducir incrementando su número y su biomasa en forma exponencial. La existencia de alimento en cantidad suficiente proporciona las condiciones adecuadas para una tasa de crecimiento máxima. Si X representa la concentración de biomasa, la producción celular en un reactor discontinuo se puede describir como:

Producción de X = acumulación de X

$$r_x - r_d = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

$r_x = \mu x$  : Tasa de crecimiento de la población celular

$r_d = \alpha x$  : Tasa de desaparición de la población celular

$\frac{dx}{dt}$  : Acumulación de biomasa en el reactor

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento (máxima en la fase exponencial)

$\mu \gg \alpha$  : Condición de diseño

$$(\mu - \alpha)x = \frac{dx}{dt}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Resolviendo  $\ln x = \ln x_0 + \mu t$  (2)

La ecuación 2 caracteriza la fase exponencial de crecimiento celular.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO OPTIMO DE 3 TIPOS DE MEDIOS DISPONIBLES EN LABORATORIO ETAPA 1

Las velocidades específicas de crecimiento se obtuvieron aplicando la una metodología basada en la determinación de la zona de crecimiento exponencial, él resumen de esta metodología aplicada a cada tratamiento se encuentra en el (Anexo F).

A continuación se muestran las graficas de los datos seleccionados.

##### 3.1.1 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 1:

Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 4 [ ] vs t para medio Bold Basal original

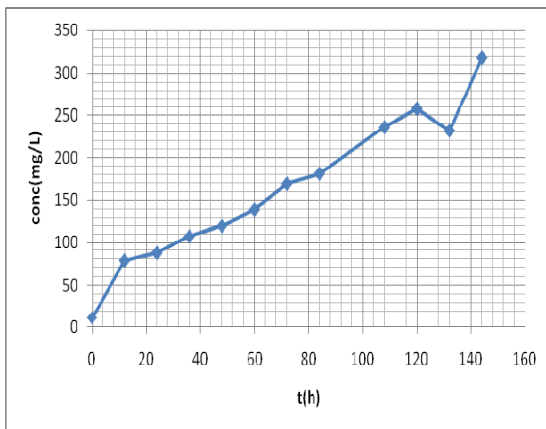
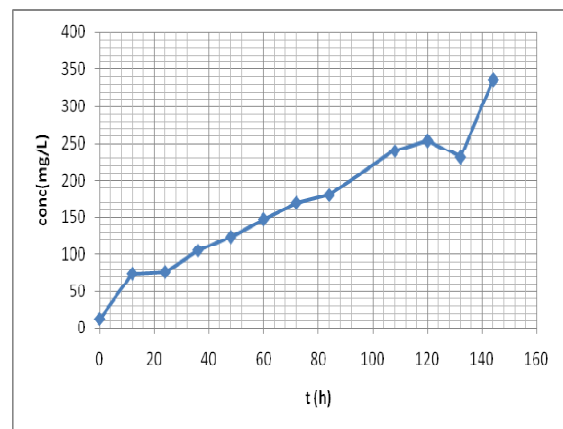


Figura 5 [ ] vs t para medio Bold Basal replica



$\mu$  Original: 0,009 h<sup>-1</sup>

$\mu$  replica: 0,010 h<sup>-1</sup>

### 3.1.2 Determinación $\mu$ medio Peptona etapa 1:

Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 6 [ ] vs t para medio Peptona original

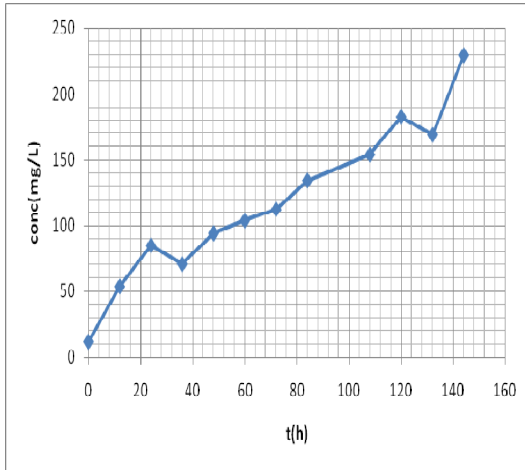
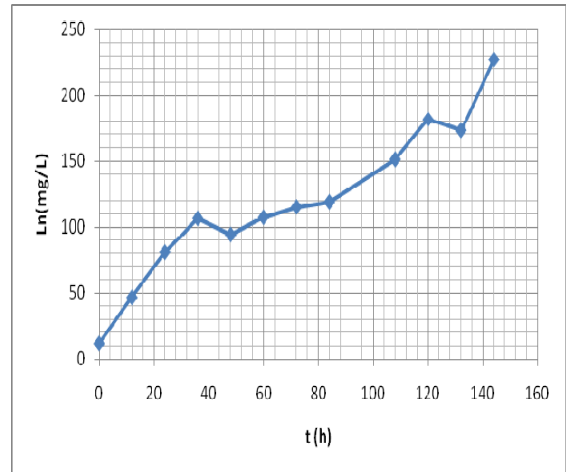


Figura 7 [ ] vs t para medio Peptona original



$\mu$  Original:  $0,008 \text{ h}^{-1}$

$\mu$  replica:  $0,009 \text{ h}^{-1}$

### 3.1.3 Determinación $\mu$ medio Watanabe etapa 1:

Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 8 [ ] vs t para medio Watanabe original

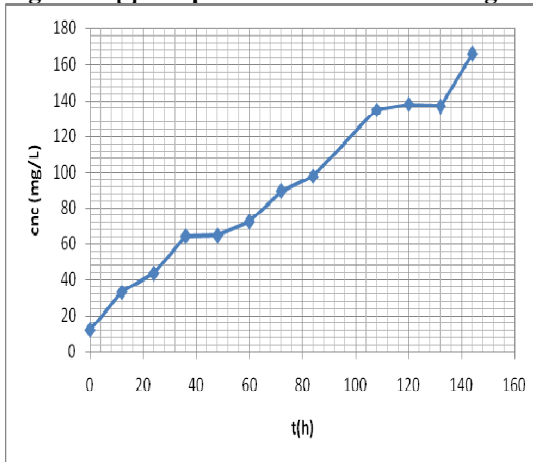
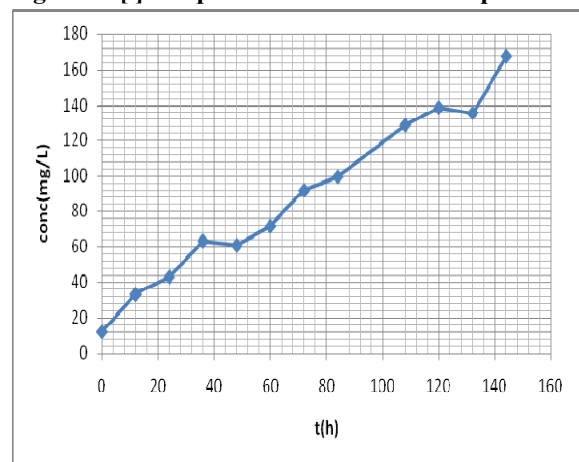


Figura 9 [ ] vs t para medio Watanabe replica



$\mu$  Original:  $0,007 \text{ h}^{-1}$

$\mu$  replica:  $0,006 \text{ h}^{-1}$

Estos resultados se resumen a continuación:

**Tabla 5 Resumen De Las Velocidades Especificas De Crecimiento ( $\mu$ ) determinadas**

<b>Tratamiento</b>	<b><math>\mu</math> medidas (<math>h^{-1}</math>)</b>	
	<b>Original</b>	<b>Replica</b>
Bold Basal	0,009	0,010
Peptona	0,008	0,009
Watanabe	0,007	0,006

Con estos valores se aplica la metodología para el análisis de varianza, para determinar la significancia del tipo de tratamiento.

**Tabla 6 Resumen de análisis de varianza**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>Valor Fo</b>
Tipo de Sustrato	9,3333E-5	2	4,6667 E-6	9,33
Error	1,5000 E-6	3	5,000E-6	
Total	9,3333E-5	5		

Puesto que el estadístico de prueba es  $F_{0,1,2,3} = 5,46$  de tablas estadísticas, se rechaza  $H_0$  y se puede concluir que el tipo de sustrato afecta de manera importante la velocidad específica de crecimiento de la micro-alga con un 90 % de significancia.

Esta prueba estadística nos asegura que el estudio de los sustratos en cuestión si es relevante y que estos afectan el crecimiento de la microalga (Anexo G).

### **3.2 ANÁLISIS DE DATOS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL**

Como parte del tipo de diseño se escogió la técnica de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias de los tratamientos y elegir estadísticamente el más óptimo (de los 3 estudiados) (Anexo H).

De aquí que las comparaciones entre medias de tratamientos sean:

Watanabe contra Bold =  $3,000 \text{ E-}3 > R_2, R_3$

Watanabe contra peptona =  $1,000 \text{ E-}3 < R_2, R_3$

Peptona contra Bold =  $2,000 \text{ E-}3 < R_2, R_3$

La mayor media de tratamiento fue el tratamiento Bold, entre Peptona y Watanabe aunque son menores no hay información suficiente en el experimento para diferenciar estos dos tipos de tratamientos a un nivel determinado del 95%. (Probablemente por solo haber determinado una réplica).

En el medio Bold la velocidad específica de crecimiento es significativamente mayor que en los medios Peptona y Watanabe.

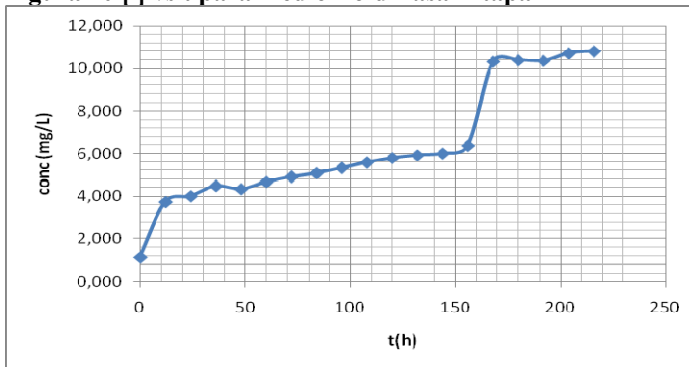
### **3.3 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA LOS 2 MEDIOS SELECCIONADOS ETAPA 2**

A continuación se paso al cálculo de las velocidades de crecimiento para solo los medios más viables estos son Bold y Watanabe debido a su disponibilidad en el laboratorio, recordando que estos nuevos cálculos se hicieron en los medios con concentración menor.

### 3.3.1 Determinación $\mu$ medio Bold

Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 10 [ ] vs t para medio Bold Basal Etapa 2



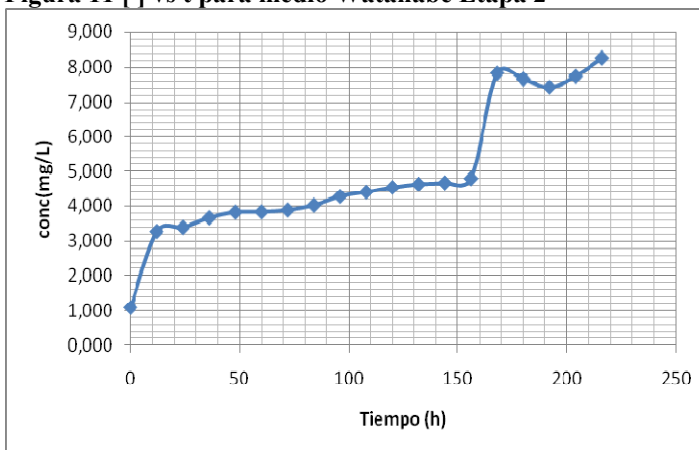
De donde  $\mu = 0,003 \text{ h}^{-1}$

Esta lógicamente es menor que la calculada en la etapa anterior dado la dilución muy alta del medio.

### 3.3.2 Determinación $\mu$ medio Watanabe

Aplicando la metodología expuesta con anterioridad y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 11 [ ] vs t para medio Watanabe Etapa 2



De donde  $\mu = 0,002 \text{ h}^{-1}$

Esta es menor que la calculada en el experimento anterior dado la dilución muy alta del medio.

De los cálculos anteriores se comprueba nuevamente la gran ventaja en la producción de biomasa que tiene el medio Bold contra el Watanabe,  $0,003 \text{ h}^{-1} > 0,002 \text{ h}^{-1}$ .

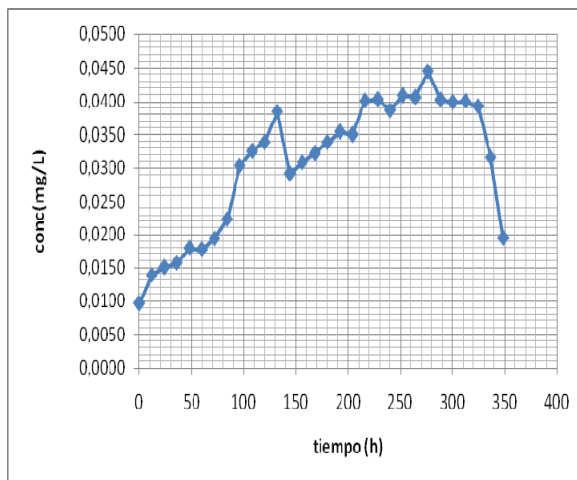
Esta diferencia equivale a un aumento de la  $\mu$  de Bold contra Watanabe del 50% (Anexo I).

### 3.4 DETERMINACIÓN DEL COMPONENTE MAS EFECTIVO ENTRE NITRÓGENO(N) Y FÓSFORO (P) EN EL SUSTRATO BOLD ETAPA 3

#### 3.4.1 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 5N 5P:

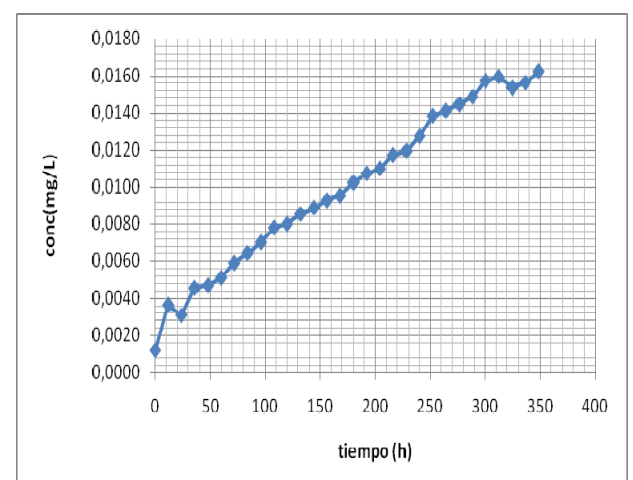
Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 12 [ ] vs t tratamiento 5N5P original



$\mu$  Original:  $0,00884 \text{ h}^{-1}$

Figura 13 [ ] vs t tratamiento 5N5P replica

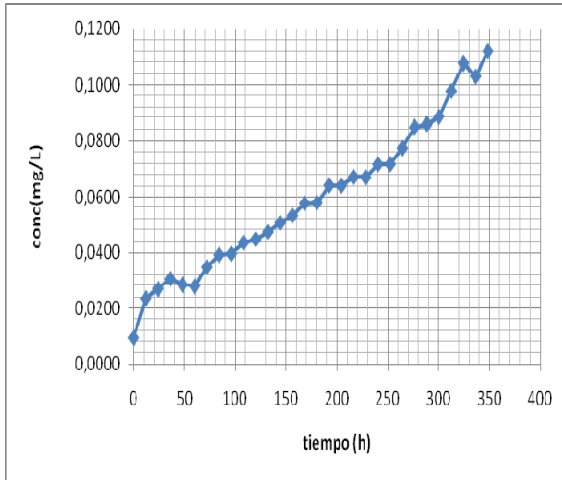


$\mu$  replica:  $0,00878 \text{ h}^{-1}$

### 3.4.2 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 5N 10P:

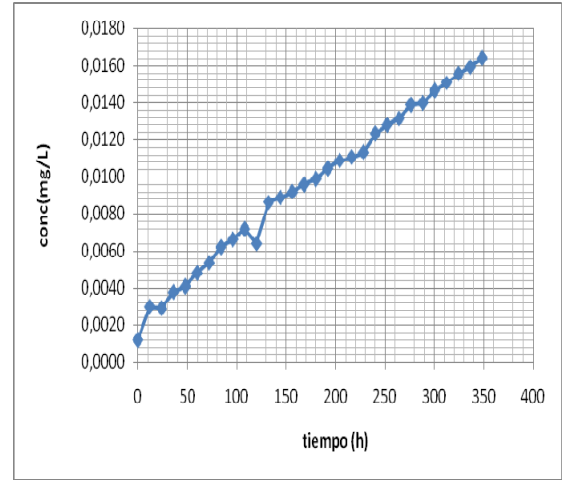
Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 14 [ ] vs t tratamiento 5N10P original



$\mu$  Original:  $0,0141 \text{ h}^{-1}$

Figura 15 [ ] vs t tratamiento 5N10P replica

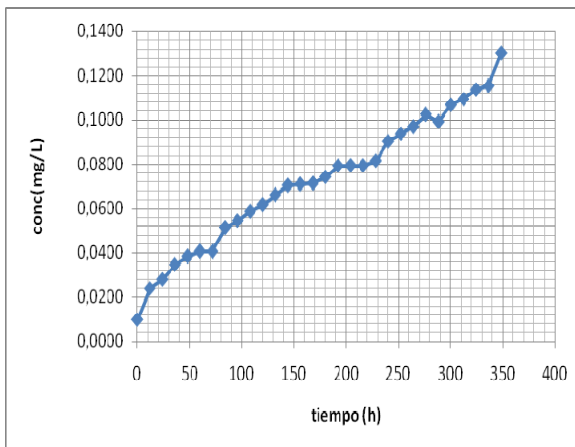


$\mu$  replica:  $0,0123 \text{ h}^{-1}$

### 3.4.3 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 10N 5P:

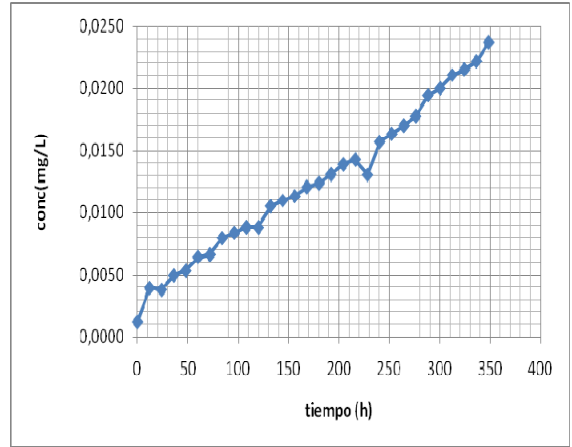
Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 16 [ ] vs t tratamiento 10N5P original



$\mu$  Original:  $0,0147 \text{ h}^{-1}$

Figura 17 [ ] vs t tratamiento 10N5P replica



$\mu$  replica:  $0,0151 \text{ h}^{-1}$

### 3.4.4 Determinación $\mu$ medio Bold basal etapa 3 tratamiento 10N 10P:

Aplicando la metodología expuesta anteriormente y graficando conc vs t para los datos seleccionados y haciendo la regresión lineal obtenemos:

Figura 18 [ ] vs t tratamiento 10N10P original

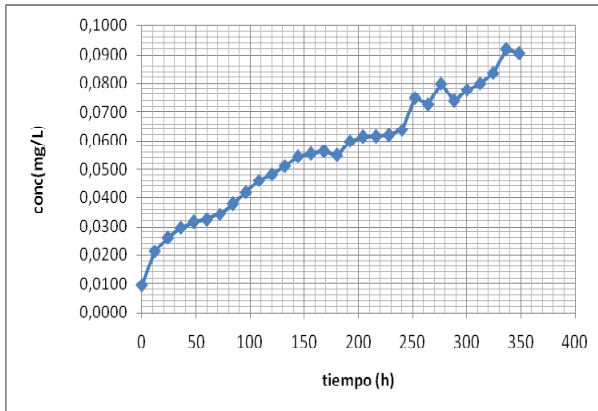
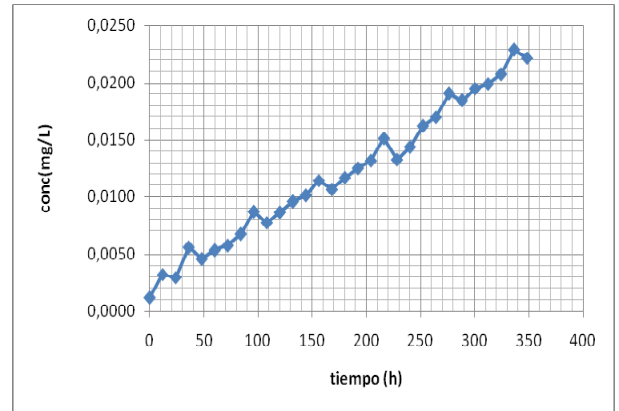


Figura 19 [ ] vs t tratamiento 10N10P replica



$\mu$  Original: 0,0159 h<sup>-1</sup>

$\mu$  replica: 0,0133 h<sup>-1</sup>

Resumiendo los datos obtenidos tenemos:

Tabla 7 Resumen Velocidades especificas de crecimiento etapa 3

NITROGENO	FOSFORO			
	5		10	
5	0,00883	0,00878	0,01410	0,01230
10	0,01466	0,01514	0,01593	0,01325

### 3.4.5 Aplicación la metodología estándar para el análisis de un diseño 2<sup>2</sup>

Tabla 8 Anova resumido datos etapa 3

Análisis de la Varianza para velocidad					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Nitrogeno	0,00000831424	1	0,00000831424	7,73	0,0689
B:Fosforo	0,000028073	1	0,000028073	26,11	0,0145
AB	0,0000110163	1	0,0000110163	10,25	0,0493
bloques	0,00000199181	1	0,00000199181	1,85	0,2667
Error Total	0,00000322575	3	0,00000107525		
Total (corr.)	0,0000526213	7			

R-cuadrado = 93,8699 por ciento

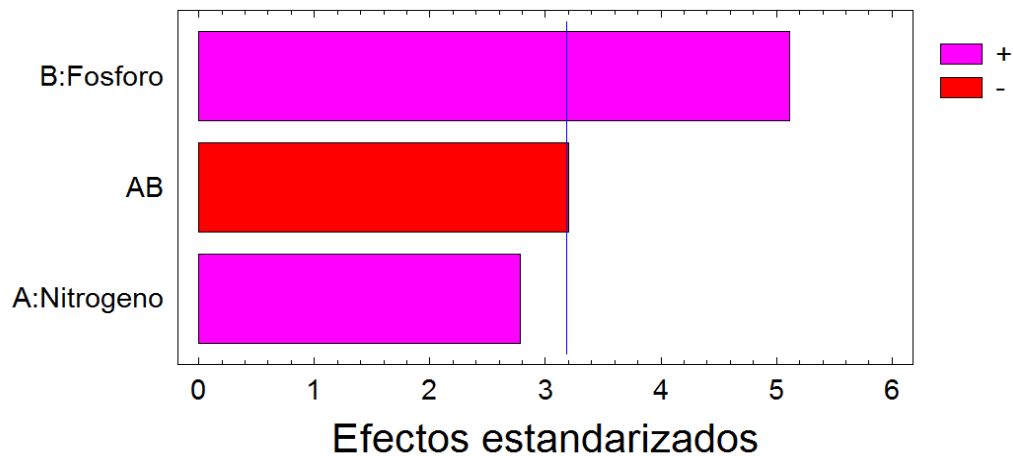
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89,2723 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,00103694

De los resultados del análisis de varianza se puede observar que el factor A compuesto Fosforo posee mayor valor cuadrado medio a los mismos grados de libertad por lo tanto se puede estimar como el factor más significativo, para verificar esto se realizo un diagrama de pareto:

Figura 20 Diagrama de Pareto preliminar datos etapa 3

### Gráfico de Pareto estandarizado para velocidad



En este se puede verificar el efecto superior del factor compuesto fósforo respecto al tratamiento interacción y el factor compuesto nitrógeno, la línea azul especifica el nivel de confianza de 95 % lo que sustenta altamente la conclusión.

## 3.5 APRECIACIONES RESPECTO A LOS MEDIOS ESTUDIADOS

**3.5.1 Bold basal:** Este es un medio artificial extensamente usado de agua dulce, sobre todo para cultivar algas verdes. Las vitaminas propias del medio y algunas concentraciones de metales son relativamente altas, haciendo el medio inaceptable para el crecimiento de muchas algas no verdes.

Seis soluciones de acción macronutritivas son usadas en su preparación, una solución alcalina EDTA, una solución acidificada de hierro, una solución de boro y una solución de trazas de metales todas estas preparadas individualmente [19].

El medio bold inicialmente fue concebido por *Bischoff y Bold*, en la universidad de Texas 1963, ellos estudiaron primeramente el medio donde crecía originalmente un tipo de alga verde y a partir de su análisis químico analítico determinaron las concentraciones iniciales de la solución del medio nombrado [20].

Es de destacar que dado que la composición del medio bold parte de una análisis de un medio de crecimiento real en el golfo de México, esta maneja parámetros muy aceptables de concentración de nutrientes y minerales necesarios para el crecimiento de todo tipo de algas verdes tropicales [21].

**3.5.2 Peptona:** El medio peptona es un intento comercial de uso de enzimas que han demostrado su viabilidad para mejorar las condiciones de productividad de algunas algas estudiadas, estas enzimas son de origen vegetal en su mayoría y ayudan al aumento de la tasa de replicación de la mayoría de los tipos de algas estudiados [22].

En nuestro caso no fue tan eficiente ya que no posee la calidad de nitrógeno que requiere un tipo de alga verde como es la *Chlorella* [23].

**3.5.3 Watanabe:** Para el caso del medio Watanabe este se obtuvo de un procedimiento similar al de el medio bold la única diferencia es que la roca del estudio analítico provenía de Asia sur oriental, es de esperarse que la composición obtenida difiera de los requerimientos de un alga del trópico [24].

Este acercamiento teórico complementado con la composición del medio Bold basal fue la base teórica para la etapa 3 de la experimentación y la selección del Nitrógeno y Fósforo como componentes de estudio [7].

#### 4. CONCLUSIONES

- ✓ Se comprobó experimental y estadísticamente que el medio bold basal de los disponibles en el laboratorio es el que presenta mayor productividad presentando una velocidad específica de crecimiento superior a los otros dos medios estudiados, lo cual fue confirmado por la prueba de comparación de medias.
- ✓ Del análisis estadístico se pudo comprobar que los 3 tipos de sustrato afectan significativamente la productividad de la microalga.
- ✓ A pesar de que la investigación demostró la poca diferencia entre las productividades de los medios peptona y watanabe, en caso de solo disponer de estos dos es económicamente viable usar watanabe.
- ✓ Se comprobó que la composición en Fosforo del medio Bold respecto a su composición en Nitrógeno es más relevante en la optimización de su productividad.
- ✓ Para el sustrato Bold, el aumento en la composición de Fosforo conlleva aun aumentó en la velocidad específica de crecimiento y por lo tanto en la productividad de la biomasa.
- ✓ Se descarta para futuros escalamientos industriales el medio peptona, dado su muy baja velocidad específica de crecimiento obtenida, esto es anudado al gran costos de las enzimas que esté requiere.

## 5. RECOMENDACIONES

- ✓ Es aconsejable continuar con el uso del medio Bold, como estándar para las demás investigaciones que se requieran en el proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel; código 2008D32006-6710.
- ✓ A partir de los resultados presentados en este proyecto de investigación, los autores recomiendan, un estudio detallado de los compuestos de Fosforo, para determinar los niveles que optimicen la productividad en el medio Bold.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sánchez Varo Raquel, Biotecnología De Microalgas.
- [2] Barbosa M.J, Hoogakker J, Wijffels R.H, Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique
- [3] Mandalam R.K, Palsson B, Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth. Capacity in High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures.
- [4] Illman A.M, Scragg A.H, Shales S.W, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium
- [5] Day J.G, Benson E.E, Fleck R.A. In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. In *Vitro Cell Dev Biol* 1999; 35:127–36.
- [6] Chisti Y, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.*, 25 (2007) 294-306.
- [7] Converti A, Casazza A.A., Ortiz E, Perego P, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production
- [8] <http://microalga.cl/web/modules/smartsection/item.php?itemid=7>
- [9] Vera García, Introducción A La Microbiología.
- [10] Herramienta software aprendizaje de bioprocesos UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.

- [11] Barsanti Laura, Gualtieri Paolo Algae anatomy, biochemistry, and biotechnology
- [12] Hernández Alicia, Microbiología Industrial.
- [13] Izquierdo José Felipe, Cinética de las reacciones químicas.
- [14] Parés Ramon, Juárez Antonio, Bioquímica de los microorganismos pag: 31-32.
- [15] Freund Jhon, Simon Gary Estadística elemental octava edición pag: 389.
- [16] <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/espectrofoto.htm>.
- [17] Wackerly Dennis, Mendenhall William III, Scheaffer Richard estadística matemática con aplicaciones sexta edición. Capítulo 13.
- [18] Martínez F, Ascaso C, Orús M. I , Morphometric and Stereologic Analysis of *Chlorella vulgaris* Under Heterotrophic Growth Conditions.
- [19] <https://ccmp.bigelow.org/node/71>.
- [20] Bischoff, H.W, Bold H.C, (1963) Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. Univ. Texas Publ. 6318: 1-95.
- [21] Bold H.C, (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bull. Torrey Bot. Club. 76: 101-8.

- [22] Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, (1999) The Use of Peptones as Medium Additives for High-Density Perfusion Cultures of Animal Cells.
- [23] Davey A, Effects of abiotic factors on nitrogen fixation by blue-green algae in Antarctica, Antarctic Division, Department of Science & Technology, Channel Highway, 7150 Kingston, Australia.
- [24] Roger, Watanabe, (1986), Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors, Fertilizer Research 9 (1986), pp. 39–77.
- [25] Chapra, S; Canale R, Métodos Numéricos para Ingenieros. Ed. Mc Graw Hill, 4a. ed, 2002.
- [26] Montgomery Douglas, Runger George, probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería, capítulo 11.
- [27] Freund Jhon, Miller Irwin, Miller Maryless, Estadística matemática con aplicaciones sexta edición pag 522-524.
- [28] Montgomery Douglas, Runger George, probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería, tabla XII apéndice A.
- [29] <http://www.turnerdesigns.com/t2/doc/appnotes/S-0075.pdf>.
- [30] <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/beers1.htm>.
- [31] Underwood, Day, Química analítica cuantitativa.
- [32] Skoog, west, química analítica.

## ANEXOS

### ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

**Figura A1.** Inoculo de *Chlorella Vulgaris*



Para inocular las cepas se utilizo un Bioflo 110 con volumen de trabajo de 3 L, cuatro módulos con bombas para ácido/base, antiespumante, nutrientes y control de temperatura/agitación y pH/O<sub>2</sub> dos módulos de controladores de mezcla de gases y de nivel (medio/espuma).

**Figura A2.** Montaje del cultivo microbiano



Montaje utilizado para estipular el tipo de sustrato adecuado en el crecimiento de *Chlorella Vulgaris* en un fotobiorreactor a escala laboratorio.

## EQUIPOS UTILIZADOS

**Figura A3.** Espectrofotómetro



La absorbancia se midió por medio de un espectrofotómetro Spectroquant 300 Merck con un rango de longitud de onda de 190-1100 nm, ancho de banda espectral 4 nm lámpara de destello de xenón y una resolución de absorbancia de 0.001 A.

**Figura A4.** Centrifuga



Para separar la *Chlorella Vulgaris* del medio de cultivo se utilizó una centrifuga PowerSpin™ MX con rotor de 24 tubos de 2 a 10 mL, Velocidad variable de 1000 a 3400 RPM y cámara de muestras de acero inoxidable para fácil limpieza.

**Figura A5.** Horno



El secado de la muestra para el cálculo del peso seco se realizó en un horno Binder 500 a 105 °C, maneja un rango de temperatura de 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta 300 °C, temporizador electrónico 0 – 99.59 h, controlador de microprocesador con display LED y temporizador integrado.

ANEXO B. COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS

**TABLA B1.** Composición del medio Bold Basal

<b>Soluciones Stock</b>	<b>Para 400 ml</b>
<b>(1).</b> NaNO <sub>3</sub>	10.0 g
<b>(2).</b> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.0 g
<b>(3).</b> NaCl	1.0 g
<b>(4).</b> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0 g
<b>(5).</b> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0 g
<b>(6).</b> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 g
<b>Soluciones Stock</b>	<b>Para un Litro</b>
<b>(7).</b> Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse): ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44 g
MoO <sub>3</sub>	0.71 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.49 g
<b>(8).</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42 g
<b>(9).</b> EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
<b>(10).</b> FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	1.0 ml
<b>Medio</b>	<b>Para un Litro</b>
Soluciones <i>Stock</i> 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones <i>Stock</i> 7 - 10	1 ml cada una

**TABLA B2.** Composición del medio peptona

<b>Soluciones Stock</b>	<b>Para 1.0 L</b>
(1) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
(2) $\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0 g
(3) $\text{KNO}_3$	10.0 g

<b>Requisitos propios del medio</b>	<b>Para 1.0 L</b>
Peptona proteose ( Oxoid L85)*	1.0 g
Soluciones Stock 1 - 3	20.0 ml

Las soluciones Stock deben ser realizadas con agua desionizadas. Para soluciones con Agar, adicionar 15 g por litro \* Agar bacteriológico (Oxoid L11) en autoclave a 15psi durante 15 minutos.

Fuente: \*Unipath Ltd , Wade Road , Basingstoke , Hants , RG24 0PW , UK

**TABLA B3.** Composición del medio Watanabe

<b>Solución stock 1</b>	
KNO <sub>3</sub>	1.25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 g
MgSO <sub>4</sub>	20 mg
FeSO <sub>4</sub>	20 mg
<b>Solución stock 2</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.81 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	222 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	390 mg
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	79 mg

## ANEXO C. GENERALIDADES ACERCA DE LAS DILUCIONES

La dilución en serie se hace usualmente preparando seis o siete tubos con un volumen dado de solvente, en este caso 6 ml, en cada uno. Al primer tubo se le añade un volumen igual (6 ml) de la muestra de interés y se mezcla bien. El tubo tendrá entonces una proporción 1:1 de solvente a sustancia experimental. Es muy importante mezclar bien para distribuir uniformemente las moléculas de la sustancia experimental. De otra forma, habría incongruencias en las lecturas de absorbancia. De ese tubo 1 se saca un volumen (3 ml) y se echa al tubo 2. Se mezcla bien, y se sigue el proceso con todos los tubos del 3 al 6 ó 7. Al llegar al último, se descarta un volumen de la solución diluída. Al hacer esto obtendremos una dilución en factor de dos:  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$ , donde un tubo tiene la mitad de la concentración de la sustancia de interés que el tubo anterior.

$V_1C_1 = V_2C_2$ , donde  $V_1$  y  $C_1$  son el volumen y la concentración de la solución que va a ser diluida, mientras que  $V_2$  y  $C_2$  son el volumen y la concentración de la dilución.

Las replicas consideradas parten de la noción de heurística experimental esto es, si las diluciones mantienen la estabilidad en la tendencia de la absorbancia es decir si esta iba disminuyendo no podía bajar súbitamente y viceversa. [16].

## ANEXO D. DETERMINACIÓN DE DERIVADAS NUMÉRICAS

Para el cálculo de las velocidades específicas de crecimiento, dado que estas representan variaciones de la biomasa contra el tiempo es necesario usar un método numérico para el cálculo de esta derivada.

Este método será la aplicación de formulas de derivadas numéricas como se explica a continuación:

### Fórmulas de tres

Supongamos que  $x_0, x_1, \dots, x_N$  son  $N+1$  puntos en un intervalo  $I$  y que

$f(x) \in C^{N+1}(I)$ . Si  $P(x) = \sum_{k=0}^N f(x_k)L_k(x)$  es el polinomio interpolador de Lagrange

entonces:  $f(x) = P(x) + \frac{(x-x_0)\dots(x-x_N)}{(N+1)!} f^{N+1}(E(x))$  para alguna  $E(x) \in I$ . Al

derivar esta expresión y evaluar en algún  $x_j$  (de los  $N+1$  puntos  $x_j$ ) obtenemos:

$$f'(x_j) = \sum_{k=0}^N f(x_k)L'_k(x) + \frac{f^{N+1}(E(x_j))}{N+1!} \prod_{k=0; k \neq j}^N (x_j - x_k)$$

Esta fórmula recibe el nombre de *fórmula de puntos* para aproximar  $f'(x_j)$ . Ahora lo que vamos a hacer es, a partir de aquí, obtener fórmulas útiles de tres y cinco puntos.

En lo que sigue vamos a suponer que los  $x_i$  son igualmente espaciados, es decir suponemos que  $x_1 = x_0 + h, x_2 = x_0 + 2h \dots$  con  $h \neq 0$  En nuestro caso 12 horas.

Supongamos que solo tenemos tres datos  $x_0, x_1, x_2$  igualmente espaciados, es decir  $x_1 = x_0 + h, x_2 = x_0 + 2h \dots$ , con  $h \neq 0$ . Aplicando la fórmula anterior con tres puntos, para  $x_j = x_0, x_1, x_2$  respectivamente, obtenemos las tres siguientes fórmulas (llamadas de "tres puntos") [25].

$$f'(x_0) = \frac{1}{h} \left[ -\frac{3}{2} f(x_0) + 2f(x_1) - \frac{1}{2} f(x_2) \right] + \frac{h^2}{3} f^{(3)}(E(x_0))$$

$$f'(x_1) = \frac{1}{h} \left[ -\frac{1}{2} f(x_0) + \frac{1}{2} f(x_2) \right] + \frac{h^2}{6} f^{(3)}(E(x_1))$$

$$f'(x_2) = \frac{1}{h} \left[ \frac{1}{2} f(x_0) - 2f(x_1) + \frac{3}{2} f(x_2) \right] + \frac{h^2}{3} f^{(3)}(E(x_2))$$

En nuestro caso  $f(x)$  es la concentración de biomasa,  $h = 12$  horas y  $f'(x_j)$  equivale a  $\mu$  calculado al punto dado.

## ANEXO E. DATOS EXPERIMENTALES

**Tabla E1:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold basal en etapa 1.

Original		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,786	79,011
24,0	0,873	87,955
36,0	1,065	107,695
48,0	1,187	120,238
60,0	1,371	139,155
72,0	1,664	169,279
84,0	1,779	181,102
108,0	2,314	236,106
120,0	2,522	257,491
132,0	2,275	232,097
144,0	3,110	317,944

Replica		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,737	73,973
24,0	0,759	76,235
36,0	1,035	104,611
48,0	1,214	123,014
60,0	1,446	146,866
72,0	1,664	169,279
84,0	1,769	180,074
108,0	2,350	239,808
120,0	2,490	254,201
132,0	2,262	230,760
144,0	3,288	336,245

**Tabla E2:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Peptona en etapa 1.

Original		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,539	53,616
24,0	0,846	85,179
36,0	0,704	70,580
48,0	0,936	94,432
60,0	1,028	103,891
72,0	1,114	112,733
84,0	1,327	134,631
108,0	1,516	154,063
120,0	1,799	183,158
132,0	1,662	169,073
144,0	2,251	229,629

Replica		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,472	46,728
24,0	0,805	80,964
36,0	1,055	106,667
48,0	0,936	94,432
60,0	1,063	107,489
72,0	1,141	115,509
84,0	1,178	119,313
108,0	1,488	151,184
120,0	1,783	181,513
132,0	1,700	172,980
144,0	2,225	226,956

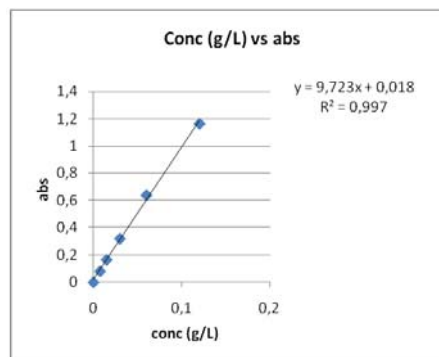
**Tabla E3:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Watanabe en etapa 1.

Original		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,338	32,951
24,0	0,440	43,438
36,0	0,642	64,206
48,0	0,645	64,514
60,0	0,720	72,225
72,0	0,888	89,497
84,0	0,969	97,825
108,0	1,329	134,837
120,0	1,361	138,127
132,0	1,351	137,099
144,0	1,632	165,989

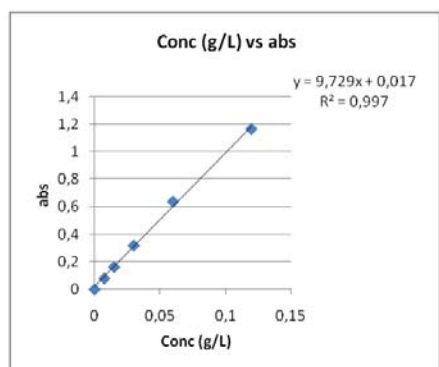
Replica		
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0,0	-----	12,000
12,0	0,338	32,951
24,0	0,436	43,027
36,0	0,631	63,075
48,0	0,608	60,710
60,0	0,713	71,505
72,0	0,911	91,862
84,0	0,986	99,573
108,0	1,266	128,360
120,0	1,367	138,744
132,0	1,337	135,660
144,0	1,648	167,634

**Tabla E4.** Variación de la absorbancia con la concentración del Inoculo etapa 1

Original	
conc(g/l)	abs
0	0
0,12	1,164
0,06	0,639
0,03	0,32
0,015	0,165
0,0075	0,081



Replica	
conc(g/l)	abs
0	0
0,12	1,164
0,06	0,638
0,03	0,319
0,015	0,163
0,0075	0,08



La pendiente de la gráfica de absorbancia vs concentración nos indica el valor del coeficiente de extinción molar etapa 1.

**Tabla E5.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold basal en etapa 2.

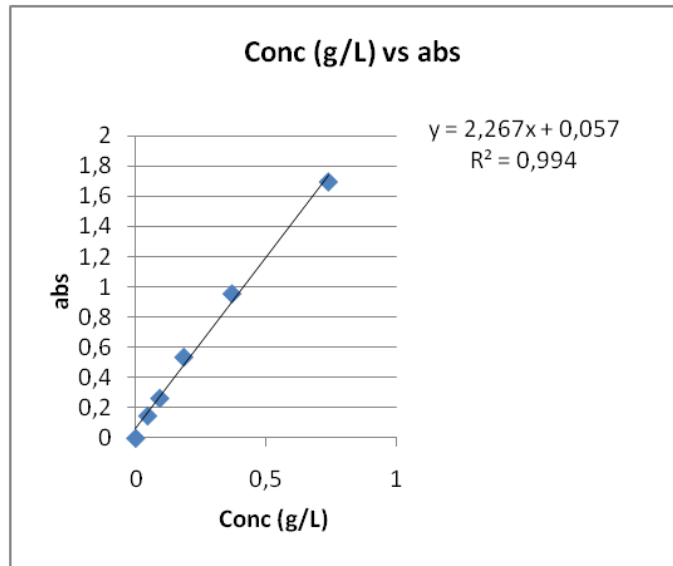
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0	....	1,110
12	0,897	3,728
24	0,958	3,998
36	1,067	4,479
48	1,034	4,333
60	1,109	4,665
72	1,162	4,899
84	1,200	5,066
96	1,255	5,309
108	1,315	5,574
120	1,362	5,782
132	1,391	5,910
144	1,410	5,994
156	1,495	6,370
168	2,391	10,327
180	2,406	10,394
192	2,400	10,367
204	2,480	10,720
216	2,502	10,818

**Tabla E6.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Watanabe en etapa 2.

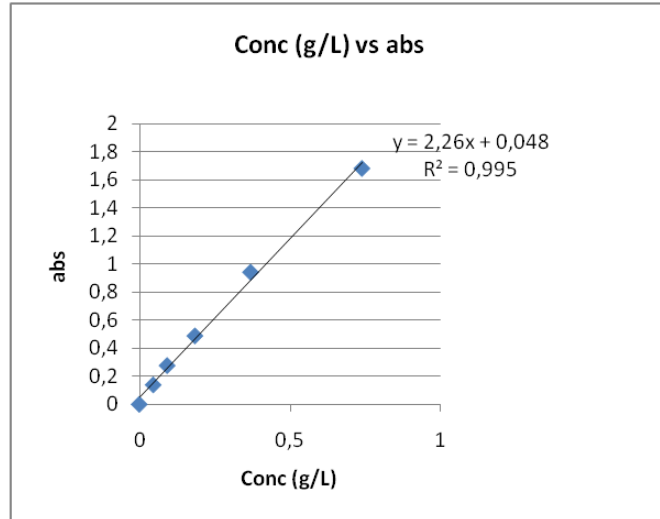
tiempo(h)	Absorbancia	conc(mg/L)
0	....	1,110
12	0,795	3,278
24	0,821	3,392
36	0,883	3,666
48	0,919	3,825
60	0,921	3,834
72	0,933	3,887
84	0,964	4,024
96	1,022	4,280
108	1,050	4,404
120	1,080	4,536
132	1,101	4,629
144	1,110	4,669
156	1,138	4,793
168	1,825	7,827
180	1,788	7,664
192	1,734	7,425
204	1,805	7,739
216	1,923	8,260

**Tabla E7.** Variación de la absorbancia con la concentración del Inoculo etapa 2

Original	
conc(g/l)	abs
0,74	1,693
0,37	0,954
0,185	0,535
0,0925	0,264
0,04625	0,148
0	0



Replica	
conc(g/l)	abs
0,74	1,685
0,37	0,944
0,185	0,489
0,0925	0,277
0,04625	0,139
0	0



La pendiente de la gráfica de absorbancia vs concentración nos indica el valor del coeficiente de extinción molar etapa 2.

**Tabla E8.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold 5N5P en etapa 3.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentracion (mg/L)
0	...	1,200
12	0,621	3,561
24	0,562	3,192
36	0,747	4,357
48	0,832	4,897
60	0,865	5,105
72	0,973	5,787
84	1,092	6,536
96	1,137	6,820
108	1,197	7,199
120	1,324	8,004
132	1,396	8,459
144	1,482	8,999
156	1,500	9,112
168	1,602	9,757
180	1,680	10,249
192	1,744	10,656
204	1,816	11,111
216	1,885	11,547
228	1,983	12,163
240	2,076	12,750
252	2,236	13,764
264	2,310	14,228
276	2,317	14,275
288	2,445	15,081
300	2,551	15,753
312	2,569	15,867
324	2,508	15,478
336	2,505	15,459
348	2,664	16,464
360	2,739	16,937
372	2,850	17,638
384	3,025	18,747

**Tabla E9.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold 5N10P en etapa 3.

Tiempo(h)	Absorbancia	concentracion( mg/l)
0	...	1,200
12	0,546	3,087
24	0,517	2,907
36	0,655	3,779
48	0,706	4,101
60	0,817	4,802
72	0,889	5,257
84	1,042	6,223
96	1,108	6,640
108	1,168	7,019
120	1,206	7,256
132	1,423	8,629
144	1,465	8,894
156	1,506	9,150
168	1,578	9,605
180	1,611	9,813
192	1,711	10,448
204	1,782	10,893
216	1,810	11,073
228	1,852	11,339
240	2,008	12,324
252	2,082	12,788
264	2,137	13,138
276	2,257	13,896
288	2,272	13,991
300	2,377	14,654
312	2,445	15,081
324	2,521	15,564
336	2,581	15,943
348	2,658	16,426
360	2,737	16,928
372	2,949	18,264
384	2,971	18,406

**Tabla E10.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold 10N5P en etapa 3.

Tiempo(h)	Absorbancia	concentracion( mg/l)
0	...	1,200
12	0,661	3,817
24	0,669	3,864
36	0,823	4,840
48	0,924	5,475
60	1,066	6,375
72	1,117	6,697
84	1,321	7,985
96	1,390	8,421
108	1,461	8,866
120	1,461	8,866
132	1,722	10,514
144	1,795	10,979
156	1,852	11,339
168	1,972	12,096
180	2,019	12,390
192	2,131	13,101
204	2,257	13,896
216	2,320	14,294
228	2,124	13,053
240	2,542	15,696
252	2,646	16,350
264	2,752	17,023
276	2,872	17,780
288	3,132	19,419
300	3,223	19,997
312	3,394	21,077
324	3,463	21,513
336	3,571	22,195
348	3,817	23,749
360	3,877	24,128
372	4,309	26,856
384	4,491	28,002

**Tabla E10.** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo para el medio Bold 10N10P en etapa 3.

Tiempo(h)	Absorbancia	Concentracion( mg/l)
0	...	1,200
12	0,553	3,135
24	0,559	3,173
36	0,708	4,110
48	0,787	4,613
60	0,891	5,266
72	0,954	5,664
84	1,143	6,858
96	1,201	7,227
108	1,281	7,729
120	1,413	8,563
132	1,558	9,482
144	1,689	10,306
156	1,626	9,908
168	1,737	10,609
180	1,890	11,575
192	2,023	12,419
204	2,175	13,375
216	2,214	13,622
228	2,157	13,262
240	2,316	14,266
252	2,607	16,104
264	2,775	17,165
276	2,838	17,563
288	2,977	18,444
300	3,124	19,372
312	3,190	19,789
324	3,375	20,954
336	3,450	21,428
348	3,568	22,176
360	3,693	22,962
372	4,159	25,908
384	4,266	26,581

## ANEXO F. RESUMEN METODOLOGÍA APLICADA AL CÁLCULO DE LAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO EN ETAPA 1.

Los siguientes pasos hacen parte de la metodología para determinar exhaustivamente la zona de crecimiento exponencial:

**Paso 1:** Se grafica la concentración de biomasa vs tiempo y se descartan los valores donde la biomasa empiece a disminuir.

**Paso 2:** Se aplican las formulas de derivación numérica puntual y se halla su valor inverso, en nuestro caso se implementaron las ecuaciones de las derivadas numéricas en Excel.

**Paso 3:** Se escogen los datos de acuerdo al criterio tiempo, dado que en la literatura se ha determinado que durante el crecimiento de micro-algas solo hay seguridad de encontrarse en la fase exponencial cuando esta lleva más de 72 horas de inoculada [18].

**Paso 4:** Se seleccionan los datos a usar para la determinación de  $\mu$  a partir de los criterios anteriores.

**Paso 5:** Se usan los datos seleccionados para mediante una regresión lineal de los logaritmos de las concentraciones de biomasa vs el tiempo calcular  $\mu$  como la pendiente de esta regresión.

Cabe destacar que en la aplicación de la metodología en algunos casos después de usar el criterio solo sobreviven 2 valores para la regresión lineal, por lo tanto algunos valores de  $R^2$  fueron iguales a 1.

**Tabla F1:** Variación del tiempo, la concentración de biomasa, logaritmo natural de la concentración, derivada numérica calculada e inverso de la derivada para el medio Bold basal en etapa 1.

Original				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12	12	2,485	11,004	0,091
24	79,011	4,370	3,165	0,316
36	87,955	4,477	1,195	0,837
48	107,695	4,679	1,345	0,743
60	120,238	4,789	1,311	0,763
72	139,155	4,936	2,043	0,489
84	169,279	5,132	1,748	0,572
96	181,102	5,199	2,784	0,359
108	236,106	5,464	3,183	0,314
120	257,491	5,551	-0,167	-5,986
132	232,097	5,447	2,519	0,397
144	317,944	5,762	11,789	0,085

Replica				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12,0	12,000	2,485	7,652	0,131
24,0	73,973	4,304	2,676	0,374
36,0	76,235	4,334	1,277	0,783
48,0	104,611	4,650	1,949	0,513
60,0	123,014	4,812	1,761	0,568
72,0	146,866	4,990	1,928	0,519
84,0	169,279	5,132	1,384	0,723
96,0	180,074	5,193	2,939	0,340
108,0	239,808	5,480	3,089	0,324
120,0	254,201	5,538	-0,377	-2,653
132,0	230,760	5,441	3,418	0,293
144,0	336,245	5,818	14,162	0,071

**Tabla F2:** Variación del tiempo, la concentración de biomasa, logaritmo natural de la concentración, derivada numérica calculada e inverso de la derivada para el medio Peptona en etapa 1.

Original				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12,0	12,000	2,485	4,087	0,245
24,0	53,616	3,982	3,049	0,328
36,0	85,179	4,445	0,707	1,415
48,0	70,580	4,257	0,386	2,594
60,0	94,432	4,548	1,388	0,720
72,0	103,891	4,643	0,763	1,311
84,0	112,733	4,725	1,281	0,781
96,0	134,631	4,903	1,722	0,581
108,0	154,063	5,037	2,022	0,495
120,0	183,158	5,210	0,625	1,599
132,0	169,073	5,130	1,936	0,516
144,0	229,629	5,436	8,156	0,123

Replica				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12,0	12,000	2,485	2,914	0,343
24,0	46,728	3,844	2,873	0,348
36,0	80,964	4,394	2,497	0,400
48,0	106,667	4,670	0,561	1,782
60,0	94,432	4,548	0,034	29,180
72,0	107,489	4,677	0,878	1,139
84,0	115,509	4,749	0,493	2,030
96,0	119,313	4,782	1,486	0,673
108,0	151,184	5,018	2,592	0,386
120,0	181,513	5,201	0,908	1,101
132,0	172,980	5,153	1,893	0,528
144,0	226,956	5,425	7,103	0,141

**Tabla F3:** Variación del tiempo, la concentración de biomasa, logaritmo natural de la concentración, derivada numérica calculada e inverso de la derivada para el medio Watanabe en etapa 1.

Original				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12,0	12,000	2,485	2,182	0,458
24,0	32,951	3,495	1,310	0,763
36,0	43,438	3,771	1,302	0,768
48,0	64,206	4,162	0,878	1,139
60,0	64,514	4,167	0,334	2,993
72,0	72,225	4,280	1,041	0,961
84,0	89,497	4,494	1,067	0,937
96,0	97,825	4,583	1,889	0,529
108,0	134,837	4,904	1,679	0,596
120,0	138,127	4,928	0,094	10,611
132,0	137,099	4,921	1,161	0,861
144,0	165,989	5,112	3,654	0,274

Replica				
Tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	1 / (dx/dt)
12,0	12,000	2,485	2,199	0,455
24,0	32,951	3,495	1,293	0,774
36,0	43,027	3,762	1,255	0,797
48,0	63,075	4,144	0,737	1,357
60,0	60,710	4,106	0,351	2,847
72,0	71,505	4,270	1,298	0,770
84,0	91,862	4,520	1,169	0,855
96,0	99,573	4,601	1,521	0,658
108,0	128,360	4,855	1,632	0,613
120,0	138,744	4,933	0,304	3,288
132,0	135,660	4,910	1,204	0,831
144,0	167,634	5,122	4,125	0,242

ANEXO G: TABLA ANÁLISIS DE DATOS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL

Tratamiento	Observaciones $\mu$ medidas ( $h^{-1}$ )		Total	Promedio
<b>Bold basal</b>	0,009	0,01	0,019	0,0095
<b>Peptona</b>	0,008	0,009	0,017	0,0085
<b>Watana be</b>	0,007	0,006	0,013	0,0065
			0,049	0,0082

Estos son los datos preliminares para calcular la tabla ANOVA.

Consideraciones preliminares:

90 % de significancia equivalente a un  $\alpha = 0.1$ , 3 tratamientos una réplica y 6 experimentos.

$$SS_{Total} = 9,3333E-5$$

$$SS_{Tratamientos} = 1,0833 E-5$$

$$SS_{Error} = 1,5000 E-6$$

Todo este procedimiento es conforme a la metodología planteada por Montgomery y Runger [26].

## ANEXO H. APLICACIÓN PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN

La prueba de rango múltiple Duncan es una comparación de las medias de tratamientos todos contra todos de manera que cualquier diferencia existente entre cualesquier tratamiento contra otro se verá reflejado en este análisis. Utiliza un nivel de significancia variable que depende del número de medias que entran en cada etapa de comparación. La idea es que a medida que el número de medias aumenta, la probabilidad de que se asemejen disminuye [27]

Consideraciones preliminares:

Error estándar de cada media  $s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$  en este caso  $S_x = 5,0000 \text{ E-4}$

Se ordenan las medias de los 3 tratamientos en orden ascendente:

3- media Bold basal = 0,0095

2- media Peptona = 0,0085

1- media Watanabe = 0,0065

De la tabla de rangos significativos [28], considerando para este caso  $a = 3$ ,  $n = 2$ ,  $MSE = 5,0000 \text{ E-7}$  con 3 grados de libertad para el tratamiento y significancia de  $\alpha = 0,05$  tenemos:

$R_{0.5}(2,3) = R_{0.5}(2,3) = 4,5$  por lo tanto:

$R_2 = R_{0.5}(2,3) * S_x = 2,25 \text{ E-3}$

$R_3 = R_{0.5}(3,3) * S_x = 2,25 \text{ E-3}$

ANEXO I. CÁLCULOS VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO ZONA EXPONENCIAL ETAPA 2.

**Tabla 11:** Variación del tiempo, la concentración de biomasa, logaritmo natural de la concentración, derivada numérica calculada e inverso de la derivada para el medio Bold basal en etapa 2.

tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	(dx/dt)-1
0	1,110	0,104	0,316	3,164
12	3,728	1,316	0,120	8,312
24	3,998	1,386	0,031	31,961
36	4,479	1,499	0,014	71,492
48	4,333	1,466	0,008	129,366
60	4,665	1,540	0,024	42,448
72	4,899	1,589	0,017	59,707
84	5,066	1,623	0,017	58,423
96	5,309	1,669	0,021	47,247
108	5,574	1,718	0,020	50,779
120	5,782	1,755	0,014	71,492
132	5,910	1,777	0,009	113,195
144	5,994	1,791	0,019	52,244
156	6,370	1,852	0,181	5,539
168	10,327	2,335	0,168	5,964
180	10,394	2,341	0,002	603,707
192	10,367	2,339	0,014	73,424
204	10,720	2,372	0,019	53,268
216	10,818	2,381	-0,003	-388,097

**Tabla 12:** Variación del tiempo, la concentración de biomasa, logaritmo natural de la concentración, derivada numérica calculada e inverso de la derivada para el medio Watanabe en etapa 2.

tiempo(h)	conc(mg/L)	ln(conc)	dx/dt	dx/dt-1
0	1,110	0,104	0,266	3,757
12	3,278	1,187	0,095	10,515
24	3,392	1,222	0,016	61,743
36	3,666	1,299	0,018	55,442
48	3,825	1,342	0,007	142,983
60	3,834	1,344	0,003	388,097
72	3,887	1,358	0,008	126,357
84	4,024	1,392	0,016	61,049
96	4,280	1,454	0,016	63,179
108	4,404	1,482	0,011	93,679
120	4,536	1,512	0,009	106,536
132	4,629	1,532	0,006	181,112
144	4,669	1,541	0,007	146,848
156	4,793	1,567	0,132	7,599
168	7,827	2,058	0,120	8,359
180	7,664	2,037	-0,017	-59,707
192	7,425	2,005	0,003	319,609
204	7,739	2,046	0,035	28,748
216	8,260	2,111	0,052	19,199

## ANEXO J. GENERALIDADES SOBRE LA ABSORBANCIA

Uno de los instrumentos principales del laboratorio de biología celular es el espectrofotómetro este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática (de un largo de onda particular) a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida. Esto le permite al experimentador realizar dos funciones:

- ✓ Nos da información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra. Esto podemos lograrlo midiendo la absorbancia a distintos largos de onda y graficar estos valores en función del largo de onda, formando un espectrograma. Como cada sustancia tiene unas propiedades espectrales únicas, distintas sustancias producen distintos espectrogramas. Esto se debe a que cada sustancia tiene un arreglo tridimensional de átomos particular que hace que cada sustancia tenga características únicas.

Nos dice cuanta cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra. [29]

La concentración es proporcional a la absorbancia, según la Ley *Beer-Lambert*:

$$\text{Abs} = K \cdot C \cdot L$$

Abs: absorbancia

K: coeficiente de extinción molar

C: concentración

L: distancia que viaja la luz a través de la muestra. (Normalmente es de 1 cm) [30]

La cubeta promedio, que guarda la muestra, tiene dimensiones internas de un centímetro (L). La ecuación describe una línea recta, donde el origen es cero,

bajo condiciones ideales. Si L es constante (1.0 cm) y se conoce el valor de K, podemos calcular C en base a Abs:

$$\text{Abs} / K \cdot L = C$$

El coeficiente de extinción se determina realizando una serie de diluciones de la sustancia de interés. Luego se mide la absorbancia de cada muestra de dilución a un largo de onda determinado. Los valores de absorbancia son graficados en función de la concentración. El resultado debe ser una línea recta. La pendiente de la línea ( $\Delta y / \Delta x$ ) es el coeficiente de extinción (K). Si las unidades de concentración son en moles, entonces la constante es llamada coeficiente de extinción molar y se mide en unidades de  $1 / M \text{ cm}$  [31].

El espectrofotómetro nos puede dar ambos valores a la misma vez, ahorrando la necesidad de hacer los cálculos. (Tramitancia = cantidad de luz que atraviesa la mezcla; Absorbancia= cantidad de luz que rebota contra las moléculas suspendidas en la muestra y por lo tanto no la atraviesan: es absorbida).

El espectrofotómetro mide la absorbancia de una muestra en los espectros de luz uv y visible (200 a 850 nm). El largo de onda es determinado por un prisma que descompone el rayo de luz de acuerdo al largo de onda escogido. Luego la luz pasa por una hendidura que determina la intensidad del haz. Este atraviesa la muestra y llega a un tubo fotográfico, donde es medido. La cantidad de luz que atraviesa la muestra es el porcentaje de tramitancia. Podemos usar esta unidad o cambiarla a absorbancia usando la siguiente ecuación.

$$\%T = - \text{Log Abs.}$$

Una característica del instrumento es la necesidad de “blanquear” el aparato antes de cada lectura. Esto se hace colocando una cubeta con una solución control que

tenga todos los componentes de la reacción menos la sustancia que va a ser medida en el instrumento y ajustando la lectura a cero absorbancia. El propósito de esto es eliminar el registro de absorbancia (*background*) que puedan presentar los demás componentes de la reacción a ese largo de onda particular. Todas las moléculas presentan absorbancia porque todas interfieren con el paso de los fotones de luz. Al Blanquear lo que hacemos es calibrar el aparato para que al tomar la lectura obvие el registro de absorbancia de aquellas moléculas que no sean las que nos interesan.

La absorbancia será óptima a un largo de onda de luz específico para cada tipo de molécula [32].