

UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

Tesis previa a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
**EVALUACIÓN DEL ROL DE LA ILUMINANCIA, EL PH Y LA CANTIDAD DE
NUTRIENTES EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Scenedesmus* sp.
EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

AUTORES:

VIDAL PATRICIO PÁSTOR GUERRERO
ANDREA CONCEPCIÓN POZO CASTRO

DIRECTORA:
DIANA CALERO

Quito, julio del 2013

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros Vidal Patricio Pástor Guerrero y Andrea Concepción Pozo Castro autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, julio de 2013

(f)_____

Vidal Patricio Pástor Guerrero

CI: 171836105-6

(f)_____

Andrea Concepción Pozo Castro

CI: 040138297-3

DEDICATORIA

A nuestros Padres.

Por contar con su apoyo en todo momento, por sus consejos, sus valores, por su motivación constante que nos han permitido ser las personas que somos ahora, pero más que nada, por su amor.

A nuestros maestros.

Máster Diana Calero por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; al Ingeniero Patricio Yáñez por su apoyo ofrecido en este trabajo; a la Lic. Vismeli Santana por su tiempo y conocimientos compartidos y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, a la Lic. Anita Velasco por apoyarnos incondicionalmente en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Los resultados de esta tesis, son gracias a todas aquellas personas que, de alguna forma, permitieron de su culminación.

Nuestros sinceros agradecimientos dirigidos hacia la Lic Vismeli Santana, quien con su ayuda, nos brindó información relevante, próxima, pero muy cercana a la realidad de nuestras necesidades.

A todos quienes forman parte del laboratorio de la Universidad Politécnica Nacional CICAM, por su ayuda desinteresada en el desarrollo de nuestra tesis, por permitirnos usar sus instalaciones, sus equipos y por estar siempre prestos a nuestras necesidades, sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Pero, principalmente nuestros agradecimientos están dirigidos hacia nuestra amiga y directora de Tesis la MSC Diana Calero, sin ella no hubiésemos podido salir adelante.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. JUSTIFICACIÓN	3
CAPÍTULO II	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2.1 Tema	5
2.2 Hipótesis Y Variables	5
2.2.1 Hipótesis	5
2.2.2 Variables	6
2.3 Objetivos	7
2.4 Población y muestra	7
CAPÍTULO III	
MARCO TEÓRICO	8
3.1 Microalgas	8
3.2.1 Clases taxonómicas agrupadas dentro de microalgas	9
3.2.1.1 Bacillariophyceae	9
3.2.1.2 Cyanophyceae	9
3.2.1.3 Chlorophyceae	9
3.2.1.4 Chrysophyceae	9
3.2.1.5 Hatophyceae	10
3.2.1.6 Phyrrophyceae	10
3.2.1.7 Cryptophyceae	10
3.2.1.8 Euglenophyceae	10
3.1 Géneros de Microalgas con interés económico	11
3.1.1 <i>Chlorella</i> (Chlorophyceae)	11
3.1.2 <i>Spirulina</i> (Cyanophyceae)	11
3.1.3 <i>Dunaliella</i> (Chlorophyceae)	11
3.1.4 <i>Scenedesmus</i> (Chlorophyceae)	12
3.1.5 <i>Phaeodactylum</i> (Bacillariophyceae)	12
3.1.6 <i>Porphyridium</i> (Porphyridiophyceae)	12
3.1.7 <i>Botryococcus</i> (Trebouxiophyceae)	12
3.2 Aplicaciones adicionales de interés económico de las microalgas	13
3.3 Microalgas como fuente de biodiesel	13
3.4 Características de <i>Scenedesmus</i> sp.	16
3.5 Acumulación de lípidos de <i>Scenedesmus</i> sp.	17
3.6 Condiciones de crecimiento de las microalgas en laboratorio	19
3.6.1 Temperatura	20
3.6.2 Luz	20

3.6.2.1 Fotoperíodo	21
3.6.3 pH	22
3.6.4 Agitación	22
3.6.5 Recipientes de cultivo	23
3.7 Cinética de Crecimiento	24
3.8 Sistemas de Cultivo de Microalgas	25
3.8.1 Cultivo Discontinuo o Batch	25
3.8.2 Cultivo Continuo	30
3.8.3 Cultivo Semi-Continuo	31
3.9 Cosecha de Microalgas	31

CAPÍTULO IV

MARCO METODOLÓGICO

4.1 Diseño del Prototipo	33
4.2 Bioestimulación	34
4.3 Cálculo de Tiempo generacional y curva de crecimiento	36
4.3.1 Conteo celular mediante la Cámara de Neubauer	36
4.3.2 Gráfico de curvas de crecimiento	37
4.3.3 Tiempo Generacional	38
4.4 Método de Mantenimiento	38
4.5 Modificación de parámetros experimentales en el estudio	40
4.5.1 pH	40
4.5.2 Luz	40
4.5.3 Nutrientes	41
4.6 Interacción de los parámetros óptimos y rendimiento en peso seco	41
4.7 Tratamiento Estadístico	42

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Objetivo 1	45
5.1.1 Dimensiones del prototipo	45
5.1.2 Diseño del Prototipo	46
5.1.3 Especificaciones del material	47
5.2 Objetivo 2	48
5.2.1 Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en distintas concentraciones de medio de cultivo	48
5.2.2 Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en distintos niveles de pH	51
5.2.3 Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en distintos niveles de iluminancia	54
5.2.4 Variables óptimas para cada factor	56
5.2.5 Crecimiento de variables óptimas y variables estándar	58
5.3 Objetivo 3	60
5.3.1 Curvas de crecimiento	60
5.3.2 Resultados para tiempo Generacional	64
5.3.3 Rendimiento en peso seco	66

5.4 Tratamiento Estadístico de los Datos	67
5.4.1 Tratamiento estadístico variable nutrientes	67
5.4.2 Tratamiento estadístico variable pH	69
5.4.3 Tratamiento estadístico variable iluminancia	70
5.4.4 Tratamiento estadístico factor a comprobar mezcla mejores resultados	72
5.4.5 Tratamiento estadístico del rendimiento en peso seco	74
 CONCLUSIONES	 76
RECOMENDACIONES	78
LISTA DE REFERENCIAS	79
ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación científica	16
Tabla 2.- Descripción de las seis fases sucesivas de crecimiento para una población de algas bajo condiciones de cultivo batch	27
Tabla 3.- Composición nitrofoska foliar	35
Tabla 4.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio de nitrofoska al 5%	48
Tabla 5.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio de nitrofoska al 7.5%	49
Tabla 6.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio de nitrofoska al 10%	50
Tabla 7.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/ml) durante el periodo experimental en un medio con pH 6	51
Tabla 8.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio con pH 7	52
Tabla 9.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio con pH 8	53
Tabla 10.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio con iluminancia de 11w	54
Tabla 11.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio con iluminancia de 22w	55
Tabla 12.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) durante el periodo experimental en un medio con iluminancia de 32w	56
Tabla 13.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) al quinto día en el factor nutrientes	57
Tabla 14.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) al quinto día en el factor pH	57
Tabla 15.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) al quinto día considerando el factor iluminancia	57

Tabla 16.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) aplicando una combinación de variables óptimas	58
Tabla 17.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) aplicando una combinación de variables estándar	59
Tabla 18.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) a distintas concentraciones de nitrofoska	60
Tabla 19.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) a distintos niveles de pH	61
Tabla 20.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) a distintos niveles de iluminancia	62
Tabla 21.- Promedios de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) de las condiciones estándar vs las óptimas	63
Tabla 22.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> (cel/mL) para tiempo generacional	64
Tabla 23.- Evolución generacional para 1, 2 y 3 horas	64
Tabla 24.- Resultados para tiempo generacional horas/generación	65
Tabla 25.- Resultados rendimiento en peso seco de <i>Scenedesmus</i>	66
Tabla 26.- Test de Shapiro-Wilk para determinación de normalidad en los datos de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en distintos tipos de nutrientes	67
Tabla 27.- Resumen de datos para factor nutrientes	68
Tabla 28.- ANOVA de una vía para factor nutrientes	68
Tabla 29.- Test de Shapiro-Wilk para determinación de normalidad en los datos de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> a distintos niveles de pH	69
Tabla 30.- Resumen de datos para factor pH	69
Tabla 31.- ANOVA de una vía para factor pH	69
Tabla 32.- Test de Tukey para factor pH	70
Tabla 33.- Test de Shapiro-Wilk para determinación de normalidad en los datos de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en tres niveles de iluminancia	70
Tabla 34.- Datos utilizados en Kruskal-Wallis iluminancia	71
Tabla 35.- Test Kruskal-Wallis para crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en tres niveles de iluminancia	71

Tabla 36.- Test comparación de Kruskal-Wallis iluminancia	72
Tabla 37.- Datos tratamiento estadístico (cel/mL) factor a comprobar mezcla mejores resultados	72
Tabla 38.- Test de Shapiro-Wilk mezcla mejores resultados	73
Tabla 39.- Resumen de datos para el contraste entre mejores resultados y las condiciones estándar	73
Tabla 40.- Resultados del ANOVA de una vía para el contraste del crecimiento de <i>Scenedesmus</i> bajo condiciones óptimas (del presente estudio) y las condiciones estándar	73
Tabla 41.- Test de Shapiro-Wilk para determinación de normalidad en los datos de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en rendimiento peso seco	74
Tabla 42.- Test U de Mann-Whitney para analizar rendimiento en peso seco de <i>Scenedesmus</i> en condiciones óptimas del estudio y estándar	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Contenido de lípidos en varios géneros de microalgas	17
Figura 2.- Crecimiento de microalgas	18
Figura 3.- Cultivo por lotes (a) y las variaciones correspondientes de la tasa de crecimiento (b)	26
Figura 4.- Método de conteo celular para la cámara de Neubauer	37
Figura 5.- Promedios diarios de valores de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> entre concentraciones de nutrientes	60
Figura 6.- Promedios diarios de valores de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> a distintos niveles de pH	61
Figura 7.- Promedios diarios de valores de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> a distintos niveles de iluminancia	62
Figura 8.- Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> comparadas entre condiciones estándar vs óptimas	63
Figura 9.- Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> en ensayo de tiempo generacional	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Largo y ancho (Vista Frontal)	84
Anexo 2: Largo, ancho y alto (Vista Lateral)	84
Anexo 3: Espacio suficiente con frascos y lámparas	85
Anexo 4: Ventiladores y cartuchos de calentamiento	85
Anexos 5: Termostato	86

RESUMEN

La presente investigación trabajó con *Scenedesmus* sp., una microalga de la familia *Scenedesmaceae*. Los parámetros de crecimiento son específicos para cada especie de microalga y facilitan su posterior utilización en el ámbito industrial o de laboratorio. El objetivo de la investigación fue evaluar la influencia de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de *Scenedesmus* sp. La cepa fue obtenida del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Para la investigación se fabricó un prototipo de incubadora que se adaptara a las condiciones necesarias del cultivo. Para realizar las curvas de crecimiento y el tratamiento estadístico se midieron diariamente la cantidad de células por recipiente. El tratamiento estadístico mostró un mejor crecimiento en pH 8 e iluminancia de 32W; en concentraciones de medio de cultivo correspondientes a 5, 7.5 y 10%, no existió diferencia significativa entre grupos. Posteriormente se compararon los mejores resultados de cada variable con las condiciones estándar definidas por el manual de la FAO para cultivo de microalgas. El resultado de este ensayo tanto en crecimiento como en peso seco, mostró que existe diferencia significativa entre ambas condiciones lo que indica una mejora con las condiciones óptimas. Finalmente se estableció un ensayo por triplicado para determinar el tiempo generacional de las microalgas, que arrojó un resultado de 2,71horas por generación.

Palabras Clave: microalga, *Scenedesmus*, pH, iluminancia, concentración medio de cultivo

ABSTRACT

This research focuses on *Scenedesmus* sp. which is a microalgae of *Scenedesmaceae* family. The growth parameters are specific for each species of microalgae and facilitate subsequent use in industrial or laboratory fields. The objective of the study was to evaluate the influence of illuminance, pH and the amount of nutrients in the growth of the microalgae *Scenedesmus* sp. The strain was obtained from the Microbiology Laboratory of Catholic University of Ecuador. For the research a prototype of incubator was manufactured adapted to the conditions of cultivation. Each parameter study was replicated 8 times and maintained for 5 days as the experimental model. To perform the growth curves and the statistical treatment were measured daily for cell count per container. The statistical analysis displayed a better growth in pH 8, illuminance of 32W, and medium concentrations showed no significant difference between groups. Then we compared the best results of each variable against the standard conditions defined by FAO manual for microalgae cultivation. The result of this test shows no significant difference between these two conditions. The result of this test showed in both growth and dry weight significant difference between the two conditions, indicating an improvement in optimum conditions. Finally, it was determined by triplicate generation time test for microalgae that yielded a result of 2.71 hours per generation.

Keywords: microalgae, *Scenedesmus*, pH, illuminance, medium concentration

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos que poseen clorofila a. El interés en estos microorganismos yace en que pueden ser utilizados en varios ámbitos como alimentación, farmacéutica, cosméticos, combustibles, etc. Una parte del potencial de las microalgas es su capacidad de producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en periodos de tiempo cortos. Estos productos pueden ser procesados en biocombustibles o productos de interés económico (Richmond, 2004) (Joannis-Cassan, Spolaore, Duran, & Isambert, 2006).

El calentamiento global, ha aumentado el interés en energías alternativas como biocombustibles, energía eólica, energía solar. etc. debido principalmente al interés en producir energía limpia, reducir los niveles de emisiones de gases de efecto invernadero y eventualmente desplazar a los combustibles fósiles ya que sus reservas son cada vez más limitadas (Palomino, López, & Estrada, 2010) (Wang , Li , Wu, & Lan, 2008).

Los biocombustibles poseen ciertas ventajas frente a los combustibles fósiles convencionales, ya que son biodegradables, producen menores niveles de emisiones contaminantes, Además, poseen propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación. Actualmente el panorama de biodiesel a nivel mundial es liderado por la Unión Europea, con una producción de 8,812 millones de litros, se estima un mercado de biodiesel de 168,206 millones de litros para el 2016 (Huntley & Redalje, 2007).

Existen varias fuentes de biocombustibles como se menciona anteriormente las microalgas constituyen una de estas fuentes de materia prima. Para poder optimizar la producción de las microalgas es necesario conocer sus parámetros de crecimiento específicos. Ya que no todas las especies comparten los mismos niveles de iluminancia,

temperatura, agitación, pH, salinidad, evaporación, nutrientes (Barsanti & Gualtieri, 2006).

El interés del estudio es conocer los niveles óptimos de iluminancia, pH y cantidad de nutrientes para *Scenedesmus* que es una microalga que presenta muy buenos niveles de síntesis y acumulación de lípidos, lo cual la convierte en una especie con potencial para su uso en la industria de biocombustibles. El conocimiento de estos parámetros de crecimiento específicos permitirá un mejor rendimiento al momento de utilizar la microalga en foto bio reactores para producir ya sea biomasa o biocombustibles.

CAPÍTULO I

JUSTIFICACIÓN

Las micro y macroalgas han sido utilizadas por el ser humano desde hace cientos de años como alimento, forraje, medicamentos y fertilizantes. Los registros más antiguos muestran que las personas recolectaban macroalgas como alimento desde hace 500 años A.C. en China y un millar de años más tarde en Europa. En la actualidad más específicamente durante los últimos 30 años la producción de microalgas se ha incrementado a la par con el desarrollo de la Biotecnología. Hoy en día la producción anual de biomasa microalgal llega a alrededor de 5000 toneladas de materia seca y genera una facturación de aproximadamente 1250 millones de dólares anuales (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Borowitzka, Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, 1999).

Las microalgas se pueden definir como un grupo de microorganismos fotosintéticos de estructura celular simple, los cuales habitan en un medio acuático del cual obtienen sus nutrientes. Estos organismos poseen una tasa de crecimiento muy alta y son capaces de crear mucha más biomasa por unidad de superficie, en comparación con organismos terrestres (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Schulz, 2006).

Se considera que estos organismos poseen una gran cantidad de metabolitos con mucha utilidad para su explotación comercial. Entre los distintos campos de uso se tiene el de la nutrición humana y animal, cosméticos como lociones y cremas, biocombustibles como bioetanol y biodiesel, biorremediación de metales pesados y gases de invernadero. A pesar de esto de las 10000 especies que se estiman existen, tan solo se explotan alrededor de unas 10 (Dimitrov, 2007) (Wang , Li , Wu, & Lan, 2008).

Dentro de los géneros de microalgas de interés industrial se encuentran: *Arthrospira* (nutrición humana y animal, cosméticos y phycobiliproteínas), *Chlorella* (nutrición humana, acuacultura y cosméticos), *Dunaliella salina* (nutrición humana, cosméticos, obtención de beta-carótenos), *Aphanizomenon flos-aquae* (nutrición humana),

Haematococcus pluvialis (acuicultura, astaxantina), *Cryptothecodinium cohnii* y *Shizochytrium* (obtención de aceite DHA, ácido docosaheptaenoico un ácido graso esencial de la serie omega-3) (Pulz & Gross, 2004) (Joannis-Cassan, Spolaore, Duran, & Isambert, 2006).

Entre estas aplicaciones en estudio y desarrollo, las más importantes son la de reducción del carbono atmosférico mediante la captura de CO₂ y la producción de biocombustibles a partir de aceite de microalgas. Esta opción de bioenergía ofrece una solución económicamente factible y ambientalmente sustentable, con la ventaja añadida de que las microalgas no compiten en el mercado alimenticio (Li, Horsman, Wu, Lan, & Dubois-Calero, 2008) (Lee & Lee, 2003).

Dentro de las especies de microalgas que se encuentran en etapas de investigación para la producción de biodiesel e inmovilización de carbono se encuentran las del género *Scenedesmus*. La misma que según los estudios de factibilidad realizados, indican que este género posee un gran potencial en cuanto a la productividad de aceite y secuestro de carbono atmosférico, lo que conlleva un alto rendimiento en producción de biodiesel, ya que al ser comparado con otras especies de microalgas posee una mayor acumulación de lípidos bajo los mismos factores externos. De aquí el interés en optimizar las condiciones de crecimiento en vistas de una producción a escala industrial (Prabakaran & Ravindran, 2012) (Schulz, 2006) (Vinod , Ashish , & Guru , 2012).

Dada la utilidad que podría tener esta microalga, es de gran interés determinarlas mejores condiciones/parámetros de crecimiento específicos para dicho organismo. Dentro de estos parámetros se encuentran temperatura, nutrientes, pH, luz, aireación y agitación, los cuales no se han descrito específicamente para este género. De esta manera la presente investigación se enfoca en evaluar el efecto que tendrían la iluminancia, pH y cantidad de nutrientes en condiciones experimentales para su óptima producción.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Tema

Evaluación del rol de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en condiciones de laboratorio

2.2 Hipótesis y variables

2.2.1 Hipótesis

Hipótesis Alternativa (H1):

Por medio de la optimización de los factores de crecimiento pH, iluminancia y cantidad de nutrientes se obtiene un mejor crecimiento de la microalga

Hipótesis Nula (H0):

Por medio de la optimización de los factores de crecimiento pH, iluminancia y cantidad de nutrientes no se obtiene un crecimiento de la microalga.

2.2.2 Variables

Variable Dependiente:

Crecimiento de las microalgas.

Variable Independiente:

a. Iluminancia: con tres variaciones

12W= 560 lux

22W= 950 lux

32W= 1824 lux

b. pH: con tres valores 6, 7, 8

c. Medio de cultivo (Nitrofoska Foliar): con 3 variaciones

Concentraciones: 1kg/200L(5mL/L) - 1,5kg/200L(7,5mL/L) - 2 kg/200L(10mL/L)

Características físico-químicas: mL de nitrofoska /litro de cultivo; variación de la iluminancia medida en luxes; pH

Indicadores:

Aumento de biomasa: células /mL de cultivo

2.3 Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la influencia de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp.

Objetivos Específicos:

Diseñar y construir un prototipo de incubadora con cultivo discontinuo a nivel de laboratorio para el crecimiento de la microalga y variación de parámetros de estudio.

Estimular al alga en diferentes tratamientos modificando las variables de concentración de macro y micro nutrientes (Nitrofoska Foliar), iluminancia y pH.

Determinar las curvas de crecimiento, tiempo generacional y rendimiento en biomasa en diferentes condiciones experimentales para *Scenedesmus* sp.

2.4 Población y muestra

Población

Algas de la especie obtenidas en el laboratorio de la PUCE, Quito

Muestra

Una muestra correspondiente a 500mL (agua + algas iniciales)

Cantidad a sembrar 1×10^6 células de algas/mL

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1 Microalgas

Las microalgas se definen como microorganismos que poseen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, que es un tipo de fotosíntesis en donde el agua actúa como donante primario de electrones y se libera oxígeno, además de esta característica las microalgas poseen clorofila a. Se diferencian de otros organismos fotosintéticos como las bacterias fotosintéticas por el tipo de clorofila, y que éstas realizan una fotosíntesis de tipo anoxigénica, donde no se produce oxígeno. Considerando que las cianobacterias o algas verde-azules se incluyen dentro de las microalgas, pero a su vez se diferencian del resto de microalgas por ser procariotas, no se puede establecer un relación taxonómico (Abalde & Cid, 1995) (Parés & Juárez, 202).

Por otra parte se tiene a las microalgas eucariotas que pese a presentar una gran variación en cuanto a tamaño, forma, etc. se caracterizan por poseer todos los orgánulos correspondientes a células eucariotas y orgánulos característicos de las microalgas como son el pirenoide y la mancha ocular. El pirenoide donde se concentran enzimas y sustratos que cumplen la función de conversión y translocación de los grupos fotosintéticos; por su parte la mancha ocular es un fotorreceptor primitivo. La mayoría de microalgas poseen pared celular que puede tener una composición muy variable. En cuanto a las cianobacterias se puede decir que son mucho más simples que las microalgas eucariotas, pero estructuralmente más complejas que las bacterias. Poseen pared celular similar a las bacterias Gram-negativas, membrana celular, una región central donde se localiza el ADN y en la periferia membranas tilacoides o estructuras citoplasmáticas (Abalde & Cid, 1995) (Barsanti & Gualtieri, 2006)

A pesar de tener diferencias en su estructura las microalgas a nivel fisiológico comparten un metabolismo similar al de las plantas superiores. La reproducción de las mismas es por lo general por división binaria, con tiempos de duplicación que van desde 1h hasta 24 horas dependiendo del tipo celular. Por otra parte, la reproducción sexual por medio de diferentes tipos de gametos como isogamia, anisogamia y oogamia; tiene una frecuencia

variable pero que siempre es menor a la frecuencia de la reproducción asexual. Las cianobacterias no poseen este tipo de reproducción sexual (Abalde & Cid, 1995).

3.1.1 Clases taxonómicas agrupadas dentro de microalgas

3.1.1.1 Bacillariophyceae

Son organismos unicelulares de color pardo dorado que poseen una pared celular silíceica con poros. Se reproducen mediante división celular vegetativa. En su fotosíntesis producen carbohidratos y lípidos. Su hábitat predomina en el fitoplancton de los océanos aunque también pueden encontrarse en agua fuera de los océanos (Sheehan, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998).

3.1.1.2 Cyanophyceae

Se caracterizan por no tener núcleo claramente definido, carecen de flagelos aunque pueden presentar movimiento por mucílago. Su hábitat se encuentra en la línea costera y en estuarios. Su color característico verde azul se debe al pigmento ficocianina. Cumplen la función de la fijación de nitrógeno atmosférico. Existen alrededor de 2 mil especies conocidas (Sheehan, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998)

3.1.1.3 Chlorophyceae

Son en su mayoría microalgas de coloración verde, unicelular o pluricelular y de formas muy variables. Pueden o no poseer flagelos, se reproducen por zoosporas o aplanosporas. La mayoría de las especies microscópicas son propias de agua dulce, aunque hay numerosos grupos marinos (Sheehan, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998)

3.1.1.4 Chrysophyceae

Este grupo de algas es similar a las Diatomeas (Bacillariophyceae) en su composición bioquímica y pigmentación. Tiene sistemas de pigmentación más complejos, que pueden ser doradas o verdes. Presentan por lo general flagelos. Carecen de pirenoides y se

reproducen por fisión o por gemación. Su hábitat se encuentra principalmente en sistemas de aguas continentales (Sheehan, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998)

3.1.1.5 Hatophyceae

Son similares a las crisofíceas en su pigmentación, flagelos y nutrición. Son células biflageladas. Presentan en su pared celular escamas orgánicas. Su importancia radica en que constituyen una gran parte del fitoplancton (Valenzuela , 1999).

3.1.1.6 Phyrrophyceae

Son algas marinas en su mayoría unicelulares con dos flagelos. La célula puede o no presentar una cubierta o estar desnuda. Poseen elementos de reserva como almidón y material lipídico. Su interés ecológico radica en que constituyen los florecimientos de algas llamados mareas rojas (Valenzuela , 1999).

3.1.1.7 Cryptophyceae

Son células móviles desnudas que presentan dos flagelos. Pueden presentar pirenoides y su reproducción es mediante bipartición. Su hábitat comprende tanto aguas marinas como continentales (Valenzuela , 1999)

3.1.1.8 Euglenophyceae

Son organismos unicelulares móviles, cuya característica más distintiva es la presencia de una mancha de pigmento fotosensible. Estas disponen de uno o de dos flagelos lo cual les permite cambiar su forma; se multiplican por división longitudinal. Su hábitat comprende tanto aguas dulces como salobres (Valenzuela , 1999)

3.2 Géneros de Microalgas con interés económico

3.2.1 *Chlorella*(Chlorophyceae)

La producción comercial de *Chlorella* está relativamente extendida por el sureste asiático. Se utiliza principalmente *C. pyrenoidosa* y *C. elipsoidea*. La biomasa se obtiene de forma heterotrófica como autotrófica. El producto de *Chlorella* se distribuye comercialmente como polvo o píldoras. También se ha propuesto como productora de almidón a nivel comercial, y luteína (Chu, 2012) (Priyadarshani & Rath, 2012).

3.2.2 *Spirulina*(Cyanophyceae)

La producción de esta microalga a nivel comercial se da en países como México, Taiwán, Tailandia, California, Japón, Israel y la India. En México se cultiva la especie *S. maxima* la cual es utilizada como complemento alimenticio en la dieta humana por su alto contenido de proteína, además de presentar vitaminas y minerales (Chu, 2012).

Dentro de las aplicaciones clínicas de este género están:

- alimento terapéutico de niños y adultos
- tratamiento cicatrizante
- estimulación tiroidea
- tratamiento del cáncer mediante la estimulación del sistema inmunológico por medio del pigmento ficocianina
- protección contra el cáncer por medio de β -carotenos
- estimulación de las prostaglandinas por su contenido en ácido γ -linoleico (GLA)

3.2.3 *Dunaliella*(Chlorophyceae)

Dentro de este género se citan a las siguientes especies *D. salina*, *D. parva* y *D. viridis*. Los principales productos de estas especies son β -caroteno, glicerol (que se puede acumular hasta en un 40% de su peso seco) y proteína. Además de extraerse luteína que incrementa el color amarillo de la yema del huevo. Por otra parte también ha sido

posible extraer sustancias intermediarias de la ruta del β -caroteno para su comercialización.

Otros posibles usos comerciales lo constituyen distintos compuestos bioquímicos como enzimas, vitaminas, ácidos grasos y reguladores del crecimiento (Priyadarshani & Rath, 2012)

3.2.4 *Scenedesmus* (Chlorophyceae)

La especie más utilizada comercialmente es la *S. acuatatus* que se usa como complemento dietético tanto en humanos y animales, por su alto contenido proteínico. También se han aislado algunos compuestos de interés para la industria de perfumes. Un uso particular es un ungüento al 20% en extracto alcohólico de esta especie que sirve para tratar úlceras de la piel quemaduras y heridas (Priyadarshani & Rath, 2012)

3.2.5 *Phaeodactylum* (Bacillariophyceae)

La principal especie de interés es *P. tricornutum* que puede acumular gran cantidad de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno. Por lo general en *Phaeodactylum* contiene grandes cantidades de ácido palmítico y hexadecanoico, ácidos polienoicos y en menor cantidad ácido linolénico. Este género tiene la ventaja de poder desarrollarse en cultivos muy densos con tasas de producción altas (Chu, 2012).

3.2.6 *Porphyridium* (Porphyridiophyceae)

Dentro de las especies de interés se encuentran *P. cruentum* que es una fuente de ácido araquidónico, de los pigmentos ficocianina y ficoeritrina y *P. aerugineum*. que produce un polisacárido con propiedades gelificantes que se utiliza en la extracción de petróleo en zonas arenosas (Abalde & Cid, 1995).

3.2.7 *Botryococcus* (Trebouxiophyceae)

La especie con mayor importancia comercial la representa *B. braunii* ya que posee la capacidad de acumular grandes cantidades de hidrocarburos que tienen una longitud de cadenas entre C17 y C31 que sirven como lubricantes y fuente de combustibles renovables (Barsanti & Gualtieri, 2006).

3.3 Aplicaciones adicionales de interés económico de las microalgas

- Fuente de EPA (ácido eicosapentanoico): *Heteromastix*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Amphora*, *Ditylum*, *Lauderia*, *Asterionella*, *Pseudopedinella*, *Emiliana*, *Isochrysis*, *Prorocentrum* (Abalde y Cid, 1995).
- Fuente de antibióticos: *Gomphosphaeria*, *Scytonema*, *Chlorella*, *Ochromonas dánica*, *Stichoccus mirabilis*, *Asterionella japónica* (Abalde & Cid, 1995) (Barsanti & Gualtieri, 2006).
- Fertilizantes: *Phymatolithon calcareum*, *Lithothamnion coralloides*, *Sargassum* spp., *Ascophyllum nodosum*, *Nostoc*, *Tolypothrix* (Barsanti & Gualtieri, 2006)
- Fuente de ácidos linoleico y linolénico: *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Prymnesium*, *Isochrysis*, *Dicrateria* (Abalde & Cid, 1995).
- Fuente de enzimas de restricción: *Anabaena*, *Maticladus laminosus* y *Microcoleus* (Abalde & Cid, 1995).
- Productoras de metano: *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Euglena*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Melosira*, *Oscillatoria*, *Anabaena* (Abalde & Cid, 1995)

3.4 Microalgas como fuente de biodiesel

Es importante conocer la utilidad que podría tener la microalga *Scenedesmus* como una fuente para la producción de biodiesel, mismo que consiste en monoalquilésteres de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable y que es capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo como combustible (Liu & Zhao, 2007) (Song, Fu, & Shi, 2008)

La producción de bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años cincuenta; sin embargo sólo, a partir de la crisis energética de 1975, el potencial económico de esta tecnología fue reconocido por varios países como Estados Unidos, Japón y Australia. Desde el año 1978 hasta 1996 la Oficina de Desarrollo de

Combustibles del Departamento de Energía de los Estados Unidos desarrolló un programa de investigación para producir biodiesel a partir de algas. Este programa investigó la acumulación de altos niveles de lípidos para asimilar las emisiones de dióxido de carbono producidas por las centrales eléctricas. En este ensayo trabajó con alrededor de 3000 especies de las cuales 300 se declararon como especies de interés para esta aplicación (Damien, 2010) (Sheehan, Dunahay, Benemann, & Roessler, 1998).

Para comprender la relación entre los biocombustibles y las microalgas como fuente primaria de estos, se debe comprender como se produce el biocombustible y cuales son sus fuentes de materia prima. El biodiesel se obtiene mediante la reacción de transesterificación de aceites naturales, por medio de un alcohol (metanol, etanol, propanol o butanol) que da como resultado biodiesel y glicerol como producto residual. Actualmente, la principal fuente de estos aceites naturales proviene de cultivos energéticos como palma, colza, maíz, girasol, etc. Pero esta clase de materia prima posee dos limitaciones muy importantes como son la utilización de grandes extensiones de tierra cultivable, y la cantidad de agua necesaria para riego de los mismos. Para poder superar estas limitaciones la utilización de microalgas oleaginosas se presenta como una alternativa viable de materia prima para la producción de biocombustibles. Las microalgas producen aceite en cantidades que pueden ir hasta en un 80% de su peso seco, aunque comúnmente los valores se encuentran en rangos de 20-50% de peso seco. Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol formados por ácidos grasos con cadenas de 14-20 átomos de carbono. Estos ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, y es justamente la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como: ácido eicosapentaenoico, ácido arachidónico, ácido linoleico y ácido linolénico, lo que le confiere las características deseables para poder producir biodiesel, ya que permite disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetanos, poder calorífico y estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo, viscosidad y lubricidad (Albarracín, 2007) (Sharma, Singh, & Upadhyay, 2008).

En la actualidad se ha detectado que el uso de lípidos microalgales como los presentes en *Scenedesmus* sp., constituye una alternativa para la producción de biodiesel, que podría asegurar el reemplazo de la demanda de petro diesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes; períodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas. Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales. Igualmente, el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Chisti, 2008) (Fernández, 2010).

El fenómeno de limitación de nutrientes tiene distintas características específicas dependiente del nutriente limitado, aunque también ocasiona efectos generales como cambios morfológicos, interrupción de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos. El caso de limitación de nitrógeno, es considerado como la principal vía para que una microalga pueda acumular gran cantidad de lípidos en especial triglicéridos. Esta acumulación también se puede lograr mediante la restricción de fósforo, azufre y silicio. Otro factor que también puede afectar el contenido de lípidos es el Hierro aunque el mecanismo de acción es desconocido. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es ampliamente variable y por lo tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales (Dismukes, Carrieri, & Bennette, 2008).

3.5 Características de *Scenedesmus* sp.

TABLA No.1
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE *Scenedesmus* sp.

Reino	Plantae
División	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Género	<i>Scenedesmus</i>
Especie	<i>Scenedesmus</i> sp.

Fuente: Bold y Alexopoulos, 1987

En términos generales, *Scenedesmus* es uno de los géneros más comunes de algas de agua dulce, que comprende cientos de especies, y pertenece a la familia *Scenedesmaceae*. *Scenedesmus* agrupa pequeñas algas verdes coloniales inmóviles, constituidas de células alineadas en forma de placa aplanada. Las colonias suelen tener en su mayoría de dos a cuatro células, pero esto puede variar hasta valores de 8, 16, o 32 células en raras ocasiones, así mismo pueden encontrarse en formas unicelulares. Las células son generalmente de forma cilíndrica, aunque existen también formas semilunares, ovoideas o fusiformes. Normalmente, cada célula que se encuentra ubicada en un extremo posee de una a dos espinas de hasta 200 μm de longitud que sobresalen de sus esquinas exteriores, en otros casos las células pueden tener espinas o cerdas adicionales compuestas de quitina. Las paredes celulares pueden estar cubiertas de granulaciones o reticulaciones que se ven mejor con microscopía electrónica de barrido (Guiry, 2013) (Encyclopedia-Britannica, 2013).

La reproducción es comúnmente de forma asexual por medio de autosporas que se encuentran en el esporangio en un número de 2 a 32; la liberación de las esporas se da por medio de la ruptura de la pared celular de las células madre. La reproducción sexual es extremadamente rara y solo se ha reportado en *S. obliquus*. La temperatura óptima varía desde 28-30 °C, pero en algunas cepas o variedades puede llegar hasta los 36 °C o más. Algunas especies de *Scenedesmus* son altamente polimórficas produciendo una gran variación inducida por las diversas condiciones de cultivo. Algunos parámetros de

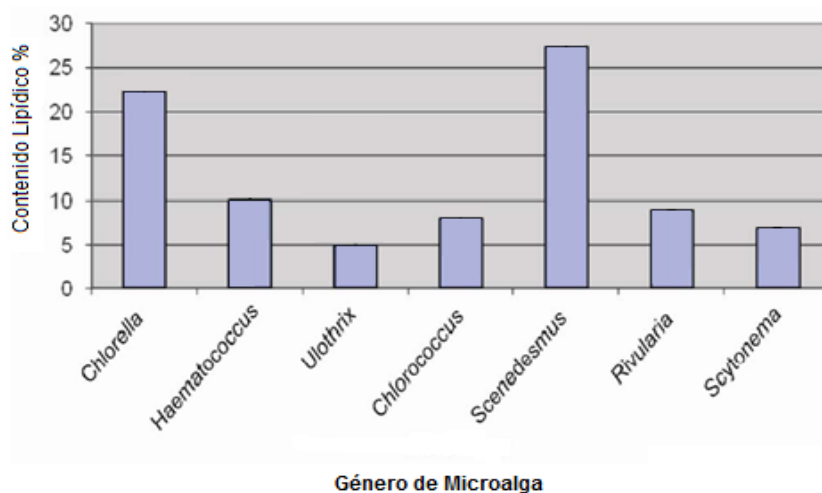
cultivo pueden ser similares al comportamiento del género *Dactylococcus* o *Lagerheimia* spp. (Guiry, 2013) (Bold & Alexopoulos, 1987).

3.6 Acumulación de lípidos de *Scenedesmus* sp.

La selección de *Scenedesmus* sp. para este estudio obedece a la posibilidad de usar esta cepa en la producción de biodiesel por medio de su aceite. Ésta es una de entre tantas especies de microalgas que tiene capacidad de producir lípidos, pero según el estudio de Prabakaran y Ravindran (2012) presenta mejores características en cuanto a producción de lípidos; lo cual queda demostrado a través de los estudios de comparación de potencialidad de distintas especies en condiciones de laboratorio.

La figura 1 presenta varias clases de microalgas respecto al contenido de lípidos de cada una, siendo el género *Scenedesmus* la que contiene mayor porcentaje de lípidos, frente a las demás (Prabakaran & Ravindran, 2012)

FIGURA No 1.
CONTENIDO DE LÍPIDOS EN VARIOS GÉNEROS DE MICROALGAS

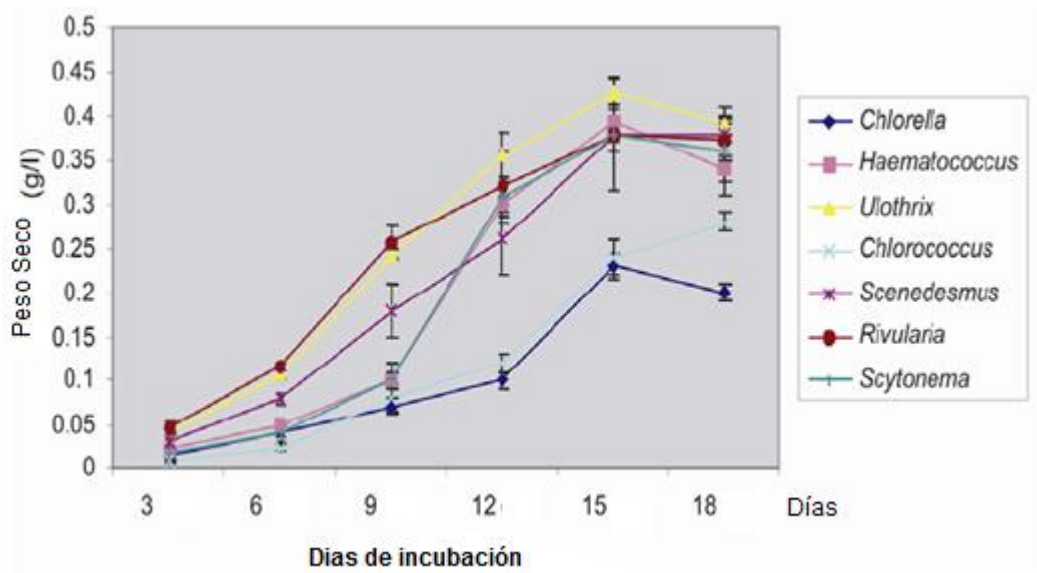


Fuente: Prabakaran y Ravindran, 2012

En la figura 2 se observa una comparación de la masa seca obtenida versus los días de incubación, estos datos fueron obtenidos de un estudio comparativo para determinar si

existe un potencial de producción de biodiesel, por lo cual podemos ver que los valores de *Scenedesmus* se encuentran en un rango medio. Como resultado del estudio de potencialidad en producción de biodiesel, se encontró que bajo condiciones de laboratorio *Scenedesmus* sp. produce la mayor cantidad de ácidos grasos con un valor de 22.29 mg g^{-1} peso seco, un contenido de lípidos de $27.4 \pm 0.75\% \text{ mg g}^{-1}$ peso seco y 11.77 mg g^{-1} peso seco de ácido oleico. De esta manera, se llega a la conclusión de que *Scenedesmus* sp. es un género con alto valor en la producción de aceite y por consecuencia biodiesel (Prabakaran & Ravindran, 2012)

FIGURA No 2.
CRECIMIENTO DE MICROALGAS.



Fuente: Prabakaran y Ravindran, 2012

3.7 Condiciones de crecimiento de las microalgas en laboratorio

Un cultivo de microalgas tiene tres componentes distintos: el medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado, las microalgas que crecen en el medio, aire para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera (Barsanti & Gualtieri, 2006)

Para un alga autótrofa por completo, todo lo que se necesita para el crecimiento es luz, CO₂, agua, nutrientes y oligoelementos. Por medio de la fotosíntesis el alga será capaz de sintetizar todos los compuestos bioquímicos necesarios para su crecimiento. Sólo una minoría de las algas es totalmente autótrofa (por ejemplo las algas verde azuladas), y muchas son incapaces de sintetizar ciertos compuestos bioquímicos (algunas vitaminas, por ejemplo) y se requiere que estén presentes en el medio (Borowitzka , 1997)

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de algas son la cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, la turbulencia, la salinidad y la temperatura. Los niveles óptimos de cada parámetro, así como los rangos tolerados son específicos para cada especie, varios de estos factores pueden ser interdependientes y un parámetro que es óptimo para un conjunto de condiciones no es necesariamente óptimo para otro. Por ejemplo en *Chlorella sorokiniana* los parámetros óptimos para condiciones no axénicas son pH entre 6 y 9, temperatura de 30°C y ausencia de salinidad; en cuanto a *Botryococcus braunii* ha demostrado un mejor crecimiento a temperatura de 23 ° C, intensidad de luz de 60 W/m², con un período de luz de 12 horas por día, y una salinidad de NaCl 0,15 molar; en especies de *Arthrospirasus* condiciones óptimas se han alcanzado en intensidad lumínica 150–200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH 9.5-9.8, rango de temperatura de 35–38°C. (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Moronta & Mora, 2006) (Romo, 2002) (Quin, 2005).

Los parámetros generalizados en el cultivo de microalgas según el manual de la FAO, son temperatura de 28°C, pH 8, 1000 lux para frascos erlenmeyer (Lavens & Sorgeloos, 1996).

3.7.1 Temperatura

La temperatura a la que los cultivos se mantienen idealmente debería estar tan cerca como sea posible a la temperatura a la que los organismos fueron recolectados; organismos polares ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$), templados ($10\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$); tropical ($>20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las especies más comúnmente cultivadas de microalgas toleran temperaturas entre 16 y $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque esto puede variar con la composición del medio de cultivo, las especies, y la cepa cultivada. Un valor intermedio de $18\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ es el más empleado. La temperatura se controla en incubadoras que suelen utilizar temperatura constante, aunque algunos modelos permiten ciclos de temperatura. Temperaturas inferiores a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ralentizarán el crecimiento, mientras que las superiores a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ son letales para una serie de especies (Barsanti & Gualtieri, 2006)

3.7.2 Luz

La luz es la fuente de energía que activa las reacciones fotosintéticas en las algas y donde influye la intensidad, la calidad espectral, y el fotoperíodo. La intensidad de la luz juega un papel importante, pero los requisitos varían mucho con la profundidad y la densidad del cultivo de algas: a mayores profundidades y concentraciones celulares la intensidad de la luz debe aumentar para lograr penetrar a través del cultivo. La intensidad de luz demasiado alta puede dar lugar a la fotoinhibición. Las intensidades de luz más frecuentemente empleadas oscilan entre 100 y $200\text{ }\mu\text{E sec}^{-1}\text{ m}^{-2}$ (microeinsteins), que corresponden a aproximadamente el 5-10% de plena luz del día ($2000\text{ }\mu\text{E sec}^{-1}\text{ m}^{-2}$) (Borowitzka, 1997)

Además, el sobrecalentamiento debido a la iluminación natural y artificial debe ser evitado. La luz puede ser natural o suministrada por los tubos fluorescentes que emitan luz ya sea en el espectro azul o rojo, ya que éstas son las porciones más activas del espectro de la luz para la fotosíntesis. La intensidad y la calidad de la luz pueden ser manipuladas con filtros. Muchas especies de microalgas no crecen bien bajo iluminación constante, a pesar de que por ejemplo el fitoplancton cultivado puede desarrollarse normalmente bajo iluminación constante, y por lo tanto, un ciclo de luz / oscuridad se

utiliza (máximo 16:8, usualmente 14:10 o 12:12) (Barsanti & Gualtieri, 2006); (González, 2000).

3.7.2.1 Fotoperíodo

La alternancia de período de luz y oscuridad es lo que se conoce normalmente como fotoperíodo, esta característica es utilizada en los cultivos de microalgas (Abalde & Cid, 1995)

En el fotoperíodo se pueden observar distintos aspectos fisiológicos de las microalgas como:

- División celular: en muchas especies la mayoría de células se dividen en un determinado momento del día o de la noche.
- Capacidad fotosintética: Las tasa máximas se alcanzan en la mañana y las mínimas en la noche.
- Absorción de nutrientes: Las tasas de absorción de nitrógeno y fosforo son mayores en el día.
- Bioluminiscencia: Se presenta generalmente en un pico nocturno.

Existen distintas adaptaciones al cambio en los ciclos de luz y sombra, a nivel de pigmentos que van acompañados en cambios de respuesta fotosintética. Se pueden distinguir dos tipos de reacción, las del tipo *Chlorella* en donde hay una relación inversa entre intensidad de luz y el contenido de clorofila α ., y el tipo *Cyclotella* en donde existe también una relación inversa pero en este caso entre la intensidad lumínica y la actividad o concentración enzimática fotosintética. Además de estas respuestas a la adaptación, también existen cambios en unidades fotosintéticas donde puede cambiar el tamaño o el número de unidades pero no ambas. Este tipo de estrategias son efectivas para captar y transferir energía lumínica. Otras estrategias de ajuste con cambios en el espectro de absorción de la clorofila α y en la curva de fotosíntesis frente a la intensidad de luz (Abalde & Cid, 1995).

Otro punto importante en cuanto al fotoperíodo es la necesidad de incluir el período de oscuridad, ya que se ha demostrado en experimentos de luz continua, la eficacia de incluir períodos de oscuridad en el ciclo de cultivo. Esto se explica ya que microalgas que han sido cultivadas en períodos de luz-oscuridad son más eficientes para absorber luz como se vio anteriormente en las estrategias de adaptación, comparando estas microalgas con otras que han sido cultivadas en períodos de luz continua, que no poseen estas características de adaptación (Barsanti & Gualtieri, 2006).

3.7.3 pH

El intervalo de pH para las especies de algas más cultivadas es entre 7 y 9, con la gama óptima de 8.2-8.7, aunque hay especies que habitan en medios más ácidos o básicos. El colapso del cultivo puede ser causado por la interrupción de varios procesos celulares, como la asimilación de nitratos y amonio, inhibición del crecimiento celular, metabolismo por insolubilidad del CO_2 y de minerales; que pueden resultar en la incapacidad de mantener un pH aceptable. Esto último se logra mediante la aireación del cultivo. En el caso de cultivo de algas de alta densidad, la adición de dióxido de carbono permite corregir el aumento de pH, que puede alcanzar valores limitantes mayores a un pH 9 durante el crecimiento de algas (González, 2000) (Borowitzka, 1997).

3.7.4 Agitación

La agitación es necesaria entre otras razones para evitar la sedimentación de las algas, asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y nutrientes, evitar la estratificación térmica (por ejemplo, en cultivos al aire libre), mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. Esta última es de gran importancia, ya que el aire contiene la fuente de carbono para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono. Para cultivos muy densos, el CO_2 procedente del aire (que contiene 0.039% CO_2 según la NASA) que se inyecta en el cultivo es un factor limitante para el crecimiento de las algas y el dióxido de carbono puro puede ser complementado

para el suministro de aire (por ejemplo, a una tasa de 1% del volumen de aire). La adición de CO_2 actúa como buffer el agua contra los cambios de pH como consecuencia del equilibrio de CO_2/HCO_3 . Adicionalmente, la agitación del cultivo de microalgas puede ser necesaria en ciertas circunstancias: cuando las células se deben mantener en suspensión con el fin de crecer (particularmente importante para los dinoflagelados heterótrofos); en cultivos concentrados para prevenir los efectos de limitación de nutrientes debido al apilamiento de células y aumentar la difusión de gas. Cabe señalar que las células en el océano rara vez experimentan turbulencia, y por lo tanto la mezcla debe ser suave (Barsanti & Gualtieri, 2006) (NASA, 2013).

Dependiendo de la escala del sistema de cultivo, la mezcla se consigue por agitación manual diaria (tubos de ensayo, erlenmeyers), aireación (bolsas, tanques), el uso de ruedas de paleta y bombas de aire (lagunas). No todas las especies de algas pueden tolerar una mezcla vigorosa. Los siguientes métodos pueden ser utilizados: burbujas de aire (puedan dañar las células); rueda de plancton o placa de agitación y agitación manual suave. La mayoría de cepas crecen bien sin mezcla, sobre todo cuando no están demasiado concentradas, pero siempre que sea posible se recomienda agitación manual suave (una vez al día) (Borowitzka, 1997) (Romo, 2002).

3.7.5 Recipientes de cultivo

Los recipientes de cultivo deben tener las siguientes propiedades: no ser tóxicos (químicamente inertes); razonablemente transparentes a la luz; de fácil limpieza y esterilización; y proporcionar una gran superficie en relación al volumen (dependiendo del organismo). Ciertos materiales que potencialmente podrían ser utilizados como recipientes de cultivo pueden lixiviar los productos químicos que tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento de algas en el medio. El uso de materiales químicamente inertes es particularmente importante en el cultivo de plancton oceánico y durante el aislamiento. Materiales recomendados para recipientes de cultivo y de preparación de los medios de comunicación incluyen teflón, policarbonato, poliestireno, y vidrio de borosilicato. Los recipientes de cultivo son generalmente de vidrio de borosilicato en

forma de matraces cónicos (matraces Erlenmeyer) de varios volúmenes (de decenas de mililitros a 3-5 L) o los tubos de ensayo para cultivo líquido y en agar. Otra opción para recipientes de cultivo lo constituyen los vasos transparentes de policarbonato que tiene un mayor costo, e igualmente ofrecen una excelente claridad y buena resistencia. Como el borosilicato, el policarbonato es esterilizable en autoclave, pero se vuelve turbio y se cuartea con el uso en el autoclave. El teflón es muy costoso y se utiliza sólo para la preparación de medios y el poliestireno es la alternativa más barata al teflón y policarbonato, pero no es autoclavable (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Coutteau, 2006).

3.8 Cinética de Crecimiento

Para comprender de mejor manera los sistemas de cultivo, en primera instancia se debe conocer los conceptos del ciclo de crecimiento en las microalgas, caracterizado por presentar distintas fases (Romo, 2002):

- **Fase lag o fase de adaptación:** no ocurre incremento en el número de células pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial.
- **Fase log o fase exponencial:** una vez adaptadas al medio de cultivo las microalgas comienzan a multiplicarse, ya que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse el aumento en número de microalgas se acelera continuamente de manera exponencial.
- **Fase de declinación relativa de crecimiento** en este caso conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular.
- **Fase estacionaria** esta fase se caracteriza por una falta de apreciación de la división celular, ya que el número de células se mantiene constante por cierto período de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.

- **Fase de muerte:** las células pueden durar en la fase estacionaria anterior semanas e incluso meses aunque lo más normal es que comiencen a morir, es entonces cuando se presenta esta fase.

3.9 Sistemas de Cultivo de Microalgas

3.9.1 Cultivo Discontinuo o Batch

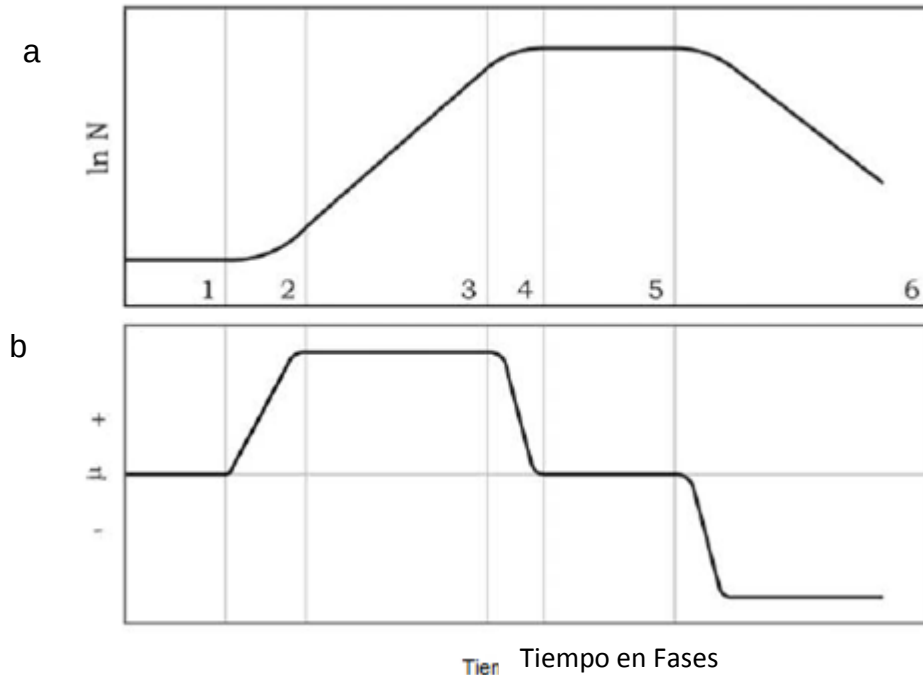
El sistema de cultivo para microalgas más común es el cultivo por lotes (llamado así porque se realiza por tandas de contenido), por su simplicidad y bajo costo. Debido a estas ventajas es el método a utilizar en el ensayo. Es un sistema cerrado, de volumen limitado, en el que no hay ninguna entrada o salida de materiales, es decir, los recursos son limitados. La densidad de la población de microalgas aumenta constantemente hasta el agotamiento de algún factor limitante, mientras que otros componentes nutritivos disminuyen con el tiempo. Cualquiera de los productos producidos por las células durante el crecimiento también aumenta en la concentración del medio de cultivo. Una vez que los recursos han sido utilizados por las células, el cultivo muere a menos que se suministre un nuevo medio. En la práctica esto se hace mediante el subcultivo, es decir, la transferencia de un pequeño volumen de cultivo existente a un gran volumen de medio de cultivo fresco a intervalos regulares (Richmond, 2004) (Thompson, 2007).

En este método a las microalgas se les permite crecer y reproducirse en un recipiente cerrado. Un cultivo discontinuo típico puede ser un frasco de cultivo de 250 mL (Erlenmeyer) con un tapón de algodón / gasa, en algunos casos el tapón puede ser equipado con una pipeta Pasteur y se burbujea aire en el medio para mantener altos niveles de oxígeno, dióxido de carbono y a su vez proporcionar agitación (Thompson, 2007)

Los sistemas de cultivo por lote son muy dinámicos. La población muestra un patrón típico de crecimiento de acuerdo con una curva sigmoide al inicio (Figura 3a), que consiste en una secuencia de seis fases, que se caracteriza por las variaciones en la tasa de crecimiento (Figura 3b); las seis fases se resumen en la Tabla No 2. La curva de

crecimiento, con relación a las Fases 3, 4 y 5, sin las fases de adaptación, aceleración y muerte, se puede describir con una función hiperbólica rectangular similar a la formulación de Michaelis-Menten que describe la cinética de absorción de nutrientes y la relación dinámica entre la tasa fotosintética y la radiación (Andersen, 2005); (Barsanti & Gualtieri, 2006)

FIGURA No 3.
CURVA DE CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE ALGAS EN
CONDICIONES DE CULTIVO POR LOTES (a) Y LAS VARIACIONES
CORRESPONDIENTES DE LA TASA DE CRECIMIENTO (b)



1 Fase de adaptación, 2 fase aceleración, 3 fase exponencial, 4 fase desaceleración, 5 fase estacionaria y 6 fase descenso

Fuente: Barsanti y Gualtieri, 2006

La explicación de cada fase se detalla en la siguiente tabla 2.

TABLA No 2.
DESCRIPCIÓN DE LAS SEIS FASES SUCESIVAS DE CRECIMIENTO
PARA UNA POBLACIÓN DE ALGAS BAJO CONDICIONES DE
CULTIVO BATCH

Fase	Nombre de la Fase	Interpretación de la tasa de crecimiento	Descripción
1	Adaptación	Cero	Adaptación fisiológica del inoculo al cambio de condiciones
2	Aceleración	Incremento celular leve	No es considerable
3	Exponencial	Constante	Crecimiento del población, cambia el entorno de las células
4	Desaceleración	Disminución	Efectos de las condiciones cambiantes
5	Estacionaria	Cero	Uno o más nutrientes se agotan hasta el umbral de crecimiento de las células
6	Descenso	Negativo	La duración de la fase estacionaria y la tasa de disminución son fuertemente dependientes de la clase de organismos

Fuente: Barsanti y Gualtieri, 2006

Después de la inoculación, el crecimiento no necesariamente comienza inmediatamente, porque la mayoría de las células pueden ser viables, pero no están en condiciones de dividirse. El intervalo necesario para que las células transferidas puedan adaptarse a la nueva situación y empezar a crecer es la primera fase de la curva de crecimiento, la fase de adaptación. Esta fase de adaptación o de inducción es relativamente larga cuando un cultivo de algas se transfiere de una placa a un cultivo líquido. Los cultivos inoculados con algas que crecen exponencialmente tienen fases cortas de adaptación, que puede reducir seriamente el tiempo necesario para su escalamiento. El retraso en el crecimiento se atribuye a la adaptación fisiológica del metabolismo de la célula para el crecimiento, tales como el aumento de los niveles de enzimas y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono. Durante esta fase la tasa de crecimiento es cero. Después de una corta fase de aceleración del crecimiento, que se caracteriza por una tasa

de crecimiento que aumenta continuamente, hasta su valor máximo, que se consigue en la fase exponencial siguiente, la densidad celular aumenta como una función del tiempo t de acuerdo con la función exponencial:

$$N_2 = N_1 \cdot e^{\mu t} \text{ (Richmond, 2004)}$$

en donde N_2 y N_1 son respectivamente, el número de células en dos momentos sucesivos y μ es la tasa de crecimiento. Durante esta fase, la tasa de crecimiento alcanzado se mantiene constante. La tasa de crecimiento depende principalmente de las especies de algas y de los parámetros de cultivo, tales como la intensidad de la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Richmond, 2004) (Barsanti & Gualtieri, 2006). (Lavens & Sorgeloos, 1996)

La fase de crecimiento exponencial normalmente tiene una duración de un período muy corto, ya que las células comienzan a sombrear las unas a las otras a medida que aumenta su concentración. Por lo tanto, el cultivo entra en la fase desaceleración, y la tasa de crecimiento de las células disminuye debido a que los nutrientes, además de la luz, pH, dióxido de carbono, y otros factores físicos y químicos empiezan a limitar el crecimiento. Después de esta fase, la población de células continúa aumentando, pero la tasa de crecimiento disminuye hasta llegar a cero, en cuyo punto el cultivo entra en la fase estacionaria, durante la cual la concentración celular se mantiene constante en su valor máximo. La etapa final del cultivo es la muerte o "colapso", caracterizada por una tasa de crecimiento negativo, durante esta fase se deteriora la calidad del agua, principalmente debido a la acumulación de catabolitos, y los nutrientes se han bajado a un nivel incapaz de sostener el crecimiento. La densidad celular disminuye rápidamente y el cultivo eventualmente colapsa (Barsanti & Gualtieri, 2006) (Lavens & Sorgeloos, 1996).

En la práctica, los cultivos colapsan por una variedad de razones, incluyendo el agotamiento de un nutriente, la deficiencia de oxígeno, alteración del sobrecalentamiento, pH, o la contaminación. La clave para el éxito de la producción de algas es el mantenimiento de todos los cultivos en la fase exponencial de crecimiento. Además, el valor nutricional de las algas producidas es inferior, una vez que el cultivo

está más allá de la fase 4 debido a la digestibilidad reducida, composición deficiente, y la posible producción de metabolitos tóxicos.

En los cultivos discontinuos, las propiedades celulares tales como el tamaño, la composición de nutrientes interna, y la función metabólica varía considerablemente durante las fases de crecimiento. Esto a menudo puede dificultar la interpretación de los resultados. Durante la fase de crecimiento exponencial, las propiedades de las células tienden a ser constantes. Sin embargo, esta fase normalmente dura sólo un corto período de tiempo, y si se desea estimar las tasas de crecimiento de la fase exponencial de cultivos en lote, el muestreo diario parece ser insuficiente para permitir una estimación razonablemente precisa. Además, la precisión de la determinación de la tasa de crecimiento es mayor en los medios artificiales, definida en comparación con las células cultivadas en medios naturales de agua superficial (Andersen, 2005) (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Una ventaja significativa de los sistemas de cultivo discontinuo es su simplicidad operacional. Los recipientes de cultivo más a menudo consisten en un matraz Erlenmeyer con una muestra de volumen menor a la cantidad total del envase con el fin de evitar la limitación de dióxido de carbono. Los sistemas de cultivo por lote se aplican ampliamente debido a su simplicidad y flexibilidad, porque permite cambiar las especies y para remediar los defectos en el sistema rápidamente. Aunque a menudo se considera como el método más fiable, no es necesariamente el método más eficiente (Andersen, 2005)

Los cultivos discontinuos se cosechan justo antes de la iniciación de la fase estacionaria y por lo tanto siempre deben ser mantenidos durante un período sustancial de tiempo más allá de la tasa de crecimiento máximo. Además, la calidad de las células recolectadas puede ser menos predecible que en los sistemas continuos y, por ejemplo, varían en el tiempo de la cosecha (tiempo del día, fase de crecimiento exacta). Otra desventaja es la necesidad de evitar la contaminación durante la inoculación inicial y el período de crecimiento temprano. Por ejemplo, en el caso del fitoplancton, debido a que

la densidad poblacional deseada es baja y la concentración de nutrientes es alta, cualquier contaminante con una tasa de crecimiento más rápido es capaz de rebasar al cultivo. Los cultivos discontinuos también requieren una gran cantidad de mano de obra para cosechar, limpiar, esterilizar, llenar, e inocular los recipientes (Barsanti & Gualtieri, 2006)

3.9.2 Cultivo Continuo

Es aquel tipo de cultivo en el cual se mantiene la fase de crecimiento exponencial durante largos períodos de tiempo. Esto se logra al añadir nutrientes para compensar los que se retiran del medio, lo que obtiene parámetros de crecimiento y población de células constantes. En este tipo de cultivo el factor que controla el crecimiento es la tasa a la que se añade el medio fresco. La configuración general que sigue este tipo de cultivo es: el medio de cultivo fresco se almacena en un gran recipiente. Se bombea aire en el espacio aéreo en este recipiente de medio, esto produce la presión de aire que enviará el medio al recipiente de cultivo mediante una tubería. Mediante la apertura y el cierre de la llave en esta tubería se puede añadir medio al recipiente de cultivo. El aire también se bombea en el recipiente de cultivo, este aire pasa a través de un tubo largo de vidrio a la parte inferior del cultivo y se produce un burbujeo ascendente. Esto sirve para mantener el cultivo en agitación, así como para asegurar altas tasas de oxígeno y CO₂. El aire fluye en el recipiente de cultivo hacia afuera a través de un tubo de salida. A medida que se añade medio fresco al recipiente de cultivo el nivel del líquido en el recipiente se eleva; hasta que alcanza el tubo de salida, en donde fluyen tanto medio de cultivo viejo y células hacia el recipiente de residuos. Existe otro tubo de vidrio en el recipiente de cultivo, que constituye el puerto de muestreo, este posee una llave para la toma de muestras (Abalde & Cid, 1995) (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Para poder obtener este tipo de cultivo todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes. La principal ventaja de este sistema es que se pueden mantener condiciones óptimas en un régimen estacionario con la consecuente calidad del producto algal. Las desventajas del sistema continuo son su alto costo y complejidad. Además de que los requisitos para el mantenimiento de iluminación temperatura en su mayoría

restringen a los sistemas continuos para interiores y esto a su vez se traduce en escalas de producción relativamente pequeñas. Existen dos tipos de aparatos para realizar un cultivo continuo como los quimiostatos y los turbidostatos. Los quimiostatos funcionan suministrando una tasa fija de medio fresco a diferencia de los turbidostatos donde la concentración celular se mantiene a un nivel predeterminado mediante la entrada de medio equivalente a la tasa de división celular. La ventaja de los turbidostatos radica en evitar el colapso de los cultivos por densidades celulares altas, mientras que la ventaja del quimiostato radica en que su volumen de salida es mucho más preciso (Abalde & Cid, 1995) (Barsanti & Gualtieri, 2006).

3.9.3 Cultivo Semi-Continuo

En este tipo de cultivo una parte del volumen es recogido por lo general al término de la fase exponencial, pero se reemplaza la misma cantidad que se retiró con medio fresco. Este método requiere aún menos mano de obra que el cultivo Batch. Esta forma de cultivo permite mantener sistemas interiores de producción por varias semanas, en donde las condiciones de cultivo pueden ser cuidadosamente controladas. A pesar del cambio de medio de cultivo con el tiempo se pueden acumular contaminantes con microorganismos y sustancias metabólicas tóxicas que limitan el tiempo de cultivo. En sistemas de energía lumínica eficientes se puede recoger 3 veces por semana hasta el 90% del volumen de cultivo a altas concentraciones celulares (Abalde & Cid, 1995) (Barsanti & Gualtieri, 2006)

3.10 Cosecha de Microalgas

Dependiendo del objetivo de producción del cultivo de microalgas será el tiempo de cosecha, lo que también implica variaciones de especie a especie para alcanzar su máxima productividad en cuanto a carbohidratos, proteínas, pigmentos, enzimas .lípidos, etc. Por otra parte también se debe tomar en cuenta en qué tipo de cultivo está desarrollándose el alga. Dependiendo de la aplicación de las microalgas, estas suelen estar diluidas y es necesario concentrarlas para poder recogerlas y procesarlas (Palomino, López, & Estrada, 2010) (Shelef, Sukenik, & Green, 1984).

Dentro de los métodos de recolección se incluyen (Abalde & Cid, 1995); (Shelef, Sukenik, & Green, 1984)

- **Centrifugación:** es un proceso rápido y de gran consumo energético además es un método más eficiente de concentración y el producto recogido presenta una calidad muy buena.
- **Filtración por gravedad:** es el método más sencillo y económico aunque presenta algunas desventajas como poca eficiencia, su uso está limitado solamente a microalgas filamentosas o formadoras de colonias y depende del tamaño de la microalga.
- **Microcoladores:** resultan particularmente eficientes para poder concentrar microalgas filamentosas, pero resulta ineficaz cuando el tamaño de la microalga es menor a 20 micras.
- **Separador laminar:** es un equipo que combina la técnica de filtración y sedimentación, consiste en una combinación de láminas inclinadas que por su posición permiten que la biomasa caiga hacia un depósito donde será recolectada.
- **Autoflotación:** consiste en liberar burbujas desde el fondo del contenedor de cultivo, lo cual permite que las microalgas alcancen la superficie en donde pueden ser recogidas.
- **Sedimentación:** algunas algas sedimentan cuando se detiene la agitación del cultivo, lo cual permite recogerlas luego de retirar el sobrenadante. En esta técnica pueden ser utilizadas sustancias que ayuden a la sedimentación de la biomasa pero pueden contaminar el contenido microalgal deseado.

La segunda parte de la cosecha incluye generalmente un tratamiento posterior que consiste en el secado de la biomasa, que garantiza ampliar la viabilidad en función del producto final requerido. Existen distintos métodos de secado: al sol, a vapor, a vacío, liofilización, etc. La elección del método de secado depende de la escala del cultivo y el producto final deseado (Abalde & Cid, 1995) (Palomino, López, & Estrada, 2010).

CAPÍTULO IV

MARCO METODOLÓGICO

4.1 Diseño del Prototipo

Materiales:

- Cajas Térmicas de espuma flex
- Cartuchos de calentamiento de 125W
- Termostato
- Ventiladores 88 mm
- Adaptador de voltaje 12v
- Cortapicos
- Frascos de medio
- Mangueras plásticas
- Difusores de aire
- Seguros de aire
- Bombas de aire con cuatro salidas
- Tapones de algodón
- Lámparas fluorescentes de 12W- 22W- 32W
- Boquillas
- Temporizador
- Termómetro

Para poder cultivar las microalgas fue necesario adecuar los recipientes según los requerimientos preestablecidos para algas en general: es decir temperatura, luz, agitación, fotoperíodo. Todo esto se considera para realizar un prototipo de incubadora para cultivo tipo batch.

Como recipientes se utilizaron botellas de medio de cultivo de vidrio, lo cual optimiza las condiciones para esterilizar mediante autoclavado, así como también la transparencia de los mismos asegura que llegará la cantidad de luz adecuada. Para la agitación se utilizaron bombas de aire junto con mangueras de plástico y difusores para optimizar el burbujeo del aire, y para la correcta distribución de luz. Éstos fueron cubiertos por tapones hechos de gasas estériles y algodón para asegurar el intercambio de gases con el medio y evitar contaminación externa. La luz se la recibió por medio de tubos fluorescentes laterales y la temperatura se adecuó mediante cartuchos de calentamiento y ventiladores. Para regular el fotoperíodo 12/12 horas, se utilizó un temporizador automático.

Considerando que se deben controlar los factores de crecimiento se eligió un contenedor para los frascos de 250mL. Ya que se utilizaron 24 frascos y se requiere un material aislante de temperatura y de fácil manejo, la mejor opción son cajas térmicas de espuma flex las cuales son ligeras, aíslan muy bien la temperatura y se puede trabajar de manera sencilla en su estructura. En la parte superior se colocó el termostato junto con los ventiladores y los cartuchos de calentamiento, todo este conjunto controlará la temperatura interna del prototipo evitando variaciones indeseables en el ensayo. La luz proviene de tubos fluorescentes circulares que se eligen por poseer una menor área que los tubos rectos.

4.2 Bioestimulación

Materiales:

- Frascos de vidrio de 250mL y 500 mL
- Medio de cultivo Nitrofoska foliar
- Micro pipetas
- Cámara de Neubauer
- Prototipo de incubadora
- Microscopio
- pH metro
- Autoclave

La cepa de *Scenedesmus* sp. se obtuvo del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Quito). La cantidad inicial de inóculo fue de 1L con

una concentración de $12,57 \times 10^6$ cel/mL, las cuales fueron identificadas visualmente en por el Laboratorio de la Universidad Católica. De la cepa original se procedió a sub cultivar en los frascos de 500mL, que sirven como mantenimiento de la microalga y así mismo como inóculo para los ensayos posteriores. Los frascos de 500mL se mantuvieron en uno de los prototipos de incubadora, bajo condiciones de pH8, iluminancia 22W, un medio de cultivo a concentración de 5%, temperatura $28^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ y agitación constante. Para estandarizar el método se utilizó la técnica de concentración vs. volumen descrita en la sección 4.4 Método de Mantenimiento, en donde se llega a una concentración de 1×10^6 cel/mL. Se efectuó la siembra bajo el diseño experimental propuesto es decir cultivos de 5 días de duración y con un conteo diario de la microalga en (cel/mL) a lo largo de este período.

El medio de cultivo está compuesto de nitrofoska foliar que contiene:

TABLA No.3
COMPOSICIÓN NITROFOSKA FOLIAR

Componente:	Cantidad:
Nitrógeno	300 g/kg
Fósforo	100 g/kg
Potasio	100 g/kg
Magnesio	6 g/kg
Hierro *	0,5 g/kg
Cinc *	0,19 g/kg
Manganeso *	0,5 g/kg
Boro	0,11 g/kg
Cobre *	0,19 g/kg
Molibdeno	0,01 g/kg

Fuente: (COMPO AGRO, 2010)

Para el cultivo se emplea agua potable autoclavada enriquecida con Nitrofoska Foliar.

4.3 Cálculo de Tiempo generacional y curva de crecimiento

4.3.1 Conteo celular mediante la Cámara de Neubauer

Materiales

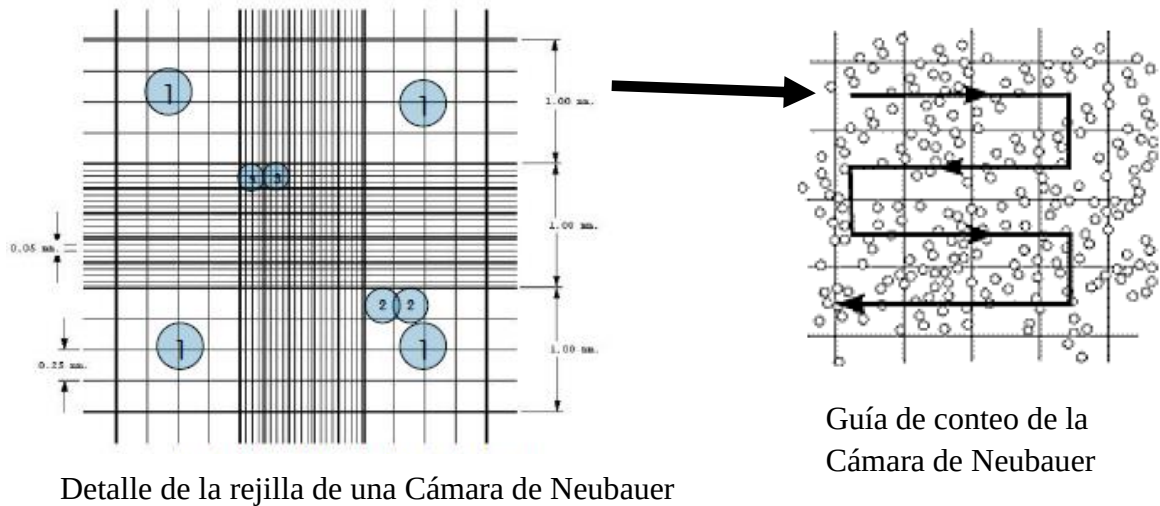
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Micro pipetas
- Agua destilada

Para obtener las curvas de crecimiento en las distintas variables se realizaron conteos diarios de la cantidad de células por mililitro de medio, mediante el conteo con la cámara de Neubauer en microscopio, de la siguiente manera:

1. De cada recipiente tomar una muestra de 1 mL mediante micropipeta.
2. Realizar las diluciones necesarias hasta obtener un número adecuado para el conteo.
3. Tomar nuevamente la muestra con la micropipeta y se coloca en la cámara de Neubauer hasta llenar el espacio del cubreobjetos.
4. Llevar la cámara al microscopio enfocando con 20X de aumento hasta que la imagen quede clara
5. Enfocar con aumento de 40X para proceder al conteo.
6. En la cámara de Neubauer existen 5 cuadrantes para realizar el conteo se toman en cuenta los cuadrantes 1, 2 ,3 y 4 excluyendo 5 que es el central de la cámara.

FIGURA No. 4

MÉTODO DE CONTEO CELULAR PARA LA CÁMARA DE NEUBAUER



Fuente. Bastidas (2012)

Toda célula será contabilizada siempre y cuando encaje totalmente en el cuadrado, esto es sin topar las líneas superiores exteriores, inferiores exteriores y laterales exteriores, se diferencian porque dichas líneas se presentan entre 3 muy juntas (Bastidas , 2012).

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

4.3.2 Gráfico de curvas de crecimiento

Si se grafica el número de células por mililitro en función del tiempo se obtiene la curva de crecimiento de la población de algas. Mediante la utilización de las curvas de crecimiento se establecieron los parámetros óptimos de la microalga en el ensayo.

Para la realización de las gráficas de crecimiento respectivas a cada parámetro de estudio se utilizó Microsoft Excel 2007, primero se ubicaron los datos en tablas organizadas en frascos vs días, luego se procedió a realizar un promedio de las 8 réplicas y finalmente se utilizó la herramienta de Gráficos.

4.3.3 Tiempo Generacional

Para este ensayo se utilizaron las condiciones que presenten mejor crecimiento, se realizó un triplicado del cultivo y se procedió a medir la cantidad de células en parciales de tiempo de 1 hora hasta obtener la duplicación de la cantidad de inóculo inicial que es 1×10^6 cel/mL.

Para obtener el tiempo generacional se aplicaron las siguientes fórmulas

$$n = \log_2 N_n - \log_2 N_o \text{ (Chiappa, Galindo, \& Cervantes, 2009)}$$

Donde:

n: número de generación

N_n: población final

N_o: Población inicial

$$g = \frac{t}{n} \text{ (Chiappa, Galindo, \& Cervantes, 2009)}$$

Dónde:

t: es el intervalo de tiempo transcurrido entre las generaciones N_o y N_n

n: es el número de generaciones

4.4 Método de Mantenimiento

Se mantuvo a la cepa en frascos de medio de 500mL los cuales recibieron luz por medio de lámparas fluorescentes de 60W aireadas por bombas a una temperatura de 28°C.

Para realizar una resiembra de la cepa se debe conocer la concentración celular de microalgas original y el volumen al que se desea llegar, con estos datos se calcula la concentración del volumen que debe ir en el nuevo cultivo para llegar a una concentración deseada de 1×10^6 cel/mL, por medio de la siguiente fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Dónde:

C1= Concentración actual cel/mL

V1= Volumen actual mL

C2= Concentración a la que se pretende llegar (conocido)

V2= Volumen al que se pretende llegar (desconocido)

La cantidad de volumen obtenida será la cantidad de medio que debe ir en el nuevo cultivo.

Ejemplo: Un frasco contiene de 500mL con una concentración de 11×10^6 cel/mL, la concentración ideal para empezar la siembra es de 1×10^6 cel/mL. Necesitamos conocer el volumen al cual se logra tener esa concentración celular.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$11 \times 10^6 \text{ cel/mL} \times 500 \text{ mL} = 1 \times 10^6 \text{ cel/mL} \times V2$$

$$V2 = 5500 \text{ mL}$$

Esto quiere decir que para obtener en el segundo frasco una concentración de 1×10^6 cel/mL deberá diluirse en 5500mL de medio.

La cantidad de volumen obtenida será la cantidad de medio que debe ir en el nuevo cultivo.

Se debe mantener la cepa original aislada y en las condiciones adecuadas para que ésta sirva para proveer nuevas líneas de cultivo que sirven para medir los diferentes parámetros de estudio.

4.5 Modificación de parámetros experimentales en el estudio

4.5.1 pH:

Para modificar este parámetro se realizaron ajustes en el pH propio del medio de manera ascendente o descendente mediante soluciones de ácido sulfúrico 2N e Hidróxido de Sodio 1N, hasta conseguir valores de pH 6, 7, 8.

1. Sumergir la punta del electrodo unos 4cm en la muestra de medio.
2. Permitir que el electrodo se ajuste y la medida se estabilice.
3. Para realizar mediciones más precisas asegurarse de que esté calibrado y que la muestra esté en temperatura ambiente.
4. Adicionar la solución de NaOH o H₂SO₄ según sea el caso.
5. Realizar la inoculación de la cepa en el medio con el pH requerido.
6. Sembrar 8 veces para cada uno de los parámetros de pH. Es decir en total 24 muestras para el ensayo.
7. Posterior a esto realizar los conteos diarios para cada medio con diferente pH.

4.5.2 Luz:

Para establecer los diferentes niveles a evaluarse dentro de esta variable se varió la intensidad luminosa del tubo fluorescente, cambiando las lámparas en el prototipo, estas son: 12W- 22W- 32W. Para realizar las mediciones necesarias se necesita un luxómetro.

1. Sembrar la cepa en los 8 frascos para la medición de cada parámetro.

2. Realizar una sola medición con el luxómetro para determinar la cantidad de luxes que posee el prototipo.
3. Encender el luxómetro, la medición debe estar en cero.
4. Destapar el sensor y situarlo en perpendicular a la fuente luminosa.
5. Leer el valor de la intensidad de luz en la pantalla, hasta que éste estabilice.
6. Realizar los conteos con la cámara de Neubauer para cada medio con diferente iluminancia.

4.5.3 Nutrientes:

Para poder modificar este parámetro se realizaron diluciones de diferentes concentraciones de Nitrofoska foliar, acorde al siguiente proceso:

1. Preparar la solución madre de acuerdo a las instrucciones del fabricante 1kg/200L.
2. De ésta se vuelve a disolver 5mL, 7,5mL, 10mL en 1L de agua estéril respectivamente.
3. Realizar la resiembra de la cepa de mantenimiento en la solución del medio.
4. Medir en crecimiento celular para cada porcentaje de medio.

4.6 Interacción de los parámetros óptimos y rendimiento en peso seco

Para tomar la decisión de que parámetro es el óptimo en cada factor de ensayo, se tomará en cuenta el máximo promedio de conteo del quinto día.

Una vez establecidos los parámetros óptimos en cada variable, se realizó el ensayo combinando el mejor nivel de cada parámetro. Igualmente el ensayo se realizó en 8

muestras y durante un lapso de 5 días para la medición de la curva de crecimiento. Se realizó un conteo diario de células mediante la cámara de Neubauer.

Luego se volvió a sembrar las 8 muestras en condiciones óptimas, para realizar el ensayo de rendimiento en peso seco, pero esta vez sin realizar un conteo diario de las muestras ya que modificaría la cantidad de células en el medio. Para poder comparar los datos obtenidos en este ensayo también se realizó la siembra en condiciones estándar.

El procedimiento para el ensayo de peso seco es el siguiente:

1. Luego de transcurridos los 5 días secar las muestras en la estufa a 105°C por 24 horas.
2. Pesar las muestras en una balanza analítica.
3. Lavar los frascos retirando los restos de microalgas.
4. Volver a secar los frascos en la estufa a 105°C por 24 horas.
5. Pesar los frascos sin muestra en la balanza analítica.
6. Restar los pesos para obtener el peso seco de las microalgas por frasco.

4.7 Tratamiento Estadístico

Para realizar el tratamiento estadístico se utilizó Microsoft Excel 2007 y Statistix 8.0. Primero se analizaron los datos para comprobar su normalidad mediante un Test de Shapiro-Wilk, una vez comprobada la normalidad se procedió a realizar el ANOVA de una vía en cada uno de los factores analizados (pH, iluminancia y nutrientes) donde se compararon independientemente los datos únicamente del quinto, ya que en este día se obtuvo la máxima población celular de cada frasco, en caso de no presentar normalidad se realizó un test de Kruskal-Wallis. De encontrarse diferencias significativas entre los grupos de estudio se realizó un test a posteriori (Tukey o el respectivo para Kruskal-Wallis), para determinar las diferencias de los grupos. Todos los grupos del ensayo fueron realizados en 8 réplicas.

- **Escenario 1: FACTOR A COMPROBAR ILUMINANCIA**

3 diferentes niveles (12 w, 22 w y 32 w)

Constantes pH: 8, temperatura: 28°C, nitrofoska: 5mL/L

ANOVA de 1 vía

Nota: pH 8, temperatura 28°C (Lavens & Sorgeloos, 1996) ,nitrofoska 5mL/L (Brito & Milani, 2006)

- **Escenario 2: FACTOR A COMPROBAR PH**

3 diferentes niveles (6 - 7 - 8)

Constantes Luz: 22W, temperatura: 28°C, nitrofoska: 5mL/L

ANOVA de 1 vía

Nota: temperatura 28°C, iluminancia 1000 luxes (Lavens & Sorgeloos, 1996) nitrofoska 5mL/L (Brito & Milani, 2006)

- **Escenario 3: FACTOR A COMPROBAR NUTRIENTES**

3 diferentes niveles (5mL/L; 7,5mL/L; 10mL/L)

Constantes Luz: 22W, pH: 8, temperatura: 28°C

ANOVA de 1 vía

Nota: pH 8; luz 1000 luxes; temperatura 28°C (Lavens & Sorgeloos, 1996).

- **Escenario 4: FACTOR A COMPROBAR INTERACCIÓN DE LOS MEJORES RESULTADOS**

1 nivel de iluminancia, 1 nivel pH, 1 nivel de nutrientes

Constante: Temperatura 28°C

Nota: pH 8; iluminancia 1000 luxes; temperatura 28°C (Lavens & Sorgeloos, 1996); nitrofoska 5mL/L (Brito & Milani, 2006)

Interacción de parámetros óptimos: Frascos con los mejores factores de crecimiento detectados.

Estándar: según el manual de la FAO Lavens y Sorgeloos, 1996.

- **Escenario 5: Factor a comprobar peso seco**

1 nivel de iluminancia, 1 nivel pH, 1 nivel de nutrientes

Constante: Temperatura 28°C

Estándar: pH 8, iluminancia 1000 luxes, temperatura 28°C (Lavens & Sorgeloos, 1996); nitrofoska 5mL/L (Brito & Milani, 2006)

Interacción de parámetros óptimos: Frascos con los mejores factores de crecimiento detectados.

Estándar: según el manual de la FAO (Lavens & Sorgeloos, 1996)

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5 Objetivo 1: Diseñar y construir un prototipo de incubadora con cultivo discontinuo a nivel de laboratorio para el crecimiento de la microalga y variación de parámetros de estudio.

5.5.1 Dimensiones del prototipo

En primer lugar se consideró el espacio que se necesitaría para que el prototipo albergue a 8 frascos de 250 mL; siendo sus dimensiones finales (Anexo 1) las que se detallan a continuación:

Altura: 15cm

Ancho: 6cm

Se consideró también el tamaño de las cajas térmicas disponibles en el país, por lo cual se adoptó una caja de (Anexo 2):

Largo: 53cm

Ancho: 34cm

Altura: 39cm

dimensiones que corresponden a alrededor del doble del volumen de los 8 frascos, debido a que se necesitó tomar en cuenta también el espacio necesario para colocar las lámparas fluorescentes (Grosor: 3cm;Diámetro: 20cm) (Anexo 3) y los cartuchos de calentamiento (largo: 22cm) con sus respectivos ventiladores (ancho: 8,8 cm) (Anexo 4).

5.5.2 Diseño del Prototipo

El diseño del prototipo fue determinado en base a los requerimientos necesarios para la realización de un cultivo tipo batch, los cuales son mencionados en el marco metodológico 4.1 Diseño del prototipo.

Considerando los parámetros de luz, temperatura, aireación y agitación, primeramente se decidió el lugar correspondiente a las lámparas fluorescentes, los cuales fueron colocadas en las paredes laterales de la caja térmica; las conexiones exteriores de dichas lámparas se conectaron al temporizador automático el cual estaba programado para proveer del ciclo de luz/oscuridad correspondiente a 12/12 horas respectivamente (Anexo 5).

Respecto a la temperatura, los cartuchos de calentamiento se colocaron en la parte superior correspondiente a la tapa de la caja, en donde fueron ubicados a su vez los ventiladores y el correspondiente termostato en la parte externa, para el mantenimiento de la temperatura se consideró un diseño en donde los ventiladores permiten que ingrese aire del medio exterior, el cual a su vez se calienta a la temperatura necesaria por medio de los cartuchos, considerando las altas temperaturas que alcanzan los cartuchos se realizó una abertura en la caja en la parte frontal que sirvió para liberar el aire caliente del medio.

El termostato incluye un sensor de temperatura, el mismo que fue colocado a la altura de los frascos de cultivo por lo cual se mantuvo la temperatura constante necesaria. Una consideración respecto a los ventiladores fue la distancia que se debe tener respecto a los cartuchos ya que estos pueden provocar un daño a los mismos por su alta temperatura y por lo tanto se consideró una distancia de 4cm, y por otra parte se consideró que los ventiladores al ser de 12V necesitan un adaptador para su correcto funcionamiento.

Finalmente, para el parámetro correspondiente a aireación y agitación se utilizaron 2 bombas de aire de cuatro salidas, mismas que fueron adaptadas para poder suplir a 24 frascos de los ensayos, la adaptación se realizó mediante llaves metálicas de salida triple. También se utilizó una bomba de salida doble la cual sirvió para los frascos de

mantenimiento. Todas las conexiones de aire se realizaron mediante el uso de mangueras plásticas las cuales incluyen filtros y seguros de reflujo.

5.5.3 Especificaciones del material

Cartuchos de calentamiento: 110V y 125W y de diámetro de 1/2 pulgada

Bombas de aire: 9W con una presión de 0,914MPa y salida de aire de 4x3L/min.

Termostato: Marca Rainbow, rango 0°-90°C con un índice de error de +/- 5°C.

Timer: 15A, 60Hz índice de error +/- 5 minutos.

Frascos: Marca SIMAX, volumen 250 mL, material Boro silicato, resistencia al calor 525°C.

5.6 Objetivo2: Bioestimular al alga en diferentes tratamientos modificando las variables de concentración de macro y micro nutrientes en Nitrofoska Foliar, iluminancia y pH.

5.6.1 Crecimiento de *Scenedesmus* en distintas concentraciones de medio de cultivo

Los siguientes resultados fueron determinados mediante conteo celular diario, por un lapso de 5 días únicamente, ya que el tipo de cultivo batch no permite el aumento de medio, por lo que al término de los 5 días éste está agotado, el conteo se realizó en 8 frascos distintos para cada parámetro.

TABLA No. 4

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO DE NITROFOSKA AL 5%

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	1,9x10 ⁶	4x10 ⁶	6,9x10 ⁶	6,8x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,13x10 ⁶	4,5x10 ⁶	6,2x10 ⁶	7,7x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	2,6x10 ⁶	5x10 ⁶	5,4x10 ⁶	8,8x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	2,9x10 ⁶	8,7x10 ⁶	5x10 ⁶	4,4x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	3,7x10 ⁶	4,5x10 ⁶	4,8x10 ⁶	4,4x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	3,28x10 ⁶	4x10 ⁶	5,6x10 ⁶	7,7x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	4,1x10 ⁶	3,1. x10 ⁶	6,3x10 ⁶	7,45x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	4,2x10 ⁶	5x10 ⁶	10,2x10 ⁶	5,88x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	3,1x10 ⁶	4,86 x10 ⁶	6,3 x10 ⁶	6,64 x10 ⁶
D.E.	0	0,86	1,66	1,72	1,61

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 4 se observa un crecimiento exponencial en casi todos los frascos, expresado en cel/mL, aunque en algunos de ellos (frascos 4 y 8) se obtiene un decrecimiento llegando a una población de entre 9 y 10 millones de células observado en el 4to día en el frasco 4 con un disminución de 3,7x10⁶ cel/mL, y en el caso del frasco 8 en el 5to día se puede ver una diferencia de menos de 4,32x10⁶ cel/mL, este comportamiento se presume que puede deberse a que al llegar a esta cantidad de células entre 9 y 10 millones, se alcanza un límite de población por lo cual el medio para las microalgas comenzarían a entrar en una etapa de muerte, ya que se observa la misma disminución.

Por otra parte en frasco 5 se puede observar una meseta en el crecimiento debido a la falta de adaptación metabólica al medio.

TABLA No. 5

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO DE NITROFOSKA AL 7.5%

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	3,8x10 ⁶	2,7x10 ⁶	3,3x10 ⁶	7,6x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,6x10 ⁶	2,1x10 ⁶	6,1x10 ⁶	6,3x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	3,2x10 ⁶	2,78x10 ⁶	6x10 ⁶	5,3x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	3x10 ⁶	3,9x10 ⁶	7,49x10 ⁶	7,8x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	4,2x10 ⁶	3,2x10 ⁶	4,68x10 ⁶	6,29x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	4,2x10 ⁶	4,3x10 ⁶	5,4x10 ⁶	6,1x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	3,9x10 ⁶	5,7x10 ⁶	4,8x10 ⁶	5,6x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	3,6x10 ⁶	5,2x10 ⁶	6,2x10 ⁶	7,9x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	3,56x10 ⁶	3,73 x10 ⁶	5,49 x10 ⁶	6,61 x10 ⁶
D.E.	0	0,61	1,29	0,96	1,01

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 5 se observa un crecimiento exponencial en todos los frascos, expresado en cel/mL, en algunos de ellos (frascos 1, 2, 3 y 5) se observa un decrecimiento en el día 3, el cual puede deberse a que las nuevas microalgas se encuentran aún en etapa de adaptación, ocurriendo en algunas de ellas la muerte, también pudo producirse el fenómeno que sugiere que las células al momento de la resiembra no se encontraban todas en la misma etapa de desarrollo, ya que en conteo diario únicamente se toma en cuenta las células vivas, esto pudo provocar el decrecimiento temporal en dichos frascos.

TABLA No. 6

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO DE NITROFOSKA AL 10%

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	3,2x10 ⁶	5,07x10 ⁶	5,78x10 ⁶	3,9x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,9x10 ⁶	4,09x10 ⁶	7,6x10 ⁶	8,2x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	2,88x10 ⁶	3,5x10 ⁶	6,59x10 ⁶	6x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	2,7x10 ⁶	5x10 ⁶	7,67x10 ⁶	7,3x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	2,3x10 ⁶	4x10 ⁶	5,2x10 ⁶	5,9x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	3,17x10 ⁶	5,4x10 ⁶	6,6x10 ⁶	12,2x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	2,8x10 ⁶	5,6x10 ⁶	5,4x10 ⁶	5x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	2,6x10 ⁶	4,7x10 ⁶	7,8x10 ⁶	5,9x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	2,81x10 ⁶	4,67 x10 ⁶	6,58 x10 ⁶	6,8 x10 ⁶
D.E.	0	0,29	0,73	1,04	2,54

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 6 de igual manera se observa un crecimiento exponencial en casi todos los frascos, aunque en el frasco número 1 se obtiene un decrecimiento en el día 5, se observa también en los frascos 3, 4 y 7 un decrecimiento ligero, el cual pudo producirse por el mismo fenómeno que en la tabla 5 al momento de la resiembra no todas las microalgas se encontraban en la misma etapa de desarrollo ya que en conteo diario únicamente se toma en cuenta las células vivas, esto pudo provocar el decrecimiento en dichos frascos.

5.6.2 Crecimiento de *Scenedesmus* en distintos niveles de pH

Los siguientes resultados fueron medidos mediante conteo celular diario, durante 5 días en 8 distintos frascos por cada parámetro.

TABLA No. 7

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON pH 6

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1×10^6	$0,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
Frasco 2	1×10^6	$0,9 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$3,96 \times 10^6$
Frasco 3	1×10^6	$0,82 \times 10^6$	$0,86 \times 10^6$	1×10^6	$1,56 \times 10^6$
Frasco 4	1×10^6	$0,93 \times 10^6$	$1,88 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$	$0,87 \times 10^6$
Frasco 5	1×10^6	$1,1 \times 10^6$	$0,72 \times 10^6$	$0,67 \times 10^6$	$0,48 \times 10^6$
Frasco 6	1×10^6	$0,72 \times 10^6$	$1,98 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,01 \times 10^6$
Frasco 7	1×10^6	$1,2 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$	$0,88 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$
Frasco 8	1×10^6	$0,5 \times 10^6$	$0,78 \times 10^6$	$0,80 \times 10^6$	$0,75 \times 10^6$
Promedio	1×10^6	$0,88 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	$1,77 \times 10^6$
D.E.	0	0,21	0,70	0,64	1,33

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 7 se observa un crecimiento exponencial en todos los frascos, el mayor decrecimiento se observa en el día 2 en 5 frascos (1, 2, 3, 4, 6 y 8) esto podría explicarse por una contaminación bacteriana debido al pH; los cultivos de microalgas normalmente tienen una carga bacteriana que por lo general se controla con el nivel de pH, en este caso el pH 6 favorece a un mayor crecimiento bacteriano que puede afectar el normal crecimiento de las microalgas en el medio. Las bacterias a su vez afectarían al periodo de adaptación provocando un decaimiento en la multiplicación en las microalgas.

TABLA No. 8

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON pH 7

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	1,8x10 ⁶	1,28x10 ⁶	1,02x10 ⁶	0,99x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	1,59x10 ⁶	0,62x10 ⁶	0,78x10 ⁶	0,57x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	0,99x10 ⁶	1x10 ⁶	0,94x10 ⁶	0,84x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	1,5x10 ⁶	0,7x10 ⁶	0,82x10 ⁶	1,44x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	1,9x10 ⁶	1,64x10 ⁶	1,2x10 ⁶	1,08x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	0,97x10 ⁶	1,38x10 ⁶	1,33x10 ⁶	2,04x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	0,64x10 ⁶	1,36x10 ⁶	2,43x10 ⁶	1,65x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	0,78x10 ⁶	1x10 ⁶	1,39x10 ⁶	1,41x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	1,27x10 ⁶	1,14 x10 ⁶	1,23 x10 ⁶	1,25 x10 ⁶
D.E.	0	0,48	0,35	0,53	0,47

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 8 se observa un crecimiento bajo en todos los frascos, se aprecia un decrecimiento, en el día 2 en 4 frascos (3, 6, 7 y 8), en el día 3 en 3 frascos (2, 4 y 5), en el día 4 en 4 frascos (1, 3, 5 y 6), y el 5to día en 5 frascos (1, 2, 3, 5 y 7) ; se puede apreciar que el crecimiento presenta valores inestables durante el periodo evaluado, comparándolo con los niveles de crecimiento observados en pH 8, esto puede advertir la presencia de una contaminación microbiana en los medios de cultivo, ya que el pH7 sería el más favorable para el crecimiento de las bacterias en el medio, sin que dicha contaminación implique una mala práctica experimental dado que la población bacteriana está presente siempre en el medio y al ser sus condiciones de crecimiento más favorables afectan a las microalgas impidiendo una correcta adaptación a su nuevo medio y el consecuente crecimiento normal.

TABLA No. 9

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON pH 8

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	2,3x10 ⁶	0,8x10 ⁶	1,28x10 ⁶	1,95x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	3x10 ⁶	1,48x10 ⁶	0,99x10 ⁶	1,11x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,1x10 ⁶	0,7x10 ⁶	0,95x10 ⁶	1,56x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	1,99x10 ⁶	1,3x10 ⁶	2x10 ⁶	2,7x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	1,02x10 ⁶	1,9x10 ⁶	3,44x10 ⁶	5,04x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	1,02x10 ⁶	0,82x10 ⁶	2,07x10 ⁶	4,77x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	1,1x10 ⁶	2,9x10 ⁶	5,71x10 ⁶	7,05x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	1,3x10 ⁶	1,2x10 ⁶	1,81x10 ⁶	3,39x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	1,60x10 ⁶	1,38 x10 ⁶	2,28 x10 ⁶	3,44 x10 ⁶
D.E.	0	0,74	0,73	1,59	2,03

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En esta tabla 9 se observa un crecimiento exponencial en casi la mayoría de frascos, expresado en cel/mL, en el día 3 en los frascos 1, 3, 4 y 6 se observa un decrecimiento que podría deberse a que el período de adaptación tuvo una duración de tres días y esto se podría explicarse al estado biológico de las microalgas; ya que no todas se encontraban en su fase exponencial, esto se puede observar en el comportamiento de los días 2 y 3. A partir del día 4 a excepción del frasco 2, se observa un incremento de la multiplicación celular y en el día 5 se observa una completa recuperación del incremento de biomasa celular en los medios; ya que los valores son mayores a los observados en los pHs inferiores y responderían a una menor contaminación bacteriana que permite el desarrollo de las mismas.

5.6.3 Crecimiento de *Scenedesmus* en distintos niveles de iluminancia

Los siguientes resultados fueron medidos mediante conteo celular diario, durante 5 días en 8 distintos frascos por cada nivel.

TABLA No. 10

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON ILUMINANCIA DE 11W

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	1,89x10 ⁶	2,08x10 ⁶	4,6x10 ⁶	6,53x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,29x10 ⁶	2,3x10 ⁶	3,8x10 ⁶	5,6x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,65x10 ⁶	2,12x10 ⁶	2,65x10 ⁶	3,38x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	2,45x10 ⁶	1,3x10 ⁶	2,9x10 ⁶	5,49x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	1,89x10 ⁶	2,14x10 ⁶	3,7x10 ⁶	4,25x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	2,5x10 ⁶	5,38x10 ⁶	5,02x10 ⁶	5,94x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	2,17x10 ⁶	2x10 ⁶	4,47x10 ⁶	7,4x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	3,19x10 ⁶	1,22x10 ⁶	2,77x10 ⁶	4,9x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	2,25x10 ⁶	2,31 x10 ⁶	3,73 x10 ⁶	5,43 x10 ⁶
D.E.	0	0,48	1,3	0,90	1,26

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 10 se observa un crecimiento exponencial en todos los frascos, expresado en cel/mL, se identifica una declinación en el 3er día, en los frascos 4,7 y 8 que pudo ser el resultado de una adaptación un poco más prolongada a un menor nivel de iluminancia, en comparación con la observada en los otros frascos; ya que al igual que en el anterior caso de pH la adaptación puede generar una disminución de población, dado que el inóculo se mantiene con una iluminancia correspondiente a 22W. A pesar de esto en el quinto día se puede identificar un aumento en los niveles de crecimiento, debido a que las células posiblemente ya se adecuaron a este nivel de iluminancia.

TABLA No. 11

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON ILUMINANCIA DE 22W

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	2,4x10 ⁶	1,52x10 ⁶	1,47x10 ⁶	1,2x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	1,74x10 ⁶	2,4x10 ⁶	1,57x10 ⁶	1,39x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,74x10 ⁶	2,04x10 ⁶	3,2x10 ⁶	4,68x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	1,5x10 ⁶	2,72x10 ⁶	3,85x10 ⁶	4,61x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	1,48x10 ⁶	2,46x10 ⁶	2,9x10 ⁶	4,58x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	2,6x10 ⁶	1,24x10 ⁶	1,62x10 ⁶	2,27x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	2,07x10 ⁶	1,16x10 ⁶	3,2x10 ⁶	4,51x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	1,08x10 ⁶	2,46x10 ⁶	3x10 ⁶	4,84x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	1,82x10 ⁶	1,99 x10 ⁶	2,6 x10 ⁶	3,51 x10 ⁶
D.E.	0	0,5	0,61	0,85	1,6

Elaborado por: Pástor y Pozo, 2013

En la tabla 11 se observa un crecimiento exponencial en la mayoría de frascos, se pudo observar en los frascos 1 y 2 una disminución en la cantidad de células desde que llegan a una cantidad de 2,4x10⁶ cel/mL que pudo deberse a que las células se encontraban en una distinta etapa de crecimiento, ya que este comportamiento no se observa en los otros frascos del ensayo. Además en los frascos 6 y 7 se puede observar una disminución de células que pudo ocurrir debido a una adaptación efectiva al cuarto día.

TABLA No. 12

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DURANTE EL PERIODO EXPERIMENTAL EN UN MEDIO CON ILUMINANCIA DE 32W

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	3,3x10 ⁶	8,28x10 ⁶	8,43x10 ⁶	8,82x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,19x10 ⁶	2,4x10 ⁶	3,67x10 ⁶	4,44x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	2,47x10 ⁶	1,84x10 ⁶	5,98x10 ⁶	7,7x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	3,16x10 ⁶	4,68x10 ⁶	4,23x10 ⁶	6,9x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	4,5x10 ⁶	5,24x10 ⁶	6x10 ⁶	6,87x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	4,3x10 ⁶	6,38x10 ⁶	6,18x10 ⁶	5,34x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2,9x10 ⁶	4,11x10 ⁶	5,79x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	2,76x10 ⁶	6,26x10 ⁶	19x10 ⁶	22,1x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	0,73x10 ⁶	2,76 x10 ⁶	3,82 x10 ⁶	6,55 x10 ⁶
D.E.	0	0,23	1,35	1,75	2,90

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la tabla 12 se observa un crecimiento exponencial en todos los frascos, dado que el frasco 8 alcanza una población excesiva en los día 3 y 4 (19x10⁶ - 22,1x10⁶ cel/mL) y comparándolo con los otros valores obtenidos en los diferentes frascos se decidió descartarlo del análisis estadístico asumiendo que existió a una mala práctica de laboratorio al momento de conteo. Los resultados del 5to día para todos los frascos indican una mejora en la densidad celular que responde a una alta intensidad luminosa que no ha alcanzado su límite para detener el crecimiento.

5.6.4 Variables óptimas para cada factor

Luego de realizados los ensayos se procedió a escoger según los promedios y los gráficos de crecimiento, los mejores niveles para cada parámetro de la siguiente manera:

TABLA No. 13

PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (Cel/mL) AL QUINTO DÍA EN EL FACTOR NUTRIENTES

	Nitrofoska 5%	Nitrofoska 7,5%	Nitrofoska 10%
Promedio día 5	6,641	6,611	6,8

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Se eligió la Nitrofoska al 10% ya que visualmente se observa una mayor densidad de células comparándolo con los otros niveles, lo cual se observa por la intensidad de color verde en los frascos.

TABLA No. 14

PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (Cel/mL) AL QUINTO DÍA EN EL FACTOR pH

	pH6	pH7	pH8
Promedio día 5	1,777	1,252	3,446

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Se eligió el pH8, ya que se observa un mayor crecimiento, resultado que se aprecia de mejor manera en la curva de crecimiento Figura No 6.

TABLA No. 15

PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (Cel/mL) AL QUINTO DÍA CONSIDERANDO EL FACTOR ILUMINANCIA

	32W	22w	11w
Promedio día 5	6,55	3,51	5,436

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Se eligió la iluminancia de 32W, ya que se observa un aumento en el crecimiento de las microalgas, esto se puede ver mejor en la Figura No 7.

5.6.5 Crecimiento de variables óptimas y variables estándar

TABLA No. 16

CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) APLICANDO UNA COMBINACIÓN DE VARIABLES ÓPTIMAS

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	0,55x10 ⁶	2,72x10 ⁶	3,05x10 ⁶	5,07x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	0,57x10 ⁶	1,74x10 ⁶	4,1x10 ⁶	8,06x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,21x10 ⁶	2,38x10 ⁶	7,2x10 ⁶	10,4x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	0,6x10 ⁶	1,8x10 ⁶	1,5x10 ⁶	2,86x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	0,84x10 ⁶	3x10 ⁶	3,2x10 ⁶	4,77x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	0,75x10 ⁶	2,06x10 ⁶	4,4x10 ⁶	9,42x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	0,63x10 ⁶	5,64x10 ⁶	3,35x10 ⁶	3,99x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	0,88x10 ⁶	4,06x10 ⁶	1,07x10 ⁶	1,04x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	0,75x10 ⁶	2,93 x10 ⁶	3,48 x10 ⁶	5,70 x10 ⁶
D.E.	0	0,87	2,23	5,00	5,66

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Los valores óptimos para este ensayo fueron pH8, iluminancia 32W y nutrientes 10%.

En la tabla 16 se aprecia una disminución en el crecimiento en el día 2 casi todos los frascos tienen un decrecimiento que podría deberse a que resultó más difícil una adaptación de las microalgas, hacia todos los parámetros escogidos como óptimos. Además en los frascos 7 y 8 decaen en su crecimiento en el día 4 lo que respondería posiblemente a que las microalgas no se adaptaron correctamente a las nuevas condiciones. Las microalgas pudieran haber estado sometidas a un estrés y por lo tanto adaptándose pocos días al entorno y produciendo un crecimiento exponencial luego.

TABLA No. 17**CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) APLICANDO UNA COMBINACIÓN DE VARIABLES ESTÁNDAR**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Frasco 1	1x10 ⁶	1,90x10 ⁶	1,1x10 ⁶	1,55x10 ⁶	1,61x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	2,86x10 ⁶	3x10 ⁶	3,03x10 ⁶	3,11x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,8x10 ⁶	1,90x10 ⁶	1,13x10 ⁶	1,97x10 ⁶
Frasco 4	1x10 ⁶	1,22x10 ⁶	1,3x10 ⁶	2x10 ⁶	2,7x10 ⁶
Frasco 5	1x10 ⁶	1,45x10 ⁶	1,60x10 ⁶	3,44x10 ⁶	5,24x10 ⁶
Frasco 6	1x10 ⁶	0,98x10 ⁶	0,82x10 ⁶	1,54x10 ⁶	4,77x10 ⁶
Frasco 7	1x10 ⁶	1,1x10 ⁶	1,75x10 ⁶	3,65x10 ⁶	7,19x10 ⁶
Frasco 8	1x10 ⁶	1,3x10 ⁶	1,43x10 ⁶	1,6x10 ⁶	1,78x10 ⁶
Promedio	1 x10 ⁶	1,57x10 ⁶	1,61 x10 ⁶	2,24 x10 ⁶	3,53 x10 ⁶
D.E.	0	0,57	0,61	0,91	1,87

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Las condiciones estándar son pH8, 22W y nutrientes 5%.

En la tabla 17 se puede observar un crecimiento que en la mayoría de los frascos es exponencial, pero en el frasco 6 la fase de adaptación duró hasta el día 3, luego se ve una mejoría en el crecimiento en relación con los demás esto pudo deberse a que una vez adaptadas las microalgas crecen con normalidad. Por otra parte se puede apreciar en los frascos 1 y 3 una falta de adaptación al medio de cultivo posiblemente causada por una diferente fase de crecimiento en las células.

5.7 Objetivo 3: Determinación de las curvas de crecimiento, tiempo generacional y rendimiento en biomasa

5.7.1 Curvas de crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento se toma en cuenta el promedio de crecimiento por día de todos los frascos de cada parámetro

TABLA No. 18

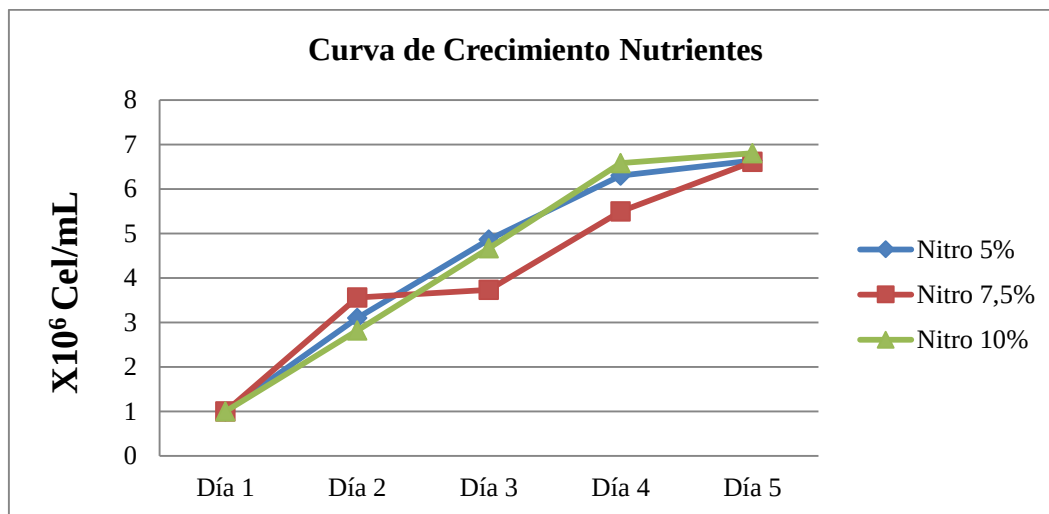
PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NITROFOSKA

	Nitrofoska 5%	Nitrofoska 7,5%	Nitrofoska 10%
Día 1	1×10^6	1×10^6	1×10^6
Día 2	$3,101 \times 10^6$	$3,5625 \times 10^6$	$2,818 \times 10^6$
Día 3	$4,862 \times 10^6$	$3,735 \times 10^6$	$4,67 \times 10^6$
Día 4	$6,3 \times 10^6$	$5,496 \times 10^6$	$6,58 \times 10^6$
Día 5	$6,641 \times 10^6$	$6,611 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

FIGURA No. 5

PROMEDIOS DIARIOS DE VALORES DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* ENTRE CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En un análisis de las curvas (Figura 5) se puede concluir, el aumento de población y no se observa mayor diferencia entre las concentraciones de Nitrofoska foliar, esta figura utiliza los valores de la tabla 18.

Un parámetro de suma importancia son los nutrientes, así que se puede decir que la microalga consume únicamente la cantidad de micro y macro nutrientes que necesitan, o sea no porque se provea de más cantidad de medio la microalga lo va a consumir, por lo tanto no afectará la cantidad de nutrientes que se agregue, siempre se consumirá la misma cantidad, para luego por medio de la fotosíntesis ser capaz de sintetizar todos los compuestos bioquímicos necesarios para su crecimiento y desarrollo.

TABLA No. 19

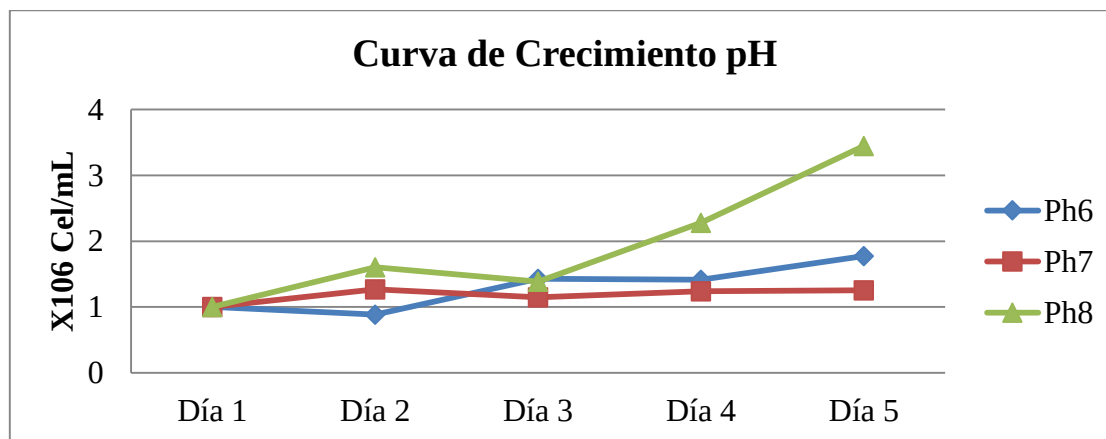
PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) A DISTINTOS NIVELES DE pH

	pH6	pH7	pH8
Día 1	1×10^6	1×10^6	1×10^6
Día 2	$0,883 \times 10^6$	$1,271 \times 10^6$	$1,603 \times 10^6$
Día 3	$1,43 \times 10^6$	$1,147 \times 10^6$	$1,387 \times 10^6$
Día 4	$1,415 \times 10^6$	$1,238 \times 10^6$	$2,281 \times 10^6$
Día 5	$1,777 \times 10^6$	$1,252 \times 10^6$	$3,446 \times 10^6$

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

FIGURA No. 6

PROMEDIOS DIARIOS DE VALORES DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* A DISTINTOS NIVELES DE pH



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Analizando la figura 6 (datos obtenidos de la tabla 19) de crecimiento en diferentes niveles de pH se puede observar una similitud en cuanto al crecimiento hasta el día 3, a partir de ese día se observa un aumento de concentración celular en el pH 8.

Esta diferencia puede deberse a la solubilidad de muchos micronutrientes importantes para la producción primaria dependen del grado de acidez o alcalinidad del agua. Así, el pH alto influye en la disponibilidad de fósforo ya que en medio alcalino, este nutriente es absorbido por el calcio presente en el cuerpo de agua, mientras que al bajar el pH es decir en un medio ácido, el fósforo se junta con el Hierro y aluminio.

TABLA No. 20

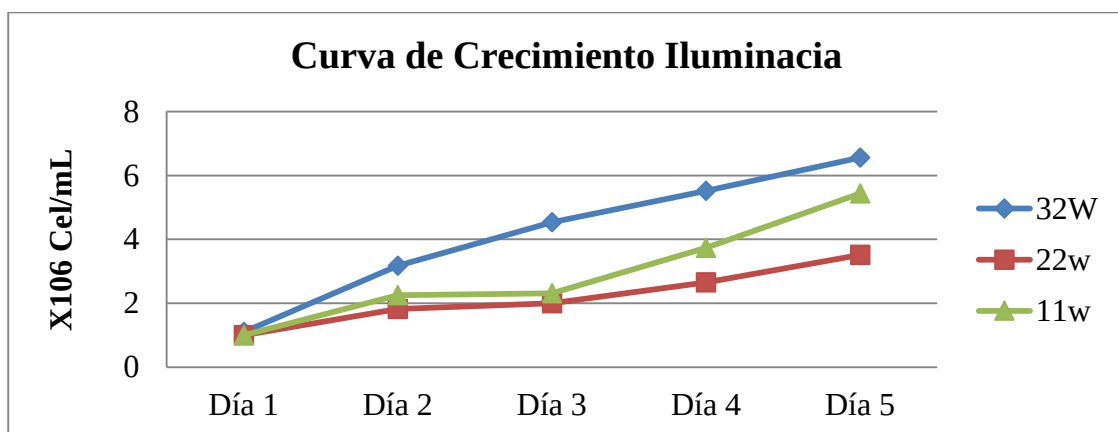
PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (Cel/mL) A DISTINTOS NIVELES DE ILUMINANCIA

	32W	22W	11W
Diá 1	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶
Diá 2	3,17x10 ⁶	1,826x10 ⁶	2,253x10 ⁶
Diá 3	4,53x10 ⁶	1,998x10 ⁶	2,317x10 ⁶
Diá 4	5,51x10 ⁶	2,651x10 ⁶	3,738x10 ⁶
Diá 5	6,55x10 ⁶	3,51x10 ⁶	5,436x10 ⁶

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

FIGURA No. 7

PROMEDIOS DIARIOS DE VALORES DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* A DISTINTOS NIVELES DE ILUMINANCIA



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Según la figura 7 (datos obtenidos de la tabla 20) se puede interpretar que la iluminancia a 32W presenta un mejor crecimiento. Esto se debe a que una lámpara de 32W presenta 7600 luxes, una de 22W presenta 6400 luxes y una de 11W presenta 2000 luxes, comparándolas con los luxes que son emitidos en una día cuyos valores son: en un día nublado a partir de 2000 luxes y siendo la máxima en un día soleado cerca de 100000 luxes, es lógico deducir que las microalgas se desarrollan mejor mientras mayor sea la cantidad de luxes emitida por las lámparas fluorescentes, ya que se aproxima más a la cantidad de luxes emitidas en un día normal.

TABLA No. 21

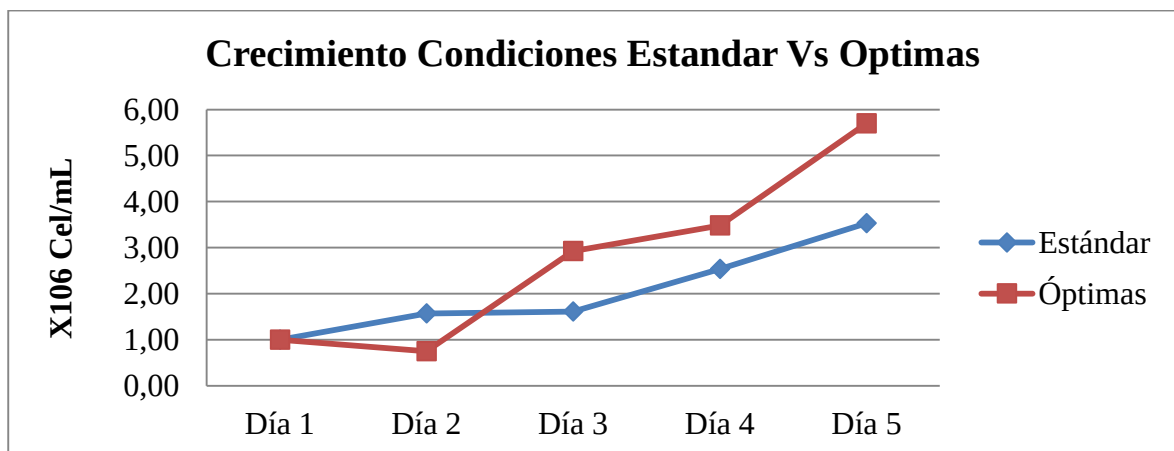
PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) DE LAS CONDICIONES ESTÁNDAR VS LAS ÓPTIMAS

	Estándar(Lavens y Sorgeloos, 1996)	Óptimas del presente estudio
Día 1	1x10 ⁶	1x10 ⁶
Día 2	1,72x10 ⁶	0,75x10 ⁶
Día 3	1,69x10 ⁶	2,93x10 ⁶
Día 4	2,47x10 ⁶	3,48x10 ⁶
Día 5	3,48x10 ⁶	5,70x10 ⁶

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

FIGURA No. 8

CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* COMPARADAS ENTRE CONDICIONES ESTÁNDAR VS ÓPTIMAS



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Comparando las curvas de la figura 8 (datos obtenidos de la tabla 21) se puede observar un mejor crecimiento en las condiciones óptimas del ensayo vs la condiciones estándar a partir del tercer día del experimento, ya que previamente pasan por un proceso de adaptación, y luego tienen un aumento de crecimiento.

5.7.2 Resultados para tiempo Generacional

TABLA No. 22
CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* (cel/mL) PARA TIEMPO GENERACIONAL

	Inoculo	1 hora	2 horas	3 horas
Frasco 1	1x10 ⁶	1,32x10 ⁶	1,78x10 ⁶	2,42x10 ⁶
Frasco 2	1x10 ⁶	1,54x10 ⁶	1,87x10 ⁶	2,03x10 ⁶
Frasco 3	1x10 ⁶	1,70x10 ⁶	1,92x10 ⁶	2,22x10 ⁶

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Una vez obtenidos los datos de 1, 2 y 3 horas (tabla 22), respectivamente se procede a realizar los cálculos de número de generación y posteriormente el tiempo generacional, utilizando las fórmulas antes mencionadas que se encuentran en la sección 4.3.3 Tiempo generacional.

TABLA No. 23
EVOLUCIÓN GENERACIONAL PARA 1, 2 Y 3 HORAS

	n1(0-1)	n2(0-2)	n3(0-3)
Frasco 1	0,263	0,694	1,137
Frasco 2	0,485	0,765	0,883
Frasco 3	0,628	0,803	1,013

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 24

RESULTADOS PARA TIEMPO GENERACIONAL HORAS/GENERACIÓN

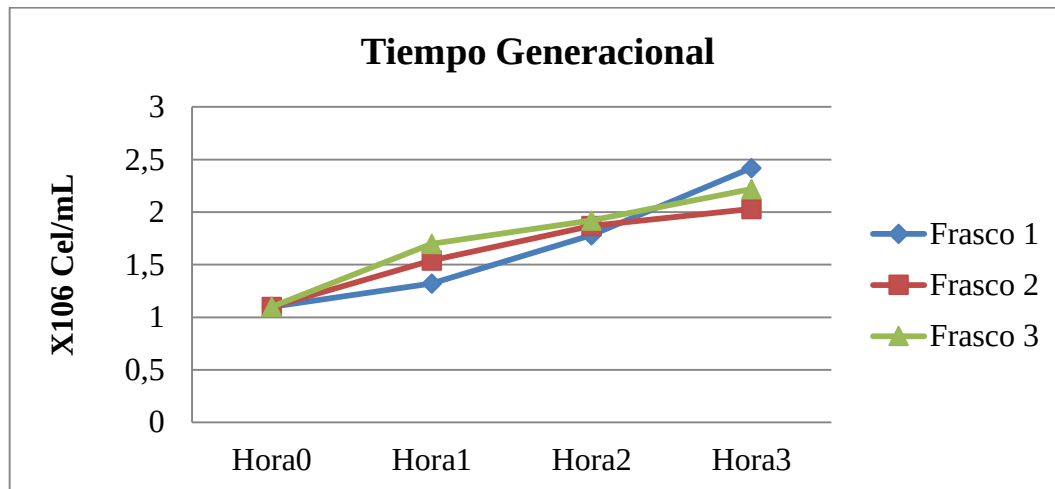
	Generación 1	Generación 2	Generación 3
Frasco 1	3,802	2,881	2,638
Frasco 2	2,061	2,614	3,397
Frasco 3	1,592	2,490	2,961
Promedio individual	2,485	2,66	2,999
Promedio total			2,715

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Los resultados del ensayo para tiempo generacional obtenidos de tabla 23 y 24, muestran un promedio general de 2,71horas por generación, siendo este el tiempo necesario para que se duplique la población de microalgas. Comparándolo con un estudio realizado en la Universidad Central de Venezuela (Moronta & Mora, 2006) acerca del Crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska el cual señala que para el medio de cultivo Nitrofoska, la fase exponencial de crecimiento en los cultivos culminó a los 5, 6 y 7 días de siembra lográndose un tiempo generacional entre 0,74 a 1,05 días. Lo cual evidencia que el tiempo de duplicación es corto en comparación con *Chlorella* y consecuentemente a *Scenedesmus* se le podría considerar seriamente apta para un uso a escala industrial.

FIGURA No. 9

CRECIMIENTODE *Scenedesmus* EN ENSAYO DE TIEMPO GENERACIONAL



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

En la figura 9 de crecimiento de tiempo generacional se puede observar la similitud en cuanto a su crecimiento

5.7.3 Rendimiento en peso seco

Los datos de este ensayo fueron obtenidos del ensayo que se realizó en 8 réplicas para cada parámetro y están expresados en gramos.

TABLA No. 25

RESULTADOS RENDIMIENTO EN PESO SECO DE *Scenedesmus* (gramos)

	Óptimos	Estándar
Frasco 1	0,294	0,134
Frasco 2	0,165	0,140
Frasco 3	0,166	0,146
Frasco 4	0,175	0,146
Frasco 5	0,144	0,146
Frasco 6	0,157	0,135
Frasco 7	0,159	0,163
Frasco 8	0,155	0,163
Promedio	0,177	0,146

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

La tabla 25 indica el peso en gramos de las microalgas en condiciones óptimas y en condiciones estándar obtenidos al 5to día de siembra. Se puede observar un mayor crecimiento en los parámetros óptimos aunque no es mucho mayor al esperado según los resultados en el conteo celular comparando los promedios totales, lo cual puede deberse a que en el conteo en la cámara de Neubauer únicamente se toma en cuenta las células vivas, mientras que en el peso se toman en cuenta también las células muertas del medio.

5.8 Tratamiento Estadístico de los Datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante Statistix 8.0 y Microsoft Excel, el nivel de significancia fue de $\alpha = 0.05$.

5.8.1 Tratamiento estadístico variable nutrientes

TABLA No. 26
TEST DE SHAPIRO-WILK PARA DETERMINACIÓN DE
NORMALIDADEN LOS DATOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus*
EN DISTINTOS TIPOS DE NUTRIENTES

Variable	N	W	P
5% de Nitrofoska	8	0,931	0,3079
7.5% de Nitrofoska	8	0,9021	0,3015
10% de Nitrofoska	8	0,8842	0,2065

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Como resultado del test y según se aprecia en la tabla 26, se obtienen valores de p en todos los casos mayores a 0,05 lo que indica normalidad en la distribución de los datos de los 3 tipos de nutrientes.

TABLA No. 27

RESUMEN DE DATOS PARA FACTOR NUTRIENTES

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio (cel/mL)	Varianza	O
5% de Nitrofoska	8	53,13	6,64	2,60	1,61
7.5% de Nitrofoska	8	52,89	6,61	1,03	1,02
10% de Nitrofoska	8	54,5	6,81	6,41	2,53

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 28

ANOVA DE UNA VÍA PARA FACTOR NUTRIENTES

Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	G.L	Medios Cuadrados	F	P
Entre grupos	0,18	2	0,094	0,021	0,97
Dentro de los grupos	70,39	21	3,351		
Total	70,57	23			

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa en el crecimiento de *Scenedesmus* en tres concentraciones de medio de cultivo nitrofoska.

Hipótesis alternativa: Existe al menos una diferencia entre los tres medios de cultivo en el crecimiento de *Scenedesmus* en tres concentraciones de medio de cultivo nitrofoska.

En este caso se acepta la hipótesis nula ya que el valor de p es mayor a 0,05 comparándola con el valor de la tabla 28 (datos obtenidos de la tabla 27), no existe diferencia significativa en el crecimiento de *Scenedesmus* en los tres medios de cultivo utilizados. Por lo tanto, no existe diferencia entre usar un medio de cultivo al 5% de Nitrofoska y uno al 7,5% y el 10% ya que se obtienen resultados similares, por lo que sería más conveniente usar el medio al 5%, así se economiza en la producción de algas y se obtiene un buen crecimiento.

5.8.2 Tratamiento estadístico variable pH

TABLA No. 29
TEST DE SHAPIRO-WILK PARA DETERMINACIÓN DE
NORMALIDAD EN LOS DATOS DE CRECIMIENTO DE
***Scenedesmus* A DISTINTOS NIVELES DE pH**

Variable	N	W	P
pH6	8	0,8327	0,0633
pH7	8	0,9825	0,9743
pH8	8	0,9393	0,604

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Con los resultados del test y como se observa en la tabla 29, se confirma la normalidad de los datos de crecimiento de *Scenedesmus* en cada uno de los tres niveles de pH, ya que el valor de p en todos los casos es mayor a 0,05.

TABLA No. 30
RESUMEN DE DATOS PARA FACTOR pH

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	O
pH6	8	13,86	1,732	1,62	1,27
pH7	8	10,02	1,252	0,22	0,47
pH8	8	27,57	3,446	4,15	2,03

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 31
ANOVA DE UNA VÍA PARA FACTOR pH

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G.L.	Medios Cuadrados	F	P
Entre grupos	21,27	2	10,63	5,31	0,01
Dentro de los grupos	42,06	21	2,00		
Total	63,34	23			

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa en el crecimiento de *Scenedesmus* en los tres niveles de pH.

Hipótesis alternativa: Existe al menos una diferencia entre los tres niveles de pH en el crecimiento en cuanto a variación de pH.

El anova utiliza los datos de la tabla 30. En este caso se acepta la hipótesis alternativa ya que el valor de p (tabla 31) es menor a 0,05 existe al menos un pH que genera un crecimiento diferente de *Scenedesmus*. En este análisis se comprobó lo presentado en la Figura 6, ya que se nota un crecimiento diferente con el pH más alto, así que pudiera ser recomendable utilizar el pH más básico. La razón de esto puede deberse a que el pH alto influye en la disponibilidad de fósforo; ya que en medio alcalino este nutriente es absorbido por el calcio presente en el agua, mientras que al bajar el pH es decir en un medio ácido, el fósforo se junta con el hierro y aluminio. A este pH alto, también son solubles otros minerales como el hierro, cobre, manganeso y zinc (Richmond, 2004).

TABLA No. 32
TEST DE TUKEY PARA FACTOR pH

Variable	Promedio	Grupos Homogéneos
pH8	3,446	A
pH6	1,732	AB
pH7	1,252	B

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Como resultado del test de Tukey (tabla 32), se puede observar las diferencias entre los grupos en donde el pH8 es similar al pH 6. Dado que el crecimiento de las microalgas es más favorable en un medio básico al controlar el crecimiento bacteriano se elige el pH 8.

5.8.3 Tratamiento estadístico variable iluminancia

TABLA No. 33
TEST DE SHAPIRO-WILK PARA DETERMINACIÓN DE
NORMALIDAD EN LOS DATOS DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus*
EN TRES NIVELES DE ILUMINANCIA

Variable	N	W	P
11W	8	0,97	0,91
22W	8	0,98	0,97
32W	8	0,76	0,01

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

El test de normalidad de Shapiro-Wilk en la tabla 33 indica que no todos los datos poseen distribución normal por el valor de p inferior a 0.05 por lo cual se procede a realizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABLA No. 34
DATOS UTILIZADOS EN KRUSKAL-WALLIS ILUMINANCIA

Variable	Mediana	Rango Promedio	Tamaño de Muestra
11w	5,54	13,3	8
22w	4,54	6,4	8
32w	6,87	17,9	8
Total		12,5	24

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 35
TEST KRUSKAL-WALLIS PARA CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* EN TRES NIVELES DE ILUMINANCIA

H Estadística	8,60
Valor Crítico de H	5,99
P	0,01

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa de crecimiento de *Scenedesmus* entre los tres niveles de iluminancia.

Hipótesis alternativa: Existe al menos una iluminancia que causa un crecimiento diferente de *Scenedesmus*.

Para realizar el test de Kruskal-Wallis se utilizan los valores de la tabla 34. El valor de H estadística (tabla 35) supera al valor teórico, lo que conlleva a rechazar la hipótesis nula. Existe al menos una iluminancia que causa un crecimiento diferente.

TABLA No. 36**TEST COMPARACION DE KRUSKAL-WALLIS ILUMINANCIA**

Variable	Rango Promedio	Grupos Homogéneos
32W	15,20	A
11W	12,00	AB
22W	5,71	B

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Como resultado de este test (tabla 36) se puede concluir que 11W y 32W son los grupos que generan mejor crecimiento de *Scenedesmus*. Dado que 11W (AB) presenta similitud con el grupo de 22W (B) y este es diferente al del grupo de 32W(A), se observa una falta de estabilidad, si se escogiera como óptimo a 11W. Además 32W posee un mayor nivel de luxes el cual se aproxima al valor de luxes existentes en un día soleado, por lo tanto implica acondicionar la iluminancia al nivel natural, lo cual es deseable dentro del cultivo de microalgas.

5.8.4 Tratamiento estadístico factor a comprobar mezcla mejores resultados**TABLA No. 37****DATOS TRATAMIENTO ESTADÍSTICO (cel/mL) FACTOR A
COMPROBAR MEZCLA MEJORES RESULTADOS**

Estándar(Lavens y Sorgeloos, 1996)	Óptimas del presente estudio
1,61x10 ⁶	5,07x10 ⁶
3,11x10 ⁶	8,06x10 ⁶
1,97x10 ⁶	10,4x10 ⁶
2,7x10 ⁶	2,86x10 ⁶
5,24x10 ⁶	4,77x10 ⁶
4,77x10 ⁶	9,42x10 ⁶
7,19x10 ⁶	3,99x10 ⁶
1,78x10 ⁶	1,04x10 ⁶

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 38
TEST DE SHAPIRO-WILK MEZCLA MEJORES RESULTADOS

Variable	N	W	P
Óptimas presente estudio	8	0,88	0,20
Estándar(Lavens y Sorgeloos, 1996)	8	0,95	0,71

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

El resultado del test de Shapiro-Wilk utiliza los datos de la tabla 37 e indica que los dos conjuntos de datos poseen normalidad (valores de P, tabla 38)

TABLA No. 39
RESUMEN DE DATOS PARA EL CONTRASTE ENTRE MEJORES RESULTADOS Y LAS CONDICIONES ESTÁNDAR

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	O
Óptimas presente estudio	8	45,61	5,701	10,780	3,283
Estándar(Lavens y Sorgeloos, 1996)	8	28,26	3,532	4,001	2,0003

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

TABLA No. 40
RESULTADOS DEL ANOVA DE UNA VÍA PARA EL CONTRASTE DEL CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS (DEL PRESENTE ESTUDIO) Y LAS CONDICIONES ESTÁNDAR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	G.L.	Medios cuadrados	F	P
Entre grupos	18,813	1	18,813	2,545	0,0132
Dentro de los grupos	103,474	14	7,391		
Total	122,288	15			

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa en el crecimiento de *Scenedesmus* en condiciones óptimas versus las estándar.

Hipótesis alternativa: Existe una diferencia significativa en el crecimiento de *Scenedesmus* en condiciones óptimas versus las estándar.

En la tabla 39 se presentan los datos de la tabla 37 resumidos para su posterior análisis estadístico. Se acepta la hipótesis nula ya que el valor de p es menor a 0,05 según el análisis de varianza de una vía (tabla 40) y por lo tanto existe una diferencia significativa entre los grupos. Por lo tanto se puede concluir que las condiciones óptimas lograron un mayor nivel de población celular lo que conlleva a un mejor rendimiento de producción.

5.8.5 Tratamiento estadístico del rendimiento en peso seco

TABLA No.41
TEST DE SHAPIRO-WILK PARA DETERMINACIÓN DE
NORMALIDAD EN LOS DATOS DE CRECIMIENTO DE
***Scenedesmus* EN RENDIMIENTO PESO SECO**

Variable	N	W	P
Estándar presente estudio	8	0,85	0,11
Óptimos (Lavens y Sorgeloos, 1996)	8	0,60	0,0002

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Según el test de normalidad (tabla 41) los valores del un grupo condiciones óptimas son menores a 0,05 lo cual indica que no son normales, y al únicamente tener dos variables se procede a realizar el test no paramétrico de Wilcoxon.

TABLA No. 42
TEST U DE MANN-WHITNEY PARA ANALIZAR RENDIMIENTO EN
PESO SECO DE *Scenedesmus* EN CONDICIONES ÓPTIMAS DEL
ESTUDIO Y ESTÁNDAR

Grupos	Cuenta	Media	O'	W	P
Óptimas presente estudio	8	0,18	0,05	89	0,02
Estándar (Lavens y Sorgeloos, 1996)	8	0,15	0,01		

Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Hipótesis nula: No existe diferencia significativa entre el rendimiento de peso seco de *Scenedesmus* en dos tipos de condiciones contrastadas.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia entre el rendimiento de peso seco de *Scenedesmus* en dos tipos de condiciones contrastadas.

Se acepta la hipótesis alternativa ya que el valor de p en la tabla 42 es inferior a 0,05 y existe diferencia de los grupos del ensayo. Según el análisis estadístico (tabla 42) existe diferencia de biomasa (peso seco) de *Scenedesmus* en los dos tipos de condiciones óptimas y estándar se puede ver que las condiciones óptimas del presente trabajo obtienen un mayor rendimiento en cuanto a peso seco de microalgas.

CONCLUSIONES

1. Para el factor de estudio Concentración de Nutrientes que en este caso es Nitrofoska Foliar según el análisis estadístico y las curvas de crecimiento respectivas, se puede concluir que no existe diferencia en cuanto al aporte al crecimiento de *Scenedesmus* en las tres concentraciones probadas 5%, 7,5% y 10%. Por lo que sería recomendable utilizar la Nitrofoska al 5% ya que implica una menor cantidad de medio utilizado con el mismo resultado en crecimiento del alga a un menor costo.
2. Para el factor de pH se puede concluir que la mejor opción es pH8 (similar a lo que se encuentra en el manual de condiciones de la FAO), por consiguiente se concluye que la microalga *Scenedesmus* se adapta mejor a un pH básico en condiciones de laboratorio.
3. En cuanto al factor de iluminancia, si bien se obtuvo un mayor crecimiento gráficamente para 32W que corresponde a 6700 luxes según las mediciones realizadas por el luxómetro este valor es el más próximo del ensayo al valor de 10000 luxes que se presentan en un día soleado. Esto indica que posiblemente se adapta mejor a una mayor cantidad de iluminancia comparado con los factores estándar que se referían a un valor de 1000 luxes (11W) en condiciones de laboratorio. Según el análisis estadístico se comprueba que existe diferencia con el grupo de 22W y se omite el valor de 11W ya que en producción no se podría prever si los resultados de crecimiento de este valor tienden hacia 22W o hacia 32W.
4. Una vez obtenidos los mejores factores, se compararon respecto a las condiciones estándar, resultando que en el crecimiento celular de las microalgas es mayor en condiciones óptimas al igual que en el ensayo de rendimiento en peso seco, el análisis estadístico demuestra un mejor rendimiento para las

condiciones óptimas, lo que indica una mejoría en cuanto a producción de biomasa microalgal.

5. En cuanto al ensayo de tiempo generacional se puede concluir que para la presente investigación el tiempo generacional es de 2,71 horas por generación., que resulta interesante como se pudo comparar.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar la técnica de conteo celular por espectrofotómetro UV, ya que esta técnica permite ahorrar tiempo.
2. Para un uso seguro de la incubadora se recomienda cambiar de posición a las lámparas y colocarlas en la parte superior, de igual manera las planchas de calentamiento cambiarlas de la parte superior a los lados y así evitar incidentes.
3. Utilizar un controlador de temperatura digital para que sea más preciso ya que el controlador de temperatura manual tiene un índice de error de $\pm 4^{\circ} \text{ C}$.
4. Continuar con investigaciones similares para conocer los resultados en un rango más amplio para los factores, para un pH más alto a los valores utilizados en esta investigación, de igual manera con la iluminancia para valores más altos.
5. Evaluar el rendimiento de aceites que produciría la microalga *Scenedesmus*, para su posible aplicación dentro de la producción de biocombustibles
6. Investigar otras fuentes de nutrientes para microalgas y comparar con la Nitrofoska o medios como Guillard

LISTA DE REFERENCIAS

- Abalde, J., & Cid, A. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Coruña: Universidad de Coruña.
- Albarracín , I. (Octubre de 2007). *Microalgas: potenciales productoras de biodiesel*. Recuperado el 16 de mayo de 2013, de XV Simposio electronico internacional : <http://www.ceid.edu.ar/>
- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Recuperado el 10 de enero de 2013, de <http://books.google.com.ec/>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Ratón: CRC Press.
- Bastidas , O. (2012). *Conteo Celular con Hematocitómetro* . Recuperado el 3 de enero de 2013, de Uso Elemental del Hematocitómetro: <http://www.celeromics.com/>
- Bold , H., & Alexopoulos, C. (1987). *Morphology of plants and fungi*. Recuperado el 22 de enero de 2013, de <http://rmbr.nus.edu.sg/>
- Borowitzka , M. (1997). *Algal Culture and Biotechnology*. Recuperado el 10 de enero de 2013, de <http://sphinx.murdoch.edu.au/>
- Borowitzka, M. (30 de Abril de 1999). *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters*. Recuperado el 2012 de noviembre de 21, de Journal of Biotechnology: <http://www.sciencedirect.com/>
- Brito, D., & Milani, N. (Diciembre de 2006). *Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska*.

Recuperado el 12 de enero de 2013, de Scientific Journal form the Experimenal Faculty of Sciences: <http://revistas.luz.edu.ve/>

Chiappa, X., Galindo, M., & Cervantes, A. (2009). *Introducción a los modelos matemáticos decrecimiento con aplicaciones en sistemas biológicos*. Recuperado el 29 de abril de 2013, de <http://www.sisal.unam.mx/>

Chisti, Y. (24 de enero de 2008). *Biodiesel from microalgae beats*. Recuperado el 2013 de enero de 2013, de <http://tur-www1.massey.ac.nz/>

Chu, W.-L. (2012). *Biotechnological applications of microalgae*. Recuperado el 09 de mayo de 2013, de <http://web.imu.edu.my/>

COMPO AGRO. (2010). *Ficha técnica Nitrofoska Foliar 30-10-10*. Recuperado el 5 de enero de 2013, de <http://www.compo-expert.com/>

Coutteau, P. (2006). *Micro-algae*. Recuperado el 12 de enero de 2013, de <ftp://ftp.fao.org>

Damien , A. (2010). *La biomasa fundamentos, tecnologías y aplicaciones*. Madrid: Madrid Vicente.

Dismukes, C., Carrieri, D., & Bennette, N. (2008). *Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels*. Recuperado el 16 de mayo de 2013, de Current Opinion in Biotechnology : <http://www.tamu.edu/>

Dimitrov, K. (Marzo de 2007). *GreenFuel Technologies: A Case Study for Industrial Photosynthetic Energy Capture*. Recuperado el 21 de noviembre de 2012, de <http://www.ecolo.org/>

Encyclopedia-Britannica. (2013). *Scenedesmus*. Recuperado el 21 de enero de 2013, de <http://www.britannica.com/>

Fernández, J. (2010). *Guía completa de la biomasa y los biocombustibles*. Madrid: Vicente Madrid.

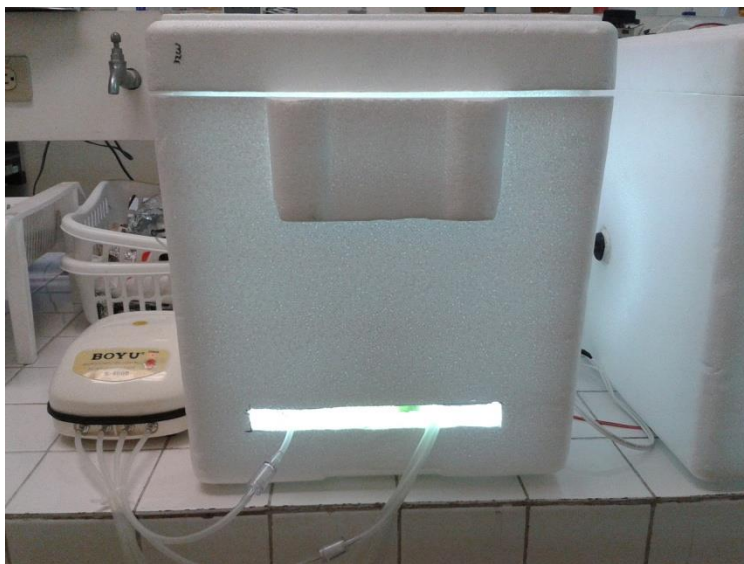
- González, A. (2000). *Alternativas en el Cultivo de Microalgas*. Recuperado el 25 de enero de 2013, de Tesis de Grado.Facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar.ESPOL: <http://www.cib.espol.edu.ec/>
- Guiry, G. (2013). *AlgaeBase*. Recuperado el 22 de enero de 2013, de <http://www.algaebase.org>
- Huntley, M., & Redalje, D. (mayo de 2007). *CO2 Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal*. Recuperado el 25 de enero de 2013, de Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change : <http://www.drfriendly.tv/>
- Joannis-Cassan, C., Spolaore, P., Duran, E., & Isambert, A. (2006). *Comercial Applications of Microalgae*. Recuperado el 28 de noviembre de 2012, de Journal of Bioscience and Bioengineering: <https://wiki.umn.edu/>
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Recuperado el 12 de enero de 2013, de <http://www.fao.org/>
- Lee, J.-S., & Lee, J.-P. (Diciembre de 2003). *Review of advances in biological CO2 mitigation technology*. Recuperado el 28 de noviembre de 2012, de <http://link.springer.com/>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C., & Dubois-Calero, N. (3 de Diciembre de 2008). *Biofuels from Microalgae*. Recuperado el 2012 de noviembre de 2012, de American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers: <http://by.genie.uottawa.ca/>
- Liu, B., & Zhao, Z. (2007). *Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass*. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de Journal of Chemical Technology and Biotechnology: <http://www.researchgate.net/>
- Moronta, R., & Mora, R. (2006). *Respuesta de la microalga Chlorella sokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas*. Recuperado el

- 16 de mayo de 2013, de Revista de la Facultad de Agronomía:
<http://www.scielo.org.ve/>
- NASA. (2013). *Carbon Dioxide Concentration* . Recuperado el 7 de febrero de 2013, de
<http://climate.nasa.gov/>
- Palomino, A., López, J., & Estrada, C. (2010). *Microalgas: potencial para la producción de biodiesel*. Recuperado el 17 de mayo de 2013, de IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas:
<http://www.cbmamona.com.br/>
- Parés, R., & Juárez, A. (202). *Bioquímica de los Microorganismos*. Barcelona: Reverté.
- Prabakaran , P., & Ravindran, D. (25 de Febrero de 2012). *Scenedesmus as a potential source of biodiesel among selected microalgae*. Recuperado el 6 de mayo de 2012, de Current Science: <http://cs-test.ias.ac.in/>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae – A review*. Recuperado el 09 de mayo de 2013, de Journal of Algal Biomass Utilization: <http://jalgabiomass.com/>
- Pulz, O., & Gross, W. (noviembre de 2004). *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de Applied Microbiology and Biotechnology: <http://link.springer.com/>
- Quin, J. (febrero de 2005). *Bio-hydrocarbons from algae : impacts of temperature, light and salinity on algae growth*. Recuperado el 16 de mayo de 2013, de
<https://rirdc.infoservices.com.au/>
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science.
- Romo, A. (2002). *Manual para el cultivo de microalgas* . Recuperado el 12 de enero de 2013, de <http://biblio.uabcs.mx/>

- Schulz, T. (Diciembre de 2006). *The economics of micro-algae production and processing into biodiesel*. Recuperado el 28 de noviembre de 2012, de <http://www.agric.wa.gov.au/>
- Sharma, C., Singh, B., & Upadhyay, S. (20 de febrero de 2008). *Advancements in development and characterization of biodiesel: A review*. Recuperado el 15 de mayo de 2013, de Fuel: <http://www.slashdocs.com/>
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (Julio de 1998). *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae*. Recuperado el 25 de 01 de 2013, de <http://www.nrel.gov/>
- Shelef, G., Sukenik, A., & Green, M. (Agosto de 1984). *Microalgae Harvesting and Processing: A Literature review*. Recuperado el 17 de mayo de 2013, de <http://www.nrel.gov/>
- Song, D., Fu, J., & Shi, D. (3 de marzo de 2008). *Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel*. Recuperado el 25 de enero de 2013, de Chinese journal of biotechnology: <http://wenku.baidu.com/>
- Thompson, P. (2007). *Biotechnology Vo.1 Algal cell culture*. Recuperado el 10 de enero de 2013, de <http://www.eolss.net/>
- Valenzuela , G. (1999). *El Cultivo de microalgas a nivel laboratorio y masivo*. Recuperado el 17 de mayo de 2013, de Tesis de Grado: <http://tesis.uson.mx/>
- Vinod , M., Ashish , W., & Guru , C. (12 de mayo de 2012). *Carbon sequestration potential of Scenedesmus species (Microalgae) under the fresh water ecosystem*. Recuperado el 2012 de noviembre de 2012, de African Journal of Agricultural Research : <http://www.academicjournals.org/>
- Wang , B., Li , Y., Wu, N., & Lan, C. (2008). *CO2 bio-mitigation using microalgae*. Recuperado el 2012 de noviembre de 21, de Appl. Microbiol. Biotechnol.: <http://wenku.baidu.com/>

ANEXOS

Anexo 1: Largo y ancho (Vista Frontal)



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Anexo 2: Largo, ancho y alto (Vista Lateral)



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Anexo 3: Espacio suficiente con frascos y lámparas



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Anexo 4: Ventiladores y cartuchos de calentamiento



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013

Anexos 5: Termostato



Elaborado por: Vidal Pástor y Andrea Pozo, 2013