

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

La búsqueda de fuentes de materias primas amigables con el ambiente, rentables y altamente eficientes ha sido un aspecto trascendental en la investigación mundial debido, principalmente al calentamiento global, uso de agua y suelo, crisis económicas y la contaminación, lo que ha contribuido a un deterioro de la calidad del medio ambiente provocando cambios climáticos severos y afectando negativamente la supervivencia de la biodiversidad incluso la del hombre. Es así que aparecen las microalgas como una alternativa viable, sustentable, ecológica y que ayude a reducir los niveles de dióxido de carbono, la cual tiene un gran campo de aplicación en lo alimenticio, energético, agrícola y ambiental.

## 1.2 Justificación

Las microalgas se pueden utilizar como materia prima para extraer compuestos similares a los extraídos con el petróleo fósil como gasolina, diesel, queroseno y otros materiales como el silicio de alta calidad, igual que el usado para hacer las placas solares (*Serrano M., 2008*) ya que su biomasa en promedio está constituida por 20-30% de lípidos, 40-50% de proteínas y el resto de carbohidratos (hasta 55% en algunas especies), constituyendo así el producto más eficiente para la producción de biomasa en el ciclo de la naturaleza, siendo reconocidas como un excelente recurso medioambiental y biotecnológico (*Albarracín I., 2007*).

Su gran importancia mundial se ha puesto de manifiesto por lo que varias empresas han realizado y empezado investigaciones junto con planes piloto como Petrobras, Continental Airlines, Japan Airlines, Air New Zealand, Repsol, Solix, Bio Fuel Systems, Cellulosa Investments, Sapphire Energy, Solazyme, entre otras.

Las microalgas pueden tener varias aplicaciones, destacando actualmente para la producción de aceites y combustibles, además de su uso como suplemento alimenticio humano y animal, fuente de ácidos grasos, producción de energía eléctrica, uso como abono y fertilizante agrícola. Cabe resaltar que muchas de estas aplicaciones tienen un potencial de reducción del carbono y de ser carbón neutro debido al reciclaje y absorción de dióxido de carbono atmosférico, el cual es su principal nutriente, y reutilización de agua (*Dimitrov K., 2007*). También ofrece una solución económicamente factible y ambientalmente sustentable (*Wang B. et al., 2008*); con la ventaja añadida de que las microalgas no compiten en el mercado alimenticio (*BIODISOL, 2008*).

Entre las ventajas de la producción de aceite de microalgas para la elaboración de biodiesel se menciona que en una superficie de una hectárea se puede producir el equivalente a 136900 litros de aceite de microalgas, cuya biomasa seca contenga un 70% de aceite. En cambio, una hectárea de suelo fértil para cultivo de soja produciría 446 litros, para cultivo de maíz 172 litros y para el cultivo de palma 5950 litros (*D'Andrea A., 2008*). Además las microalgas no ocupan espacios grandes para su cultivo ya que se lo puede realizar en piscinas o fotobiorreactores a lo alto, añadiendo que no compiten con fuentes alimenticias. También el cultivo de microalgas no requiere del uso de pesticidas y herbicidas para un buen rendimiento. Esto refleja un impacto positivo desde el punto de vista ambiental y ecológico (*Martínez J., 2008*). Además las microalgas son consideradas como la única fuente renovable de biodiesel que puede desplazar al diesel derivado del petróleo (*CHISTI Y., 2007*) al igual que ofrecer una solución económicamente factible y ambientalmente sustentable. (*WANG B., et al. 2008*).

Actualmente en el Ecuador no existen estudios publicados acerca de la utilización de microalgas como fuente de materia prima de aceites, lo que indica un potencial biotecnológico, económico y ecológico, por lo que el estudio de microalgas nativas con un contenido de aceite entre 22 - 80% en peso seco permitirá consolidar tanto a la Escuela Politécnica del Ejército como a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología como pioneros en este estudio científico a nivel nacional y competitivo a nivel internacional.

### **1.3 Objetivos**

#### 1.3.1 General

Evaluar el rendimiento de producción de aceite en cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio.

#### 1.3.2 Específicos

- Aislar e identificar las cuatro microalgas de diversos cuerpos de agua de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.
- Establecer el cultivo a nivel de laboratorio de las cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.
- Determinar el crecimiento máximo y la producción de biomasa de las cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.
- Determinar comparativamente el contenido de aceite en la biomasa seca de las cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.

- Seleccionar el medio de cultivo y la condición de iluminancia óptimos para la producción de aceite de las cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Generalidades de las microalgas**

Las microalgas son un grupo muy diverso de algas microscópicas unicelulares (*cuadro 1.1*) que poseen, como mínimo, clorofila *a*, habitan principalmente en medios acuáticos, pero también se encuentran en diversos suelos y adheridos a superficies. Generalmente son de vida libre ya sea unicelular o en colonias, sin embargo ciertas microalgas viven en simbiosis con diversos organismos (*Richmond A., 2004*). Las células de microalgas pueden ser tanto procariotas como eucariotas, llegándose a establecer más de 26000 especies distintas de microalgas conocidas, suponiendo un número mayor aun por descubrir (*Stevenson J. et al., 1996*).

Las microalgas, consideradas como los primeros microorganismos fotosintéticos, siendo la forma más primitiva de plantas (*Sheehan J. et al., 1998*) tienen gran responsabilidad en la formación de la atmósfera terrestre. Su estructura unicelular es muy eficiente en el uso de la luz y en la absorción de nutrientes. Además, constituyen la base de las cadenas tróficas que permiten la vida en los océanos lo que equivale a aproximadamente más del 70% de la biomasa mundial (*Albarracín I., 2007*). A pesar de su gran importancia para nuestro planeta, la explotación de estos organismos por el hombre no ha ido más allá de contados casos a lo largo de la historia (*Mendoza H., 2003*).

Cuadro 1.1.- Esquema de clasificación de los diferentes grupos de microalgas.

Reino	División	Clase
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta Prochlorophyta	Cyanophyceae Prochlorophyceae
Eukaryota	Glauphyta Rhodophyta  Heterokontophyta  Haptophyta Cryptophyta Dinophyta Euglenophyta Chlorarachniophyta Chlorophyta	Glacophyceae Bangiophyceae Florideophyceae  Crhysophyceae Xanthophyceae Bacillariophyceae Raphidophyceae Dictyochophyceae Phaeophyceae  Haptophyceae Cryptophyceae Dinophyceae Euglenophyceae Chlorarachniophyceae Prasinophyceae Chlorophyceae Ulvophyceae Cladophorophyceae Bryopsidophyceae Zygnematophyceae Trentepohliophyceae Klebsormidiophyceae Charophyceae Dasycladophyceae

Fuente: Barsanti L. & Gualtieri P., 2006.

Estos organismos unicelulares pueden tomar el CO<sub>2</sub> de diversas fuentes como la atmósfera, gases industriales e incluso de sales de carbono solubles, éstas dos últimas representan un grave problema de contaminación del planeta (*Wang B. et al., 2008*). Es decir que su crecimiento en suspensión (no adherido a superficie sólida) favorece el acceso ilimitado al agua y el acceso más eficiente al CO<sub>2</sub> y a los nutrientes. Además, se puede instalar cultivos de microalgas cerca de lugares contaminantes, ya que las microalgas obtendrían CO<sub>2</sub> o los óxidos nítricos de estos sitios, lo que permitiría y ayudaría a reducir los niveles de contaminación (*Albarracín I., 2007*).

Cabe resaltar el crecimiento extremadamente rápido de las microalgas en comparación con plantas oleaginosas usadas para producir aceite (*cuadro 1.2*), considerando que el tiempo de duplicación de las microalgas durante su crecimiento exponencial es en promedio 3.5 horas (*Chisti Y., 2007*), es decir, que las cosechas de la biomasa de microalgas se la puede hacer diariamente entre 8 y 24 horas a diferencia de plantas terrestres, en el que su crecimiento y cosecha puede ser entre 1 a 2 veces por año como es el caso de la soja (planta más cultivada en USA para producir aceite en la fabricación de biodiesel). Adicionalmente las condiciones climáticas también pueden afectar el cultivo y cosecha de plantas terrestres, a diferencia del cultivo de microalgas que no son afectadas severamente por condiciones climáticas desfavorables ya que pueden ser cultivadas en sistemas cerrados o fotobiorreactores (*Serrano M., 2008*).

Cuadro 1.2.- Contenido de aceite de algunas microalgas

<b>Microalga</b>	<b>Contenido de aceite (% peso seco)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella</i> sp.	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris</i> sp.	20 – 35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia</i> sp.	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

Fuente: Chisti Y., 2007

En otras palabras, la productividad de las microalgas es entre 30 y 100 veces superior a cultivos como el de soja, a más que su cultivo no

compite con la agricultura ya que no necesitan terrenos de uso agrícola. Las instalaciones de producción de microalgas son cerradas y no requieren tierra para su crecimiento, usan un 99% menos cantidad de agua que la agricultura convencional gracias a la reutilización de agua y pueden ubicarse en terrenos no dedicados a la agricultura y situados lejos del agua (*BIOD2, 2008*).

Según Chisti Y. (2007) se requiere entre el 1 - 3% del total del área cultivable de Estados Unidos para cubrir con el 50% de la demanda de diesel para el transporte, si es que este combustible es elaborado a partir de microalgas. Además, otro factor relevante: estos cultivos pueden instalarse directamente junto a centrales energéticas, ya que las microalgas se benefician incluso de las emisiones nocivas para el clima que expelen las chimeneas, como el dióxido de carbono o los óxidos nítricos, lo cual reduce el costo de compra de nutrientes.

#### **1.4.2 Factores reguladores del crecimiento**

Ciertas condiciones ambientales, como la luz, temperatura, pH, entre otras pueden afectar el crecimiento y la asimilación de los nutrientes por parte de las microalgas, necesitándose más nutrientes cuando la luz y la temperatura son menores a los valores óptimos para su crecimiento (*Stevenson J. et al., 1996*).

La luz es la fuente de energía que lidera las reacciones fotosintéticas, por lo que la calidad, cantidad y fotoperiodo deben ser considerados al trabajar con microalgas ya que estas características varían de acuerdo al tipo de microalga a ser cultivada afectando al crecimiento y a la síntesis de compuesto orgánicos como lípidos, carbohidratos, proteínas, entre otros. Asimismo si la intensidad de la luz es muy fuerte puede darse el

efecto de fotoinhibición, ocasionando, entre otros efectos, disminución en el crecimiento (*Barsanti L. & Gualtieri P., 2006*).

La temperatura también regula el metabolismo de las microalgas, así como también la composición de la biomasa y la velocidad de crecimiento, siendo el rango óptimo para la mayoría de microalgas, entre 18 y 22° C (*FAO, 2008*).

Con respecto al pH, el rango óptimo de la mayoría de microalgas se encuentra entre 7 y 9 (*FAO, 2009*), siendo soportables valores mayores a éstos, ya que valores ácidos generalmente causan muerte de las microalgas (*Richmond A., 2004*). También afecta a la solubilidad de varios compuestos en el medio de cultivo, por lo que a un pH elevado disminuye la asimilación de ciertos metales traza. Diversos valores de pH ocasionan disociación de ciertas sales en sus componentes, pudiendo estos últimos tener efecto tóxico o inhibitorio para el crecimiento microalgal (*González A., 2000*).

La turbulencia en el medio de cultivo es de gran relevancia ya que permite una distribución homogénea de las microalgas en su medio, facilita la asimilación de nutrientes y captación de la luz, mejora el intercambio gaseoso y posee función termoreguladora. La salinidad regula el crecimiento principalmente en base a la ósmosis, siendo muy variable entre microalgas y puede ocasionar efectos letales en el cultivo (*González A., 2000*).

Dentro de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, se destaca el carbono, cuya fuente principal es el dióxido de carbono, el cual representa aproximadamente el 50 % en peso seco (*Chisti Y., 2009*). El nitrógeno representa el 7-10% en peso seco y forma parte de moléculas esenciales como proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, entre



otros. El fósforo también es otro macronutriente importante que interviene en los procesos metabólicos para un crecimiento y desarrollo normal de las microalgas, generalmente constituye el 1% en peso seco. Otros macronutrientes son el azufre, potasio, sodio, hierro, magnesio y calcio; mientras que los elementos traza pueden ser boro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, cobalto, vanadio y selenio (*Richmond A., 2004*).

La concentración de los nutrientes en el medio de cultivo también regula el metabolismo y la composición de la biomasa de la microalga, siendo conocidas las deficiencias de nitrógeno que provoca un aumento en la síntesis de lípidos o la deficiencia de fósforo un aumento en carbohidratos, sin embargo no siempre ocurre esto y los efectos son muy variados por lo que no es posible generalizar este comportamiento en todas las microalgas (*Richmond A., 2004*).

A pesar de contar con rangos óptimos para los factores de crecimiento, es necesario estudiar las interacciones de los mismos y sus efectos sobre una determinada microalga.

### **1.4.3 Aplicación Científica y Tecnológica de las microalgas**

La aplicación científica y tecnológica de las microalgas surgió a partir de la escasez de alimento en el mundo, entre 1935-1940, en la cual se buscaba implementar sistemas algales como nuevas fuentes de proteínas (*Albarracín I., 2007*). Durante la II Guerra Mundial científicos alemanes empezaron a cultivar microalgas masivamente para obtener lípidos y proteínas, reconociendo a la biomasa algal como un suplemento alimentario importante (*Venkataraman L., 1985*).

Es ahora que su aplicación biotecnológica está siendo investigada seriamente, no solo como una nueva fuente alimenticia, sino también como

un producto energético, agrícola, acuícola y nutricional, destacando el uso de su aceite para la elaboración de biodiesel (*Chisti Y., 2007*) ya que las microalgas pueden constituir una fuente alternativa, renovable y ecológica muy eficiente gracias a su capacidad de convertir la energía solar en compuestos químicos útiles a una velocidad mucho mayor que cualquier otra fuente vegetal; pero para constituir esta nueva fuente se debe encontrar una microalga que sea adaptable a condiciones artificiales de cultivo y con alto contenido de lípidos y aceites especialmente omega 3, omega 6, DHA, mientras que el remanente, es decir, la porción de microalga no lipídica, puede ser usada para elaborar diferentes productos industriales en base a carbohidratos como etanol o suplementos proteínicos, colorantes, biofertilizantes, antioxidantes y tratamientos de aguas residuales ricas en nitrógeno y fósforo (*Johnson M., 2009*). La mayoría de la producción comercial de microalgas está encaminada al mercado de la alimentación saludable, principalmente como tabletas y cápsulas de biomasa microalgal (*Raja R. et al., 2008*).

La producción de algas utilizadas para la producción de combustibles, surgió en USA a finales de los años 70's en el que se creó el nombrado "Programa de Especies Acuáticas" el cual surgió como efecto de la crisis del petróleo de esa época (*Sheenan J. et al., 2009*).

Varios países se han vinculado a la investigación de la obtención de biocombustibles, especialmente biodiesel, como Petrobras en Brasil, Repsol en España, Solix en USA, Bio Fuel Systems en España, Cellulosa Investments en España, Sapphire Energy en USA, Solazyme en USA, sumándose otro país suramericano, Argentina, el cual en la provincia de Chubut está produciendo 10 toneladas al día de biodiesel a partir de microalgas (*Next fuel, 2008*).

*“Las microalgas son la materia prima descubierta hasta la actualidad más eficiente de cara a la producción de biocombustibles como biodiesel, bioetanol y biobutanol; con la ventaja añadida de que las microalgas no compiten en el mercado alimenticio” (BIODISOL, 2008).*

Recientes investigaciones en USA, demuestran que no es necesario extraer el aceite de las microalgas para usarlo como biocombustibles para aviones jet, este descubrimiento es conocido como Dry Process Algae Bio Jet Fuel, el cual únicamente consta de la biomasa seca y pulverizada de las microalgas con un contenido mínimo de aceite del 15% en peso seco ([Algae Aviation Fuel, 2010](#)).

## **1.5 Hipótesis**

El rendimiento de producción de aceite de cada microalga nativa de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha varía según las condiciones de iluminancia y de medio de cultivo que se apliquen a nivel de laboratorio.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

- **Instituciones:** Escuela Politécnica del Ejército (ESPE). Proyecto de Iniciación Científica 2009.
- **Personas:**
  - Directora: M. Sc Alma Koch
  - Codirectora: Dra. Blanca Naranjo
  - Tesista: Sr. Andrés Portilla

### **2.2 Zona de Estudio**

El trabajo de campo se lo realizó en las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha, mientras que el trabajo de laboratorio fue desarrollado en los Laboratorios de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y del CEINCI (Centro de Investigaciones Científicas), ESPE - Sangolquí, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha.

### **2.3 Período de tiempo de investigación**

Desde junio 2009 hasta junio 2010.

### **2.4 Diseño**

El diseño experimental es factorial mixto y consta de dos factores con tres repeticiones aplicadas a las cuatro microalgas aisladas:

- Factor A: Iluminancia
  - 2000 lux
  - 6000 lux

- 10000 lux
- Factor B: medio de cultivo
  - Medio 1.- normal (N)
  - Medio 2.- fertilizante agrícola (FA)
  - Medio 3.- fertilizante agrícola complementado (FAC)
  - Medio 4.- agua de vertiente (AV)
  - Medio 5.- agua de vertiente complementado (AVC)
- Variables: Morfología, Viabilidad, Densidad celular, Tasa de crecimiento, Biomasa de microalga, Aceite de microalga.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Recolección de las muestras, aislamiento e identificación de las microalgas**

La recolección de las muestras para el aislamiento de las cuatro microalgas se lo realizó tomando de 200 a 500 mL de diferentes cuerpos de agua de las Provincias de Imbabura, Pichincha, Esmeraldas y Orellana, en los que se buscó las microalgas *Botryococcus* sp., *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Synechocystis* sp.

La identificación de las cuatro microalgas fue realizada mediante observación microscópica de las muestras diluidas en base a claves internacionales según Whitford L. & Schumacher G. (1973), Hibbert D. (*Algaebase* 2009), Komárek & Anagnostidis (1998), Bergey (*Hensyl W.*, 2000) y confirmación del Dr. Ever Morales del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Universidad del Zulia (Venezuela).

## 2.5.2 Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos de las cuatro microalgas fueron mantenidos a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, aireación constante a razón de 70 litros por hora, fotoperiodo 12:12 e iluminancia de 2000, 6000 y 10000 lux.

Se utilizaron cinco medios de cultivo (*ver composición en ANEXO A*) para cada microalga, denominados como:

- Normal (N).- medio de cultivo generalmente usado en laboratorio para cada microalga
  - Medio F/2 para *Nannochloropsis* sp.
  - Medio Beijerinck para *Chlorella* sp.
  - Medio BG11 para *Synechocystis* sp.
  - Medio Chu-13 para *Botryococcus* sp.
- Agua de vertiente (AV).- obtenida de una vertiente natural en el bosque de Pasochoa. Análisis físico químico en Anexo B
- Agua de vertiente complementado (AVC).- es el medio AV complementado con  $0.5 \text{ mL.L}^{-1}$  de fertilizante Nitrofoska foliar líquido.
- Fertilizante agrícola (FA).-  $1 \text{ mL. L}^{-1}$  de fertilizante foliar líquido Nitrofoska 10-4-7.
- Fertilizante agrícola complementado (FAC).- medio FA complementado con  $1 \text{ mL. L}^{-1}$  de micronutrientes.

De esta manera se obtienen los siguientes tratamientos (Medio de cultivo x Iluminancia) en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Tratamiento aplicados en este estudio

Iluminancia (lux) Medio de cultivo	2000	6000	10000
<b>N</b>	T1	T2	T3
<b>AV</b>	T4	T5	T6
<b>AVC</b>	T7	T8	T9
<b>FA</b>	T10	T11	T12
<b>FAC</b>	T13	T14	T15

### 2.5.3 Densidad celular

La densidad celular de las microalgas fue determinada mediante conteo de las células en la cámara de Neubauer cada 24 horas hasta que el cultivo alcance la fase estacionaria.

La estimación del número de células por mililitro se realizó según la descripción de Castillo G. (2004):

Núm. células en  $0,1 \text{ mm}^3 = (\text{núm. total células contadas}/\text{núm. cuadros } 0,04 \text{ mm}^2)$

Esto dará el número total de células por  $0,1 \text{ mm}^3$  (volumen obtenido de multiplicar el área de  $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$  de profundidad de la cámara).

El número de células por mililitro se obtendrá de multiplicar el valor obtenido anteriormente por 10 000.

$\text{Núm. Cél} \times \text{mL} = \text{núm.células en } 0,1 \text{ mm}^3 \times 10000$

También se obtuvo una ecuación de regresión entre absorbancia y densidad celular, ésta fue obtenida mediante medición de absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro UV.

#### 2.5.4 Tasa de crecimiento

Se utilizó la ecuación descrita en Prescott L. *et al.* (2004):

$$\mu = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,310 \cdot t}; \text{ donde}$$

$\mu$  = tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

$\log N_t$  = logaritmo en base 10 de la densidad celular en un tiempo “t”  
(cél.mL<sup>-1</sup>)

$\log N_0$  = logaritmo en base 10 de la densidad celular inicial (cél.mL<sup>-1</sup>)

t = tiempo (días)

La tasa de crecimiento se obtuvo considerando el día en el que los cultivos de microalga alcanzaron la densidad celular máxima (*Oshé S. et al., 2008*).

#### 2.5.5 Cosecha y secado de la biomasa

Una vez que los cultivos de microalgas alcanzaron la fase estacionaria, fueron centrifugados en tubos falcon de 50 mL durante 10 minutos a 6000 rpm. La biomasa precipitada fue colocada mediante una espátula en cajas de Petri para su posterior secado (*Chiu S. et al., 2008*). El secado se lo realizó en estufa al vacío a 45 °C sin sobrepasar los 60 °C (*Sieg D., 2008*). Transcurrido el tiempo de secado, la biomasa fue retirada de las cajas de Petri con espátulas fue almacenada en frascos ámbar totalmente sellados y en oscuridad.



### **2.5.6 Extracción de aceite**

La biomasa seca fue decolorada mediante el uso de disolvente alcohol-cetona (50% acetona, 50% etanol). El alcohol-cetona fue cambiado cada 24 horas durante tres a ocho días en maceración hasta observar que el disolvente no presentaba coloración. Esta renovación de disolvente se realizó mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue retirado con una micropipeta y almacenado en oscuridad para su posterior cuantificación y separación del alcohol-cetona en rotavapor Buchi RII.

Una vez decolorada la biomasa se procedió a la extracción del aceite usando hexano como disolvente en equipo de Soxhlet a temperatura de ebullición durante seis a nueve horas y luego separación en rotavapor hasta 80° C hasta ebullición total del hexano (*ISPC, 2008*).

## **2.6 Análisis de Datos**

Los datos obtenidos de las variables analizadas fueron validados mediante análisis de varianza (ANOVA) y una diferencia mínima significativa (LSD), se utilizó el software SPSS 15.0.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 *Chlorella* sp.**

#### **3.1.1 Aislamiento e identificación**

La muestra de agua fue tomada de la Provincia de Orellana (*figura 3.1*), La Joya de los Sachas. El cuerpo de agua fue una acequia con vegetación de mediana altura, con profundidad aproximadamente entre 30 a 40 centímetros, agua estancada. La cantidad de muestra fue de 200 mL.

Las coordenadas son latitud 0°19'27.94" S y longitud 76°55'57.6" O, y altitud de 280 msnm.



Figura 3.1.- Vista del sitio de muestreo de la Provincia de Orellana

De acuerdo a las claves de identificación según *Whitford L. & Schumacher G. (1973)* se obtuvo las siguientes características:

- Células solitarias esféricas o globosas
- Unicelular, sin motilidad
- Color verde
- Hábitat: agua dulce
- No forma colonias
- Célula de vida libre
- Ausencia de mucílago
- Diámetro celular: 2-10  $\mu\text{m}$
- Presencia de un pirinoide
- Formación de autosporas
- Clasificación:

Dominio Eukaryota

Reino Plantae

Subreino Viridiaeplantae

Filo Chlorophyta

Clase Trebouxiophyceae

Orden Chlorellales  
Familia Chlorellaceae  
Género *Chlorella*

La muestra de agua de la acequia con vegetación (La Joya de los Sachas) fue inoculada en medio algal sólido mantenido en fotoperiodo de 12:12 horas. Una vez observado la aparición de las primeras colonias de microalgas, éstas fueron inoculadas en medio nuevo algal sólido con lo que se obtuvo colonias unialgales de *Chlorella* sp. (figura 3.2)

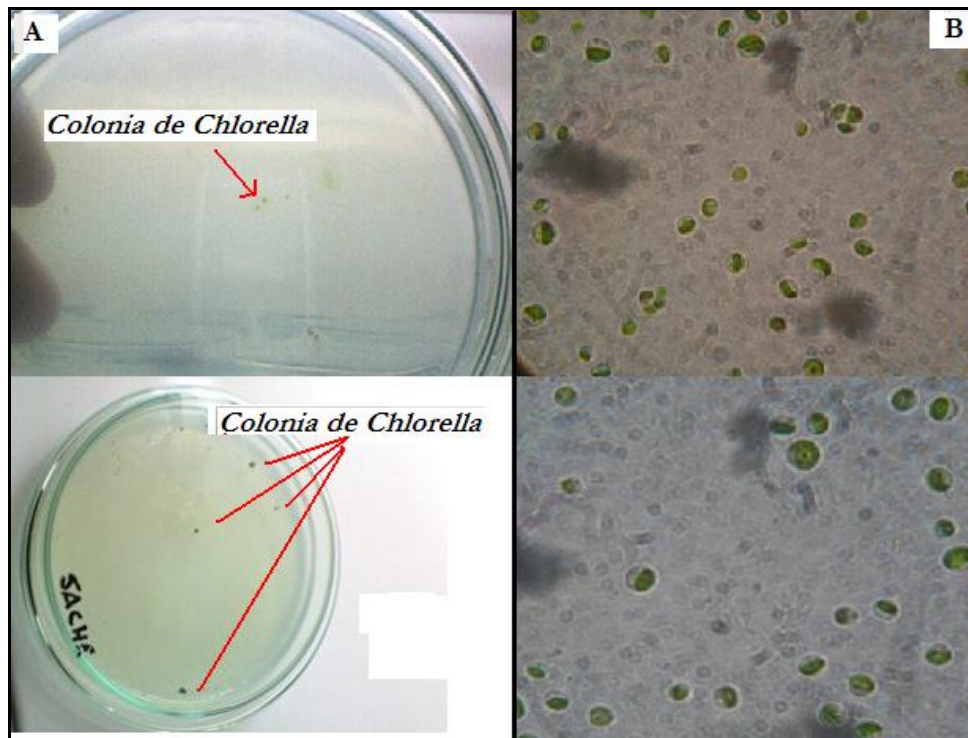


Figura 3.2.- **A-** colonias de *Chlorella* sp. de la muestra original de Sacha en medio algal sólido. **B-** vista al microscopio (100x) de *Chlorella* sp. de la muestra original de Sacha.

### 3.1.2 Densidad celular máxima

Se obtuvo la curva de calibración Absorbancia a 750 nm versus el número de células por mililitro que indica un  $R^2$  de 0,96 (figura 3.3).

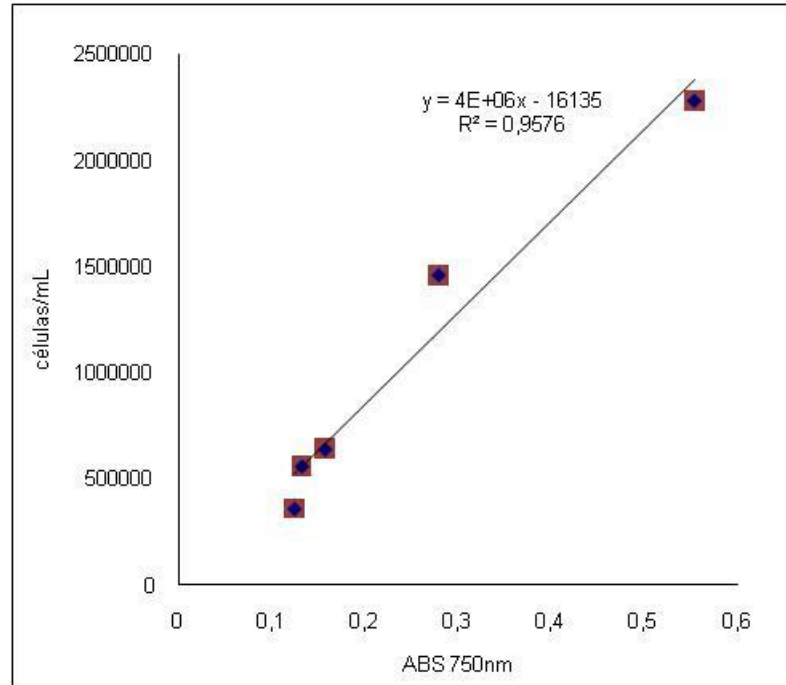


Figura 3.3.- Relación entre densidad celular de *Chlorella* sp. y absorbancia a 750 nm.

Los valores obtenidos con respecto a la densidad celular máxima ( $\text{cel. mL}^{-1}$ ) de la microalga *Chlorella* sp. se muestran en la tabla 3.1, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $4,71 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$  en el medio Agua de Vertiente Complementado a 10000 lux y el menor de  $1,43 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$  en Agua de Vertiente a 2000 lux.

Tabla 3.1.- Densidades celulares máximas (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	3286387	3518387	3610387	1438386	1662387	2294387	4074386.5	4450387	4758387	3434386	4170387	4394387	4233186	4394387	4518387
II	3382387	3566387	3606387	1434386	1666387	2278387	4250386.5	4478387	4678387	3126386	4174387	4390387	4246386	4438387	4598387
III	3294387	3586387	3626387	1414386	1662387	2290387	4254386.5	4454387	4702387	3162386	4170387	4390387	4230386	4390387	4478387
<b>Promedio</b>	3321053	3557053	3614387	1429053	1663720	2287720	4193053	4461053	4713053	3241053	4171720	4391720	4236653	4407720	4531720

La figura 3.4 muestra que los valores más altos se obtuvieron a 10000 lux, mientras que los menores a 2000 lux en todos los medios de cultivo, siendo siempre menor en el medio Agua de Vertiente.

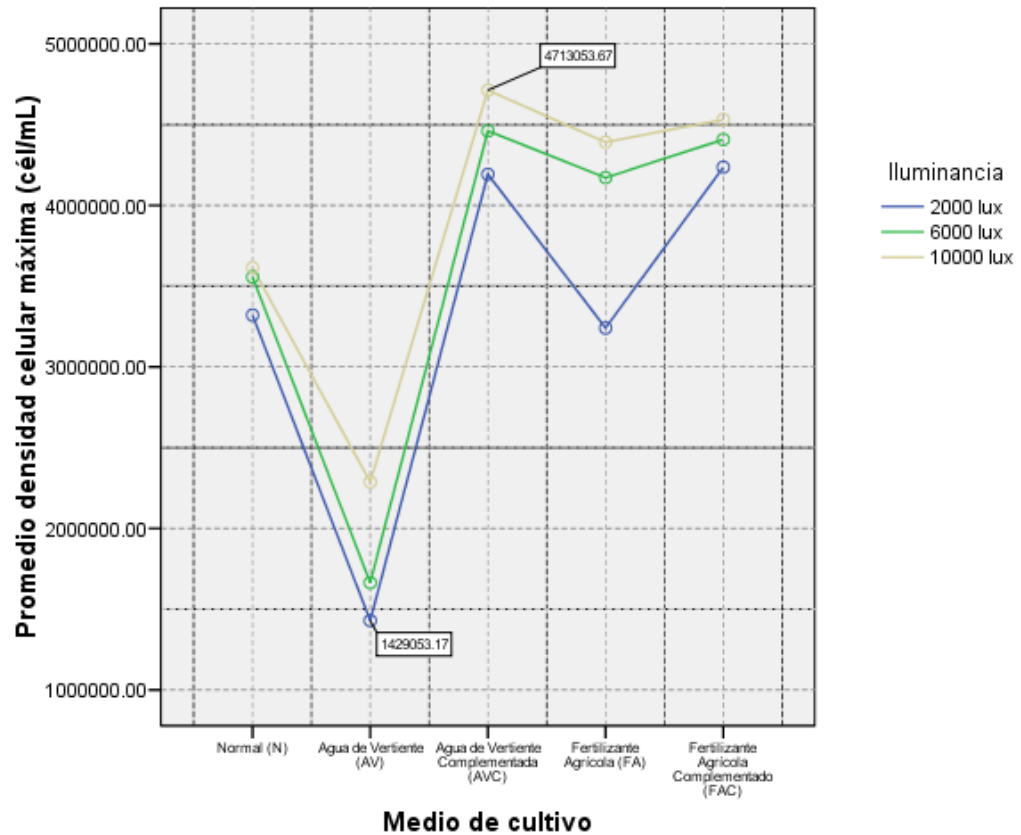


Figura 3.4.- Densidades celulares máximas promedio de *Chlorella* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la densidad celular máxima de *Chlorella* sp. (tabla 3.2) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia≠0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo ≠0

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la tabla 3.2 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la densidad celular máxima de *Chlorella* sp.

Tabla 3.2 Análisis de Varianza con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Iluminancia	2947787706580,287	2	1473893853290,144	444,173	0,000
Medio de cultivo	42701005070222,230	4	10675251267555,550	3217,09	0,000
Iluminancia * Medio de cultivo	1155004060444,441	8	144375507555,556	43,509	0,000
Error	99548693333,334	30	3318289777,778		
Total	634880984392203,000	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.3 de la DMS muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Como se observa, los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T1(N.2000) = T10(FA.2000), T2(N.6000) = T3(N.10000), T7(AVC.2000) = T11(FA.6000) = T13 (FAC.2000), T8(AVC.6000) = T12(FA.10000) = T14(FAC.6000), y T8(AVC.6000) = T15(FA.10000).

Tabla 3.3.- DMS con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T10 (FA.2000)	80.000,00000	47.033,95779	0,099	-16.056,1565	176.056,1565
T2 (N.6000)	T3(N.10000)	-57.333,33333	47.033,95779	0,232	-153.389,4898	38.722,8232
T7 (AVC.2000)	T11 (FA.6000)	21.333,33333	47.033,95779	0,653	-74.722,8232	117.389,4898
	T13 (FAC.2000)	-43.600,00000	47.033,95779	0,361	-139.656,1565	52.456,1565
T8 (AVC.6000)	T12 (FA.10000)	69.333,33333	47.033,95779	0,151	-26.722,8232	165.389,4898
	T14 (FAC.6000)	53.333,33333	47.033,95779	0,266	-42.722,8232	149.389,4898
	T15 (FA.10000)	-70.666,66667	47.033,95779	0,143	-166.722,8232	25.389,4898
T15 (FA.10000)	T8 (AVC.6000)	70.666,66667	47.033,95779	0,143	-25.389,4898	166.722,8232

### 3.1.3 Tasa de crecimiento

Los valores obtenidos con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de la microalga *Chlorella* sp. se muestran en la tabla 3.4, en la cual se observa que el valor más alto fue de 0,19 d<sup>-1</sup> en el medio Normal a 6000 y 10000 lux y el menor de 0,12 d<sup>-1</sup> en Fertilizante agrícola a 2000 lux y en Fertilizante agrícola complementado a 2000 y 6000 lux.



Tabla 3.4.- tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,18	0,19	0,19	0,14	0,16	0,19	0,13	0,14	0,16	0,13	0,15	0,17	0,13	0,13	0,15
II	0,17	0,19	0,19	0,14	0,16	0,18	0,13	0,14	0,16	0,12	0,14	0,16	0,11	0,12	0,13
III	0,17	0,19	0,19	0,14	0,15	0,18	0,13	0,14	0,16	0,13	0,15	0,17	0,11	0,12	0,13
<b>Sumatoria</b>	0,52	0,57	0,57	0,42	0,48	0,55	0,38	0,42	0,47	0,37	0,44	0,50	0,35	0,37	0,41
<b>Promedio</b>	0,17	0,19	0,19	0,14	0,16	0,18	0,13	0,14	0,16	0,12	0,15	0,17	0,12	0,12	0,14

La figura 3.5, muestra que los valores menores fueron a 2000 lux en todos los medios de cultivo, y los más altos se obtuvieron a 10000 lux, sin embargo existe una igualdad con el valor a 6000 lux en el medio Normal, siendo éstos los mayores.

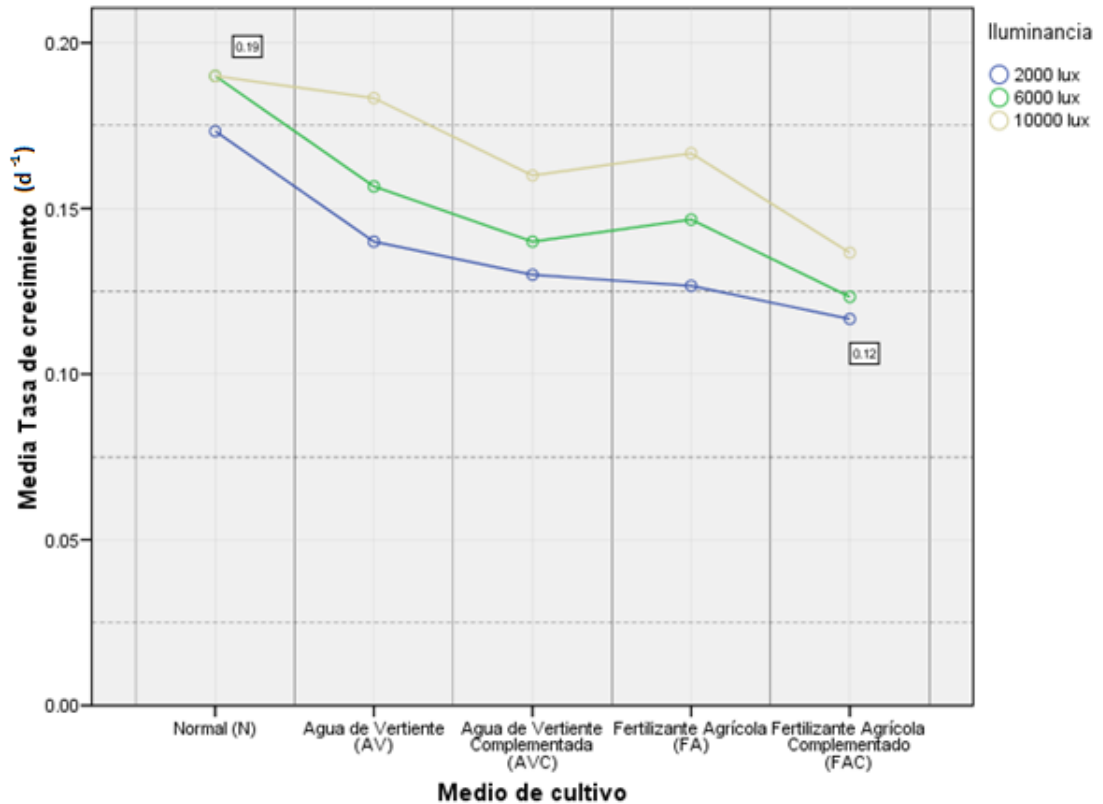


Figura 3.5.- Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) promedio de *Chlorella* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. (tabla 3.5) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

H<sub>0</sub>: efecto iluminancia=0

H<sub>a</sub>: efecto iluminancia≠0

H<sub>0</sub>: efecto del medio de cultivo=0

H<sub>a</sub>: efecto del medio de cultivo ≠0

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la *tabla 3.5* muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la tasa de crecimiento de *Chlorella* sp.

*Tabla 3.5* Análisis de Varianza con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Iluminancia	0,007	2	,003	101,400	0,000
Medio de cultivo	0,017	4	,004	129,567	0,000
Iluminancia * Medio de cultivo	0,001	8	,000	4,067	0,002
Error	0,001	30	3,33E-005		
Total	1,066	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La *tabla 3.6* muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.6.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T12 (FA.10000)	0,00667	0,00471	0,168	-0,003	0,0163
T2 (N.6000)	T6 (AV.10000)	0,00667	0,00471	0,168	-0,003	0,0163
	T3(N.10000)	0	0,00471	1	-0,0096	0,0096
T4 (AV.2000)	T11 (FA.6000)	-0,00667	0,00471	0,168	-0,0163	0,003
	T8 (AVC.6000)	0	0,00471	1	-0,0096	0,0096
	T15 (FAC.10000)	0,00333	0,00471	0,485	-0,0063	0,013
T5 (AV.6000)	T9 (AVC.10000)	-0,00333	0,00471	0,485	-0,013	0,0063
T7 (AVC.2000)	T10 (FA.2000)	0,00333	0,00471	0,485	-0,0063	0,013
	T14 (FAC.6000)	0,00667	0,00471	0,168	-0,003	0,0163
	T15 (FAC.10000)	-0,00667	0,00471	0,168	-0,0163	0,003
T12 (FA.10000)	T9 (AVC.10000)	-0,00667	0,00471	0,168	-0,0163	0,003
T13 (FAC.2000)	T14 (FAC.6000)	0,00667	0,00471	0,168	-0,003	0,0163
T15 (FAC.10000)	T4 (AV.2000)	-0,00333	0,00471	0,485	-0,013	0,0063
	T7 (AVC.2000)	0,00667	0,00471	0,168	-0,003	0,0163
	T8 (AVC.6000)	-0,00333	0,00471	0,485	-0,013	0,0063

Como se observa en la *tabla 3.6* y en la *figura 3.6*, los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T1(N.2000) = T12(FA.10000), T2(N.6000) = T3(N.10000) = T6 (AV.10000), T4 (AV.2000) = T8(AVC.6000) = T15 (FAC.10000), T5 (AV.6000) = T9 (AVC.10000), T7 (AVC.2000)= T10(FA.2000) = T14(FAC.6000) = T15 (FA.10000), T12 (FA.10000) = T9 (AVC.10000), T13

(FAC.2000) = T14 (FAC.6000) y, T15 (FAC.10000) = T4 (AV.2000) = T7 (AVC.2000) = T8(AVC.6000).

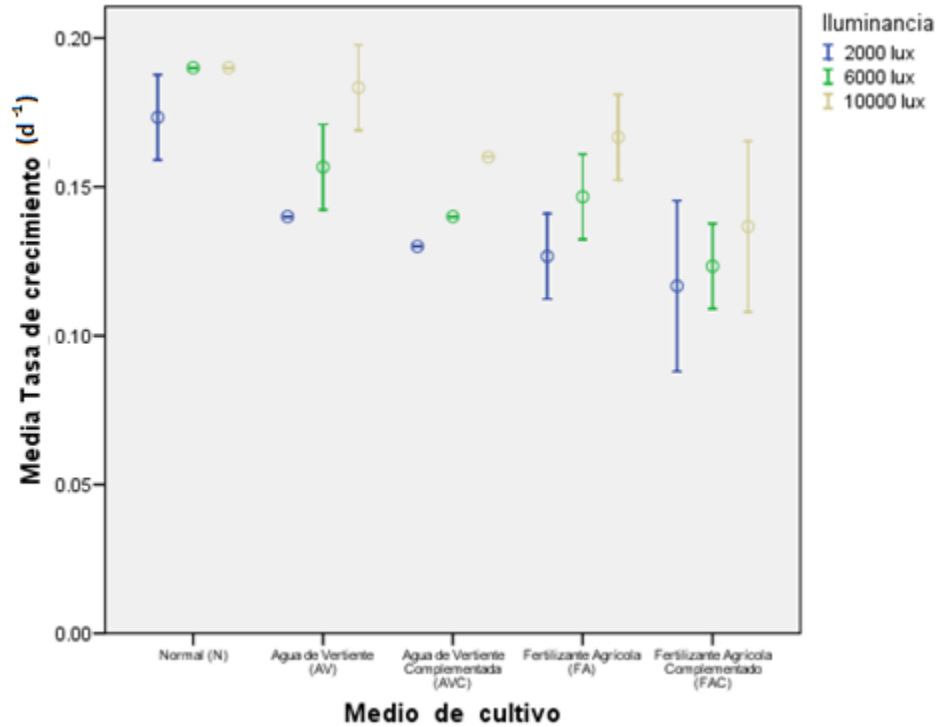


Figura 3.6.- Medias de Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. con intervalos de diferencia mínima significativa.

### 3.1.4 Biomasa

Los valores obtenidos con respecto a la biomasa ( $g.L^{-1}$ ) de la microalga *Chlorella* sp. se muestran en la tabla 3.7, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $1,51 g.L^{-1}$  en el medio Agua de Vertiente Complementado a 10000 lux y el menor de  $0,31 g.L^{-1}$  en Agua de Vertiente a 2000 lux.

Tabla 3.7.- Biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux															
I	0,84	0,92	1,06	0,3	0,39	0,6	0,94	1,42	1,49	0,84	1,13	1,35	0,98	1,32	1,41
II	0,84	0,94	1,04	0,33	0,41	0,5	0,91	1,4	1,51	0,83	1,15	1,37	0,96	1,3	1,39
III	0,83	0,92	1,04	0,3	0,38	0,53	0,92	1,39	1,51	0,8	1,18	1,35	0,94	1,33	1,43
<b>Sumatoria</b>	2,51	2,78	3,14	0,93	1,18	1,63	2,77	2,79	3,02	2,47	3,46	4,07	2,88	3,95	4,23
<b>Promedio</b>	0,84	0,93	1,05	0,31	0,39	0,54	0,92	1,40	1,51	0,82	1,15	1,36	0,96	1,32	1,41

En la figura 3.7 se observa que a 10000 lux los valores de biomasa fueron mayores en todos los cultivos, al igual que fueron menores a 2000 lux.

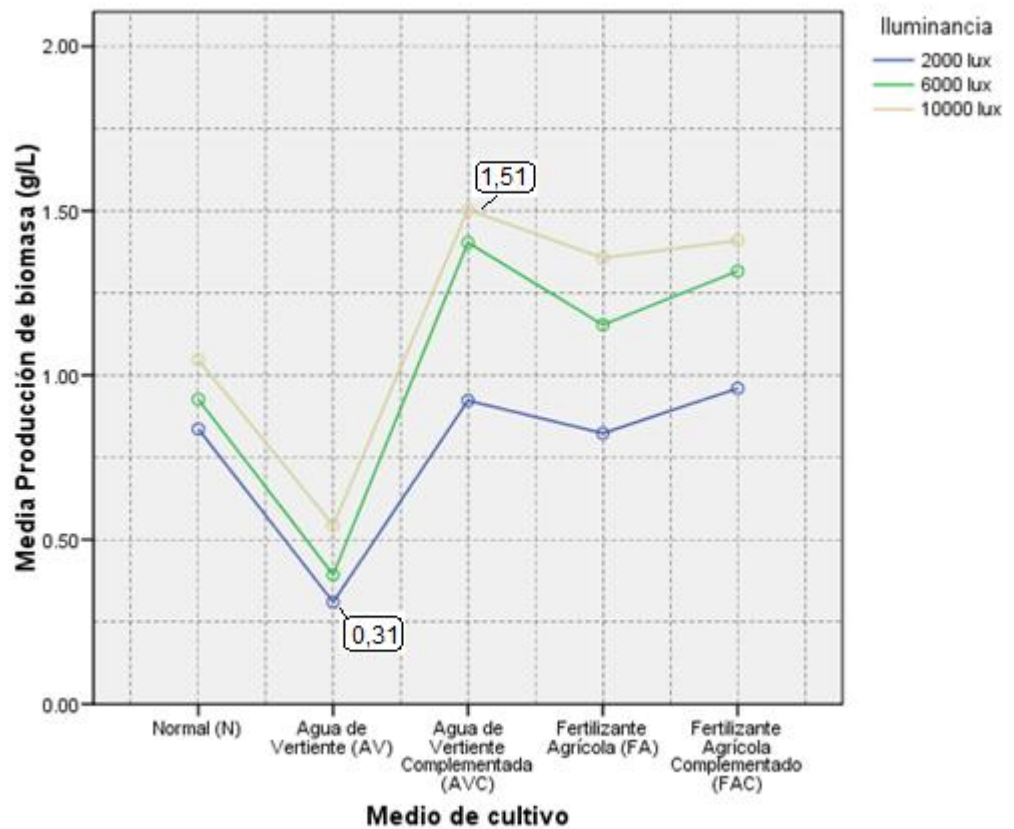


Figura 3.7.- Biomasa promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. (tabla 3.8) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0

$H_a$ : efecto del medio de cultivo  $\neq$ 0

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la tabla 3.8 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de biomasa de *Chlorella* sp.

Tabla 3.8 Análisis de Varianza con respecto a la biomasa (g.L<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	4,380	4	1,095	2607,177	0,000
Iluminancia	1,253	2	0,627	1492,085	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,247	8	0,031	73,526	0,000
Error	0,013	30	0,000		
Total	50,335	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.9 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.



Tabla 3.9.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la biomasa (g.L<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T10 (FA.2000)	0,01333	0,01673	0,432	-0,0208	0,0475
T2 (N.6000)	T7 (AVC.2000)	0,00333	0,01673	0,843	-0,0308	0,0375
	T13 (FAC.2000)	-0,03333	0,01673	0,056	-0,0675	0,0008
T7 (AVC.2000)	T2 (N.6000)	-0,00333	0,01673	0,843	-0,0375	0,0308
T8 (AVC.6000)	T15 (FA.10000)	-0,00667	0,01673	0,693	-0,0408	0,0275
T13 (FAC.2000)	T2 (N.6000)	0,03333	0,01673	0,056	-0,0008	0,0675

Como se observa en la tabla 3.9 y en la figura 3.8, los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T1(N.2000) = T10(FA.2000), T12(FA.10000), T2(N.6000) = T7 (AVC.2000) = T13 (FAC.2000) , T7 (AVC.2000) = T2(N.6000), T8(AVC.6000) = T15 (FA.10000), T13 (FAC.2000) = T2(N.6000).

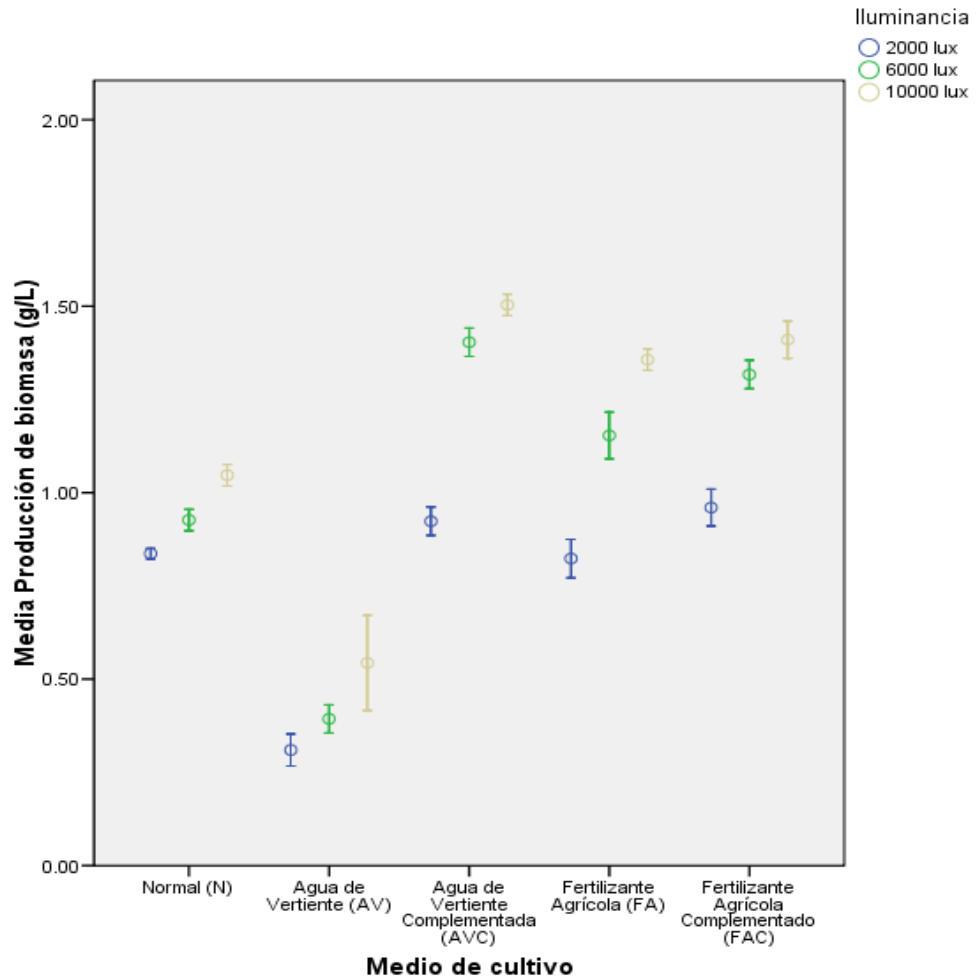


Figura 3.8.- Medias de Biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.1.5 Aceite

Los valores obtenidos con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de la microalga *Chlorella* sp. se muestran en la tabla 3.10, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,162 \text{ g.L}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 10000 lux y el menor de  $0,036 \text{ g.L}^{-1}$  en Agua de Vertiente a 2000 lux.

Tabla 3.10.- Concentración de aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,092	0,103	0,122	0,035	0,044	0,068	0,102	0,145	0,156	0,101	0,137	0,162	0,098	0,133	0,147
II	0,092	0,106	0,121	0,038	0,047	0,055	0,098	0,148	0,163	0,100	0,137	0,165	0,096	0,137	0,150
III	0,091	0,100	0,116	0,035	0,045	0,062	0,099	0,143	0,157	0,096	0,142	0,161	0,094	0,137	0,154
<b>Sumatoria</b>	0,276	0,310	0,359	0,107	0,136	0,185	0,299	0,436	0,477	0,296	0,415	0,487	0,288	0,407	0,451
<b>Promedio</b>	0,092	0,103	0,120	0,036	0,045	0,062	0,100	0,145	0,159	0,099	0,138	0,162	0,096	0,136	0,150
<b>% P/P</b>	11	11,13	11,43	11,5	11,56	11,36	10,8	10,37	10,57	12	12	11,97	10	10,3	10,65

En la figura 3.9 se identifica los valores mayores a 10000 lux en todos los tratamientos, disminuyendo conforme disminuyen los lux.

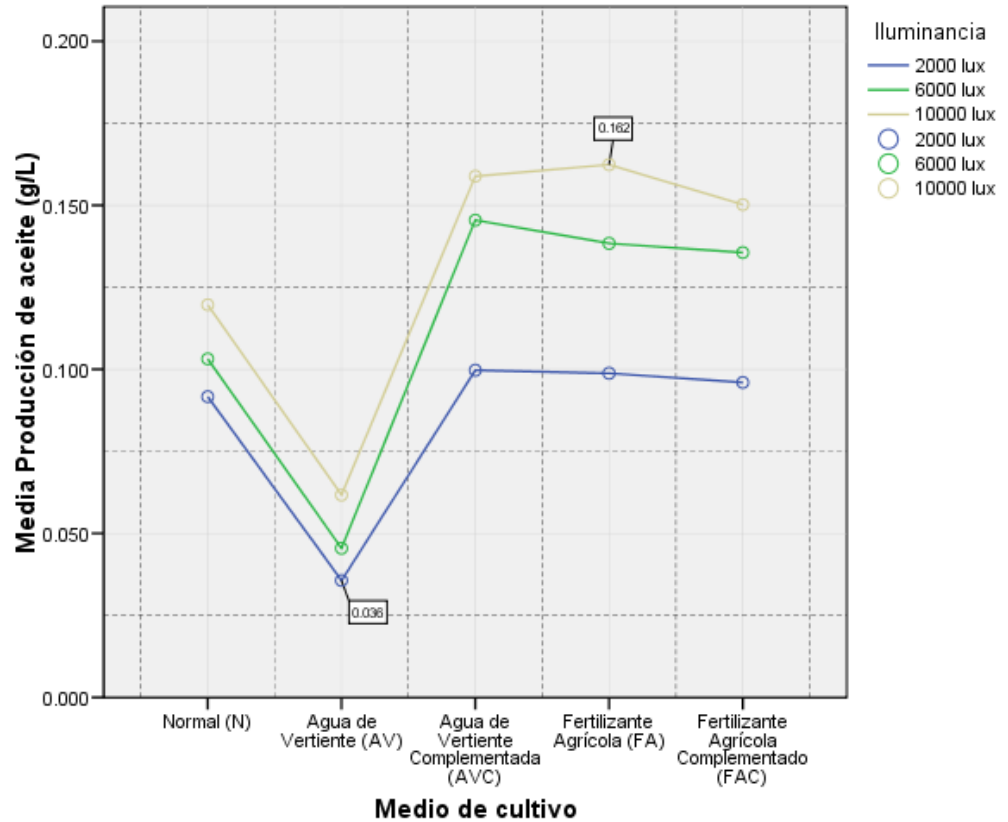


Figura 3.9.- Aceite promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. (tabla 3.11) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0

$H_a$ : efecto del medio de cultivo  $\neq$ 0

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la tabla 3.11 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de aceite de *Chlorella* sp.

Tabla 3.11 Análisis de Varianza con respecto a la concentración de aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,048	4	0,012	1405,549	0,000
Iluminancia	0,016	2	0,008	954,357	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,003	8	0,000	36,657	0,000
Error	0,000	30	8,59E-006		
Total	0,607	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.12 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.12.- Diferencia mínima significativa con respecto a la concentración de aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Chlorella* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T13 (FAC.2000)	-0,004333	0,002437	0,086	-0,00931	0,00064
T2 (N.6000)	T7 (AVC.2000)	0,003333	0,002437	0,182	-0,00164	0,00831
	T10 (FA.2000)	0,004000	0,002437	0,111	-0,00098	0,00898
T7 (AVC.2000)	T2 (N.6000)	-0,003333	0,002437	0,182	-0,00831	0,00164
	T10 (FA.2000)	0,000667	0,002437	0,786	-0,00431	0,00564
	T13 (FAC.2000)	0,003667	0,002437	0,143	-0,00131	0,00864
T9 (AVC.10000)	T12 (FA.10000)	-0,004000	0,002437	0,111	-0,00898	0,00098
T11 (FA.6000)	T14 (FAC.6000)	0,003000	0,002437	0,228	-0,00198	0,00798

En la figura 3.10 se observa que en los medios Fertilizante agrícola, fertilizante agrícola complementado y agua de vertiente complementado presentaron valores similares para cada iluminancia.

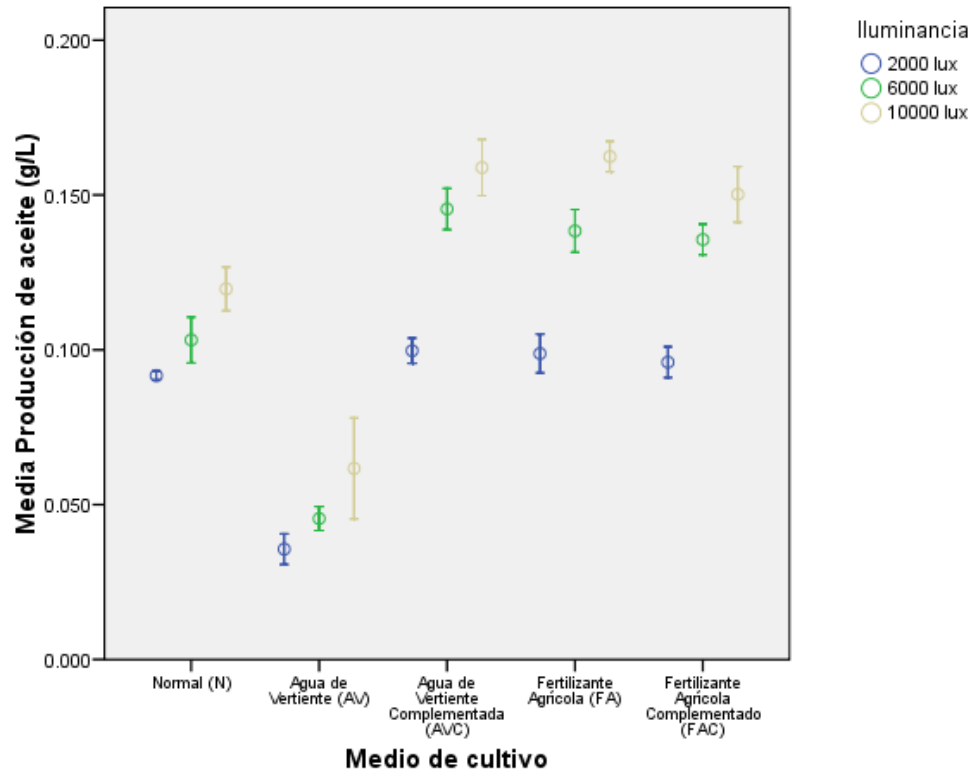


Figura 3.10.- Medias de Producción de Aceite ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de *Chlorella* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.2 *Nannochloropsis* sp.

#### 3.2.1 Aislamiento e identificación

La muestra de agua fue tomada en la Provincia de Esmeraldas, Tonsupa - Playa Almendro (figura 3.11). La muestra fue de agua superficial a una profundidad aproximada de 3 metros, cantidad total de 400 mL. Las coordenadas fueron Latitud  $0^{\circ}53'36.7''$  N y Longitud  $79^{\circ}48'46.59''$  O, con Altitud de 0 msnm.



*Figura 3.11.- Vista panorámica de Playa Almendro*

De acuerdo a las claves de identificación según Hibbert D., 1981 se obtuvieron las siguientes características:

- Célula esférica, flotante libre
- Unicelular sin motilidad
- Hábitat: marino
- Color: verde amarillento
- No forma colonias
- No forma zoosporas
- Forma autosporas
- Diámetro celular: 2- 4  $\mu\text{m}$
- Clasificación:
  - Dominio Eukaryota
  - Reino Chromista
  - Subreino Chromobiota



Filo Heterokontophyta  
Clase Eustigmatophyceae  
Orden Eustigmatales  
Familia Monodopsidaceae  
Género: *Nannochloropsis*

La muestra de agua de mar de la Playa Almendro (Tonsupa) fue distribuida en cinco matraces de 100 mL mantenidos con aireación e iluminación 12:12 hasta observar crecimiento. Una vez observado el crecimiento, los cultivos fueron inoculados en 500 mL de medio líquido F/2 en agua dulce a fin de seleccionar las microalgas del género *Nannochloropsis*. Una vez identificado el crecimiento se procedió a observar microscópicamente las muestras, seleccionándose los cultivos en que se observó al género *Nannochloropsis*. Los cultivos seleccionados fueron inoculados en medio nuevo F/2 líquido en agua dulce obteniéndose cultivos unialgales de *Nannochloropsis* sp. (figura 3.12).

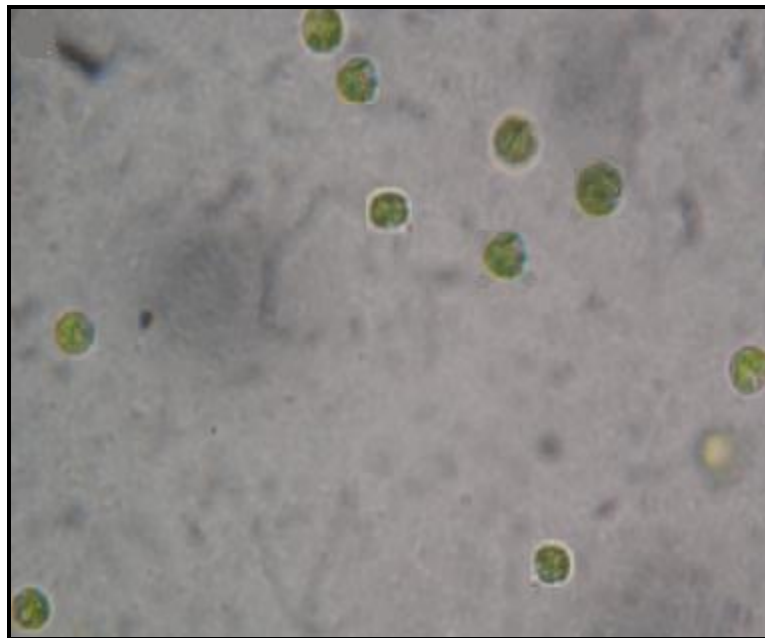
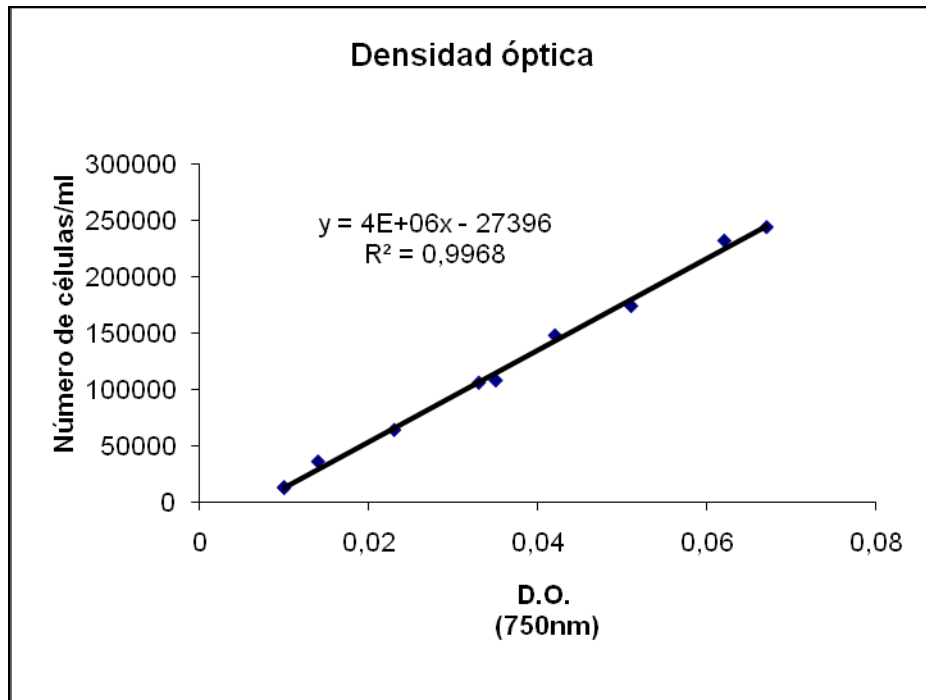


Figura 3.12.- Vista al microscopio (100x) de *Nannochloropsis* sp. aislada de Playa el Almendro, Tonsupa (Provincia de Esmeraldas)

### 3.2.2 Densidad celular máxima

Se determinó la curva de calibración de Absorbancia a 750 nm versus el número de células por mililitro (*figura 3.13*) obteniéndose una regresión lineal con un  $R^2$  de 0,99.



*Figura 3.13.-* Relación entre densidad celular de *Nannochloropsis* sp. y absorbancia a 750 nm.

Los valores obtenidos con respecto a la densidad celular máxima ( $\text{cel.mL}^{-1}$ ) de la microalga *Nannochloropsis* sp. se muestran en la tabla 3.13, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $4,5 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 10000 lux y el menor de  $1,5 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  en Agua de vertiente a 2000 lux.

Tabla 3.13.- Densidades celulares máximas (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	2192604	2836604	3076604	1496604	1360604	1480604	3528604	4116604	4292604	3868604	4276604	4504604	3372604	4148604	4308604
II	2212604	2832604	3080604	1492604	1352604	1472604	3372604	4108604	4296604	3856604	4276604	4500604	3252604	4140604	4312604
III	2132604	2834604	3072604	1488604	1364604	1484604	3292604	4120604	4304604	3880604	4268604	4508604	3292604	4144604	4304604
<b>Sumatoria</b>	6537812	8503812	9229812	4477812	4077812	4437812	10193812	12345812	12893812	11605812	12821812	13513812	9917812	12433812	1292581 2
<b>Promedio</b>	2179271	2834604	3076604	1492604	1359271	1479271	3397937	4115271	4297937	3868604	4273937	4504604	3305937	4144604	4308604

En la figura 3.14 se observa que los valores más altos son a 10000 lux en todos los medios de cultivo con excepción del medio agua de vertiente en el cual el mayor valor fue a 2000 lux.

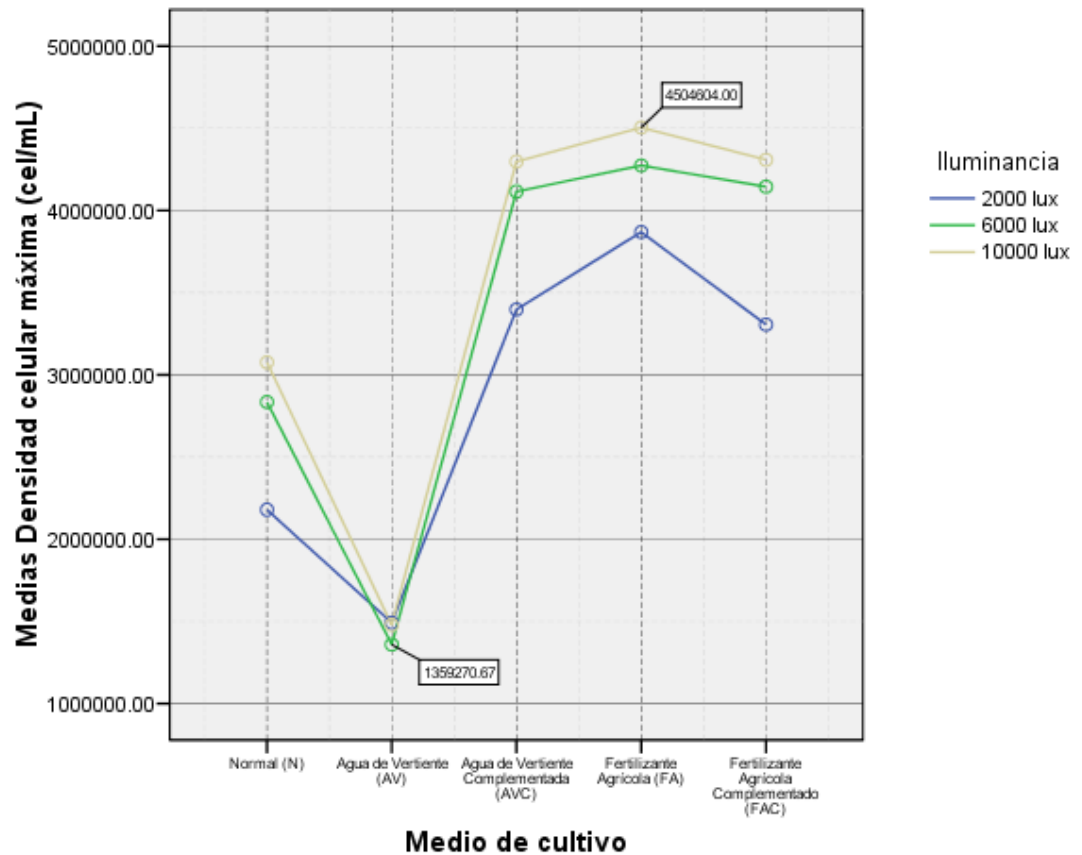


Figura 3.14.- Densidades celulares máximas promedio de *Nannochloropsis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la densidad celular máxima de *Nannochloropsis* sp. (tabla 3.14) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia≠0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.14 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la densidad celular máxima de *Nannochloropsis* sp.

Tabla 3.14 Análisis de Varianza con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Iluminancia	3752787733333,328	2	1876393866666,664	1388,504	0,000
Medio de cultivo	4879397155555,500	4	1219849288888,890	9026,708	0,000
Iluminancia * Medio de cultivo	128833137777,779	8	16104142222,223	119,168	0,000
Total	527027263536720,000	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.15 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos. Como se observa, los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T4 (AV.2000) = T6 (AV.10000), T8(AVC.6000) = T14(FAC.6000), y T9 (AVC.10000) = T11(FA.6000) = T15(FAC.10000).

Tabla 3.15.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T4 (AV.2000)	T6 (AV.10000)	13.333,33333	30.015,30474	0,660	-47.966,0968	74.632,7635
T8 (AVC.6000)	T14 (FAC.6000)	-29.333,33333	30.015,30474	0,336	-90.632,7635	31.966,0968
T9 (AVC.10000)	T11 (FA.6000)	24.000,00000	30.015,30474	0,430	-37.299,4301	85.299,4301
	T15 (FAC.10000)	-10.666,66667	30.015,30474	0,725	-71.966,0968	50.632,7635

### 3.2.3 Tasa de crecimiento

Los valores obtenidos con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de la microalga *Nannochloropsis* sp. se muestran en la tabla 3.16, en la cual se observa que el valor más alto fue de 0,32 d<sup>-1</sup> en el medio Fertilizante Agrícola y Fertilizante Agrícola Complementado a 10000 lux y el menor de 0,19 d<sup>-1</sup> en medio Normal a 2000 lux.

Tabla 3.16.- tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux															
I	0,20	0,27	0,28	0,24	0,25	0,27	0,24	0,28	0,29	0,25	0,29	0,32	0,26	0,28	0,31
II	0,20	0,27	0,28	0,24	0,25	0,27	0,24	0,28	0,29	0,25	0,28	0,32	0,26	0,29	0,32
III	0,17	0,24	0,25	0,23	0,25	0,27	0,23	0,28	0,29	0,25	0,29	0,32	0,26	0,28	0,31
<b>Sumatoria</b>	0,57	0,77	0,81	0,71	0,75	0,80	0,71	0,84	0,86	0,76	0,86	0,95	0,77	0,85	0,95
<b>Promedio</b>	0,19	0,26	0,27	0,24	0,25	0,27	0,24	0,28	0,29	0,25	0,29	0,32	0,26	0,28	0,32

En la figura 3.15 se observa que los valores a 10000 lux fueron los más altos en todos los medios de cultivo, seguidos de los valores a 6000 lux y por último a 2000 lux.

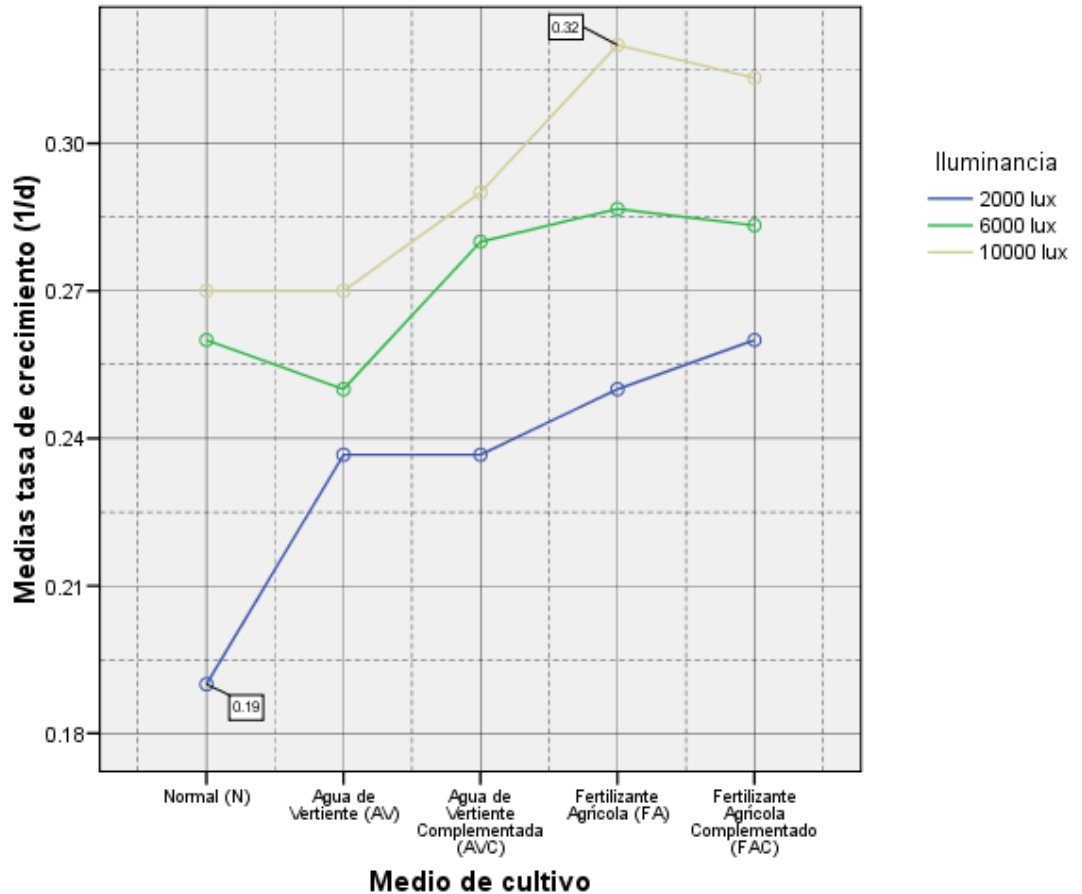


Figura 3.15.- Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) promedio de *Nannochloropsis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. (tabla 3.17) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia $\neq$ 0



Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.17 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la tasa de crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

Tabla 3.17 Análisis de Varianza con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,015	4	0,004	51,828	0,000
Iluminancia	0,026	2	0,013	182,281	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,004	8	0,000	6,383	0,000
Total	3,241	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.18 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos. Como se observa en la tabla 3.18 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

*Tabla 3.18.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. en los tratamientos evaluados.*

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T2 (N.6000)	T3(N.10000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T5 (AV.6000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T6 (AV.10000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T10 (FA.2000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T13 (FAC.2000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
T3(N.10000)	T2 (N.6000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T6 (AV.10000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T8 (AVC.6000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T13 (FAC.2000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T14 (FAC.6000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
	T7 (AVC.2000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T10 (FA.2000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
T5 (AV.6000)	T2 (N.6000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T4 (AV.2000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739
	T7 (AVC.2000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739

	T10 (FA.2000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T13 (FAC.2000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
T6 (AV.10000)	T2 (N.6000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T3(N.10000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T8 (AVC.6000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T13 (FAC.2000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T14 (FAC.6000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
T7 (AVC.2000)	T4 (AV.2000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T5 (AV.6000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
	T10 (FA.2000)	-0,013333	0,006885	0,062	-0,02739	0,00073
T8 (AVC.6000)	T3(N.10000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T6 (AV.10000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T9 (AVC.10000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T11 (FA.6000)	-0,006667	0,006885	0,341	-0,02073	0,00739
	T14 (FAC.6000)	-0,003333	0,006885	0,632	-0,01739	0,01073
T9 (AVC.10000)	T8 (AVC.6000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T11 (FA.6000)	0,003333	0,006885	0,632	-0,01073	0,01739
	T14 (FAC.6000)	0,006667	0,006885	0,341	-0,00739	0,02073
T10 (FA.2000)	T2 (N.6000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T4 (AV.2000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739
	T5 (AV.6000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T7 (AVC.2000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739
	T13 (FAC.2000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
T13 (FAC.2000)	T2 (N.6000)	0,000000	0,006885	1,000	-0,01406	0,01406
	T3(N.10000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406
	T5 (AV.6000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
	T6 (AV.10000)	-0,010000	0,006885	0,157	-0,02406	0,00406

	T10 (FA.2000)	0,010000	0,006885	0,157	-0,00406	0,02406
T14 (FAC.6000)	T3(N.10000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739
	T6 (AV.10000)	0,013333	0,006885	0,062	-0,00073	0,02739
	T8 (AVC.6000)	0,003333	0,006885	0,632	-0,01073	0,01739
	T9 (AVC.10000)	-0,006667	0,006885	0,341	-0,02073	0,00739
	T11 (FA.6000)	-0,003333	0,006885	0,632	-0,01739	0,01073
T15 (FAC.10000)	T12 (FA.10000)	-0,006667	0,006885	0,341	-0,02073	0,00739

En la figura 3.16 se observa que hay gran cantidad de tratamientos similares estadísticamente los cuales se intercalan en los intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

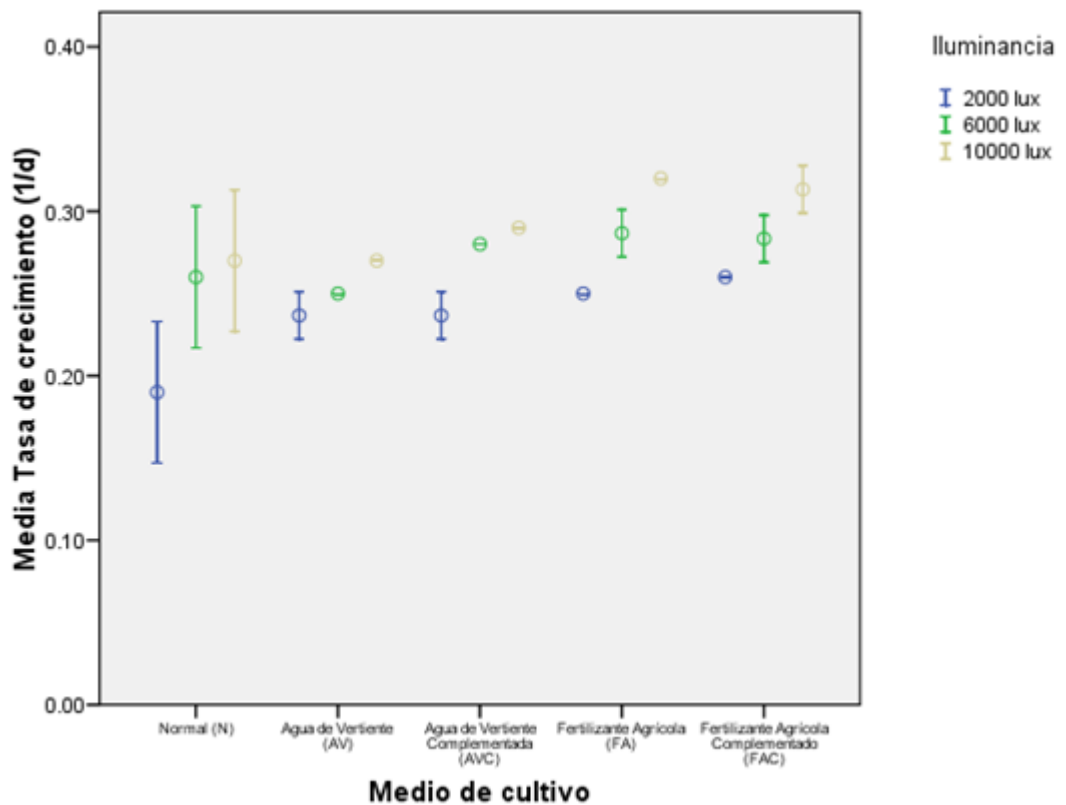


Figura 3.16.- Medias de Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.2.4 Biomasa

Los valores obtenidos con respecto a la biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de la microalga *Nannochloropsis* sp. se muestran en la tabla 3.19, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $1,10 \text{ g.L}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 10000 lux y el menor de  $0,22 \text{ g.L}^{-1}$  en Agua de Vertiente a 6000 lux.

Tabla 3.19.- Biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,32	0,41	0,45	0,24	0,22	0,24	0,75	0,87	0,91	0,86	0,95	1,09	0,72	0,77	0,98
II	0,34	0,40	0,45	0,24	0,23	0,24	0,73	0,85	0,92	0,85	0,96	1,12	0,70	0,75	0,96
III	0,32	0,39	0,44	0,22	0,22	0,24	0,72	0,86	0,93	0,85	0,95	1,10	0,71	0,75	0,98
<b>Sumatoria</b>	0,98	1,20	1,34	0,70	0,67	0,72	2,20	2,58	2,77	2,56	2,86	3,31	2,13	2,27	2,92
<b>Promedio</b>	0,33	0,40	0,45	0,23	0,22	0,24	0,73	0,86	0,92	0,85	0,95	1,10	0,71	0,76	0,97

La figura 3.17 muestra que los valores más altos fueron a 10000 lux en todos los medios de cultivo, seguidos de los a 6000 lux con excepción del medio agua de vertiente, en el que el valor a 6000 lux fue el menor.

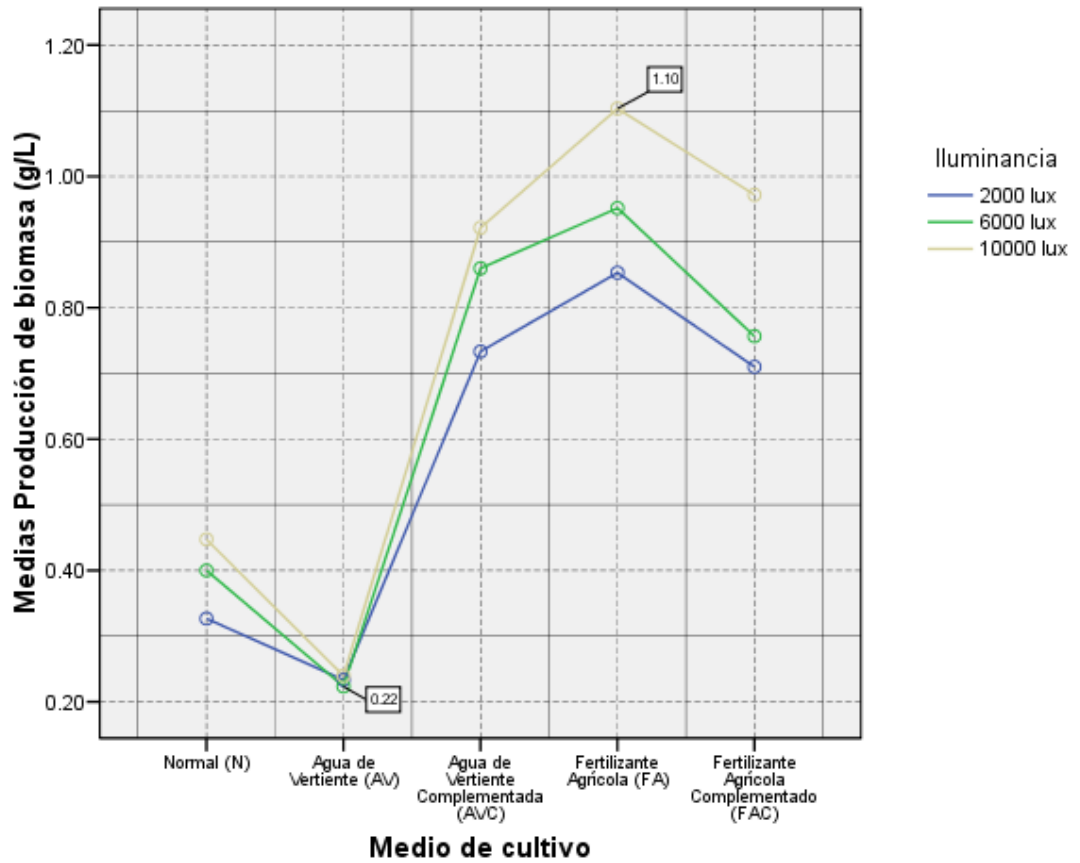


Figura 3.17.- Biomasa promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. (tabla 3.20) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.20 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de biomasa de *Nannochloropsis* sp.

Tabla 3.20 Análisis de Varianza con respecto a la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	3,650	4	0,913	8692,157	0,000
Iluminancia	0,208	2	0,104	989,430	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,082	8	0,010	98,213	0,000
Total	22,887	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.21 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos. Como se



observa en la tabla 3.21 los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T4 (AV.2000) = T5 (AV.6000) = T6 (AV.10000), y T8(AVC.6000) = T10(FA.2000).

*Tabla 3.21.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la biomasa (g.L<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp. en los tratamientos evaluados.*

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	0,01000	0,00826	0,235	-0,0069	0,0269
	T6 (AV.10000)	-0,00667	0,00826	0,426	-0,0235	0,0102
T8 (AVC.6000)	T10 (FA.2000)	0,00667	0,00826	0,426	-0,0102	0,0235

La figura 3.18 se observa que el valor a 10000 lux en medio fertilizante agrícola es el que presenta mayor diferencia en relación al resto de datos.

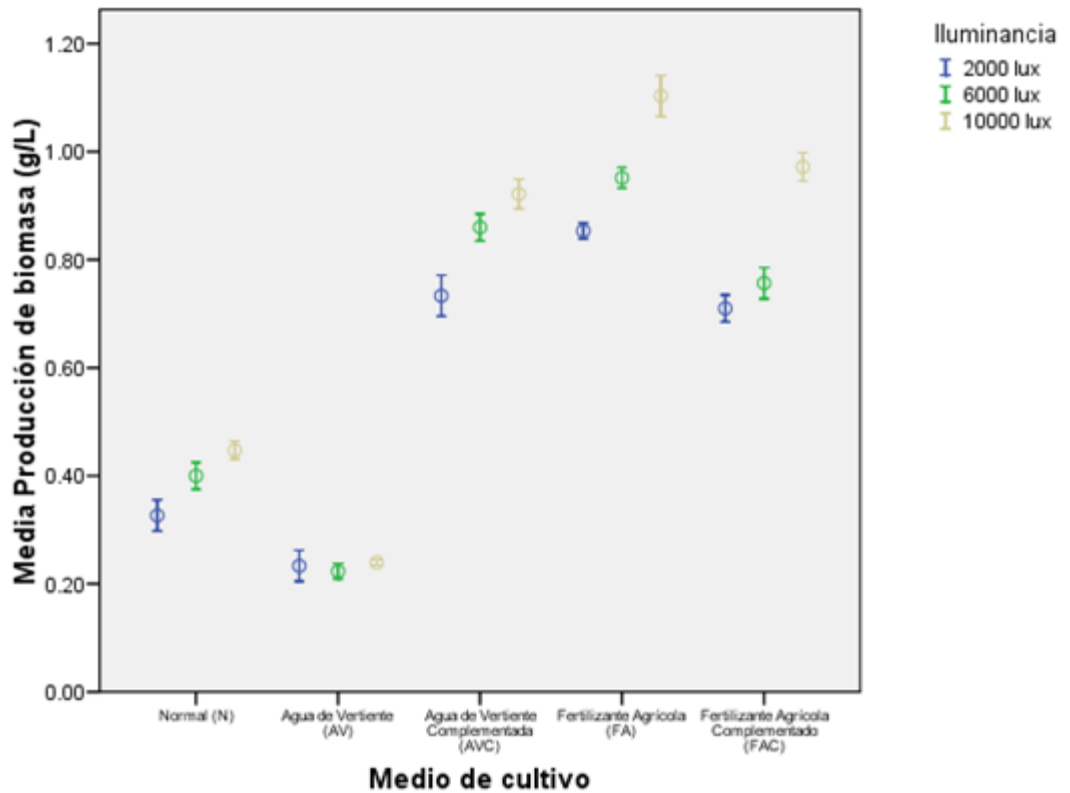


Figura 3.18.- Medias de Producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.2.5 Aceite

Los valores obtenidos con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de la microalga *Nannochloropsis* sp. se muestran en la tabla 3.22, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,187 \text{ g.L}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a  $10000 \text{ lux}$  y el menor de  $0,018 \text{ g.L}^{-1}$  en Agua de Vertiente a  $2000$  y  $6000 \text{ lux}$ .

Tabla 3.22.- Concentración de aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux															
I	0,032	0,048	0,056	0,019	0,018	0,023	0,098	0,122	0,140	0,120	0,142	0,184	0,096	0,105	0,156
II	0,031	0,044	0,057	0,017	0,017	0,023	0,096	0,120	0,141	0,117	0,144	0,190	0,094	0,102	0,153
III	0,029	0,044	0,055	0,017	0,018	0,022	0,094	0,121	0,142	0,120	0,142	0,187	0,095	0,102	0,155
<b>Sumatoria</b>	0,091	0,136	0,168	0,053	0,053	0,068	0,288	0,363	0,423	0,357	0,427	0,560	0,286	0,309	0,464
<b>Promedio</b>	0,030	0,045	0,056	0,018	0,018	0,023	0,096	0,121	0,141	0,119	0,142	0,187	0,095	0,103	0,155
<b>% P/P</b>	9,3 3	11,3	12,5	7,60	8,2	9,53	13,10	14,1	15,3	13,93	14,95	16,92	13,44	13,55	15,91

La figura 3.19 muestra los valores más altos a 10000 lux en todos los medios de cultivo, además se observa una similitud en los resultados obtenidos en el medio agua de vertiente a 2000 y 6000 lux.

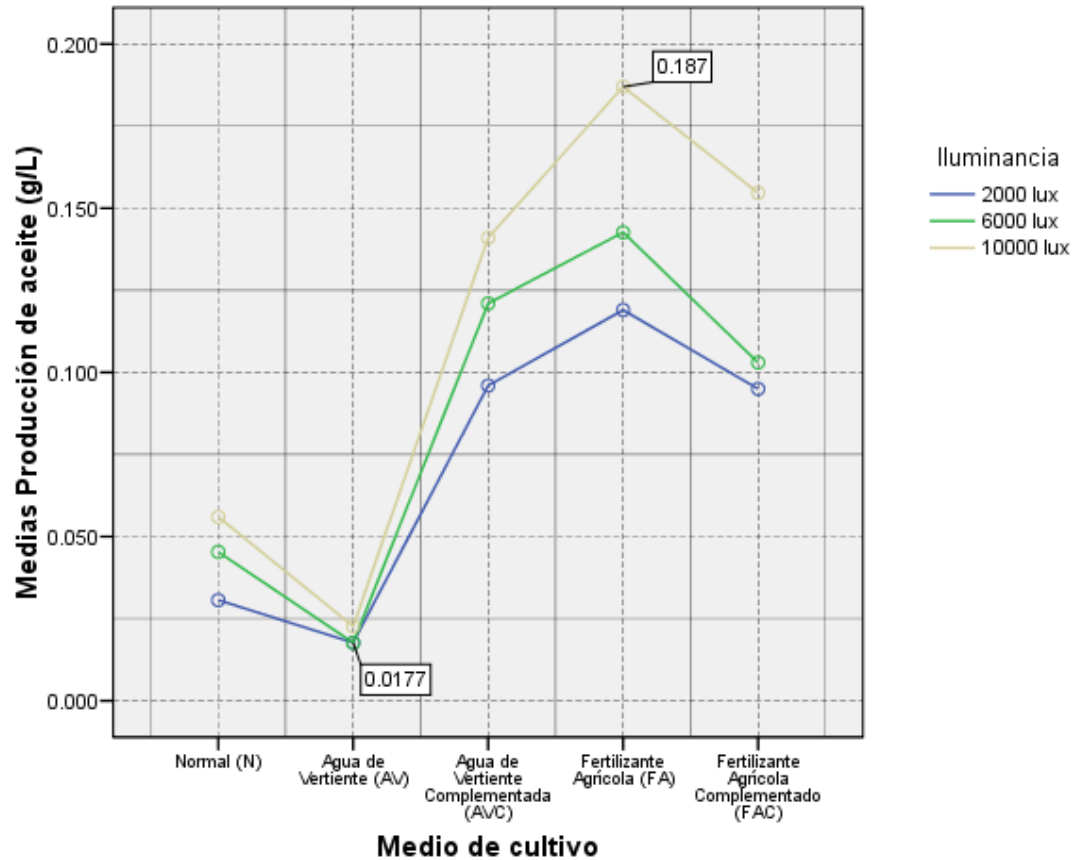


Figura 3.19.- Aceite promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. (tabla 3.23) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.23 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de aceite de *Nannochloropsis* sp.

Tabla 3.23 Análisis de Varianza con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,110	4	0,028	11403,523	0,000
Iluminancia	0,013	2	0,006	2627,073	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,005	8	0,001	247,039	0,000
Total	0,492	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.24 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis

nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos. Como se observa en la tabla 3.24 los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T4 (AV.2000) = T5 (AV.6000), T7 (AVC.2000) = T13 (FAC.2000), T8(AVC.6000) = T10(FA.2000), y T9 (AVC.10000) = T11 (FA.6000).

Tabla 3.24.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la concentración de aceite ( $g.L^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	0,000000	0,001271	1,000	-0,00260	0,00260
T7 (AVC.2000)	T13 (FAC.2000)	0,001000	0,001271	0,437	-0,00160	0,00360
T8 (AVC.6000)	T10 (FA.2000)	0,002000	0,001271	0,126	-0,00060	0,00460
T9 (AVC.10000)	T11 (FA.6000)	-0,001667	0,001271	0,200	-0,00426	0,00093

En la figura 3.20 se observa que tanto a 6000 como a 10000 lux en el medio fertilizante agrícola se obtuvo los valores más diferentes al resto de datos.

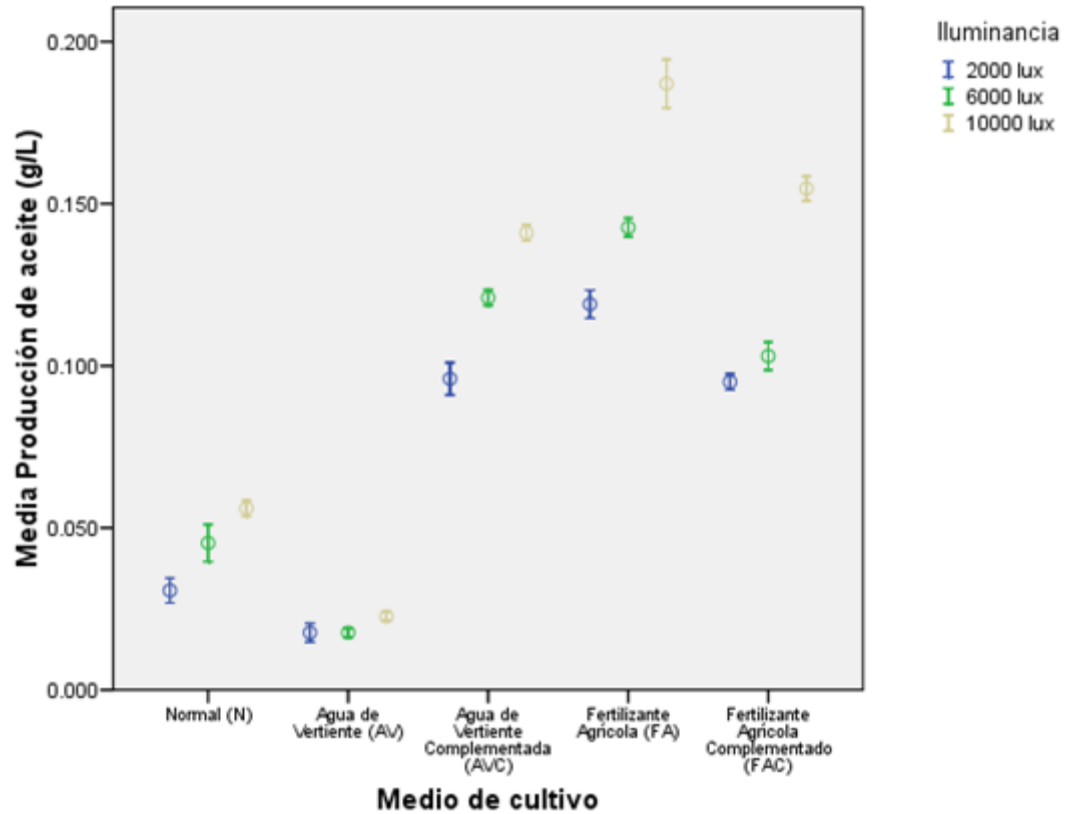


Figura 3.20.- Medias de Producción de Aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.3 *Synechocystis* sp.

#### 3.3.1 Aislamiento e identificación

La muestra de agua fue tomada en la Provincia de Imbabura, Ibarra-Laguna de Yahuarcocha (figura 3.21), zona de orilla con poca profundidad (entre 25-35 cm) con vegetación de mediana altura, poca turbulencia del agua, mayoritariamente estancada, cuyas coordenadas fueron Latitud  $0^{\circ}22'36.24''$  N y Longitud  $78^{\circ}05'58.66''$  O, con Altitud de 2192 msnm.



*Figura 3.21.- Vista directa del sitio de toma de muestra en la Laguna de Yaguarcocha, Provincia de Imbabura.*

Según las claves de identificación según Komárek & Anagnostidis y Bergey, se obtuvo lo siguiente:

- Célula solitaria, esférica o ligeramente ovalada. Dos juntas por corto tiempo
- No forma colonias
- Sin mucílago o indistinguible
- Color verde azulado
- Contenido celular homogéneo
- División celular: fisión binaria (principalmente por estrangulamiento) produciendo células hijas exactamente iguales
- Movimiento rotatorio
- Diámetro celular: 2-6  $\mu\text{m}$  . (Bergey ). 0.7- 15  $\mu\text{m}$  (*Wheeler J. & Sheath R., 2003*)
- Hábitat: agua dulce poco profunda



- Clasificación.-

Dominio: Procaryota

Reino: Bacteria

Subreino: Negibacteria

Filo: Cianobacterias

Clase: Cyanophyceae

Subclase: Synechococcophycideae

Orden: Synechococcales (ó Chroococcales)

Familia: Merismopediaceae

Subfamilia: Merismopedioideae

Género: *Synechocystis*

El crecimiento en medio BG-11 sólido permitió seleccionar colonias separadas de *Synechocystis* sp., las cuales fueron inoculadas en medio nuevo de BG-11 sólido obteniéndose un cultivo unialgal de *Synechocystis* sp. (*figura 3.22*).

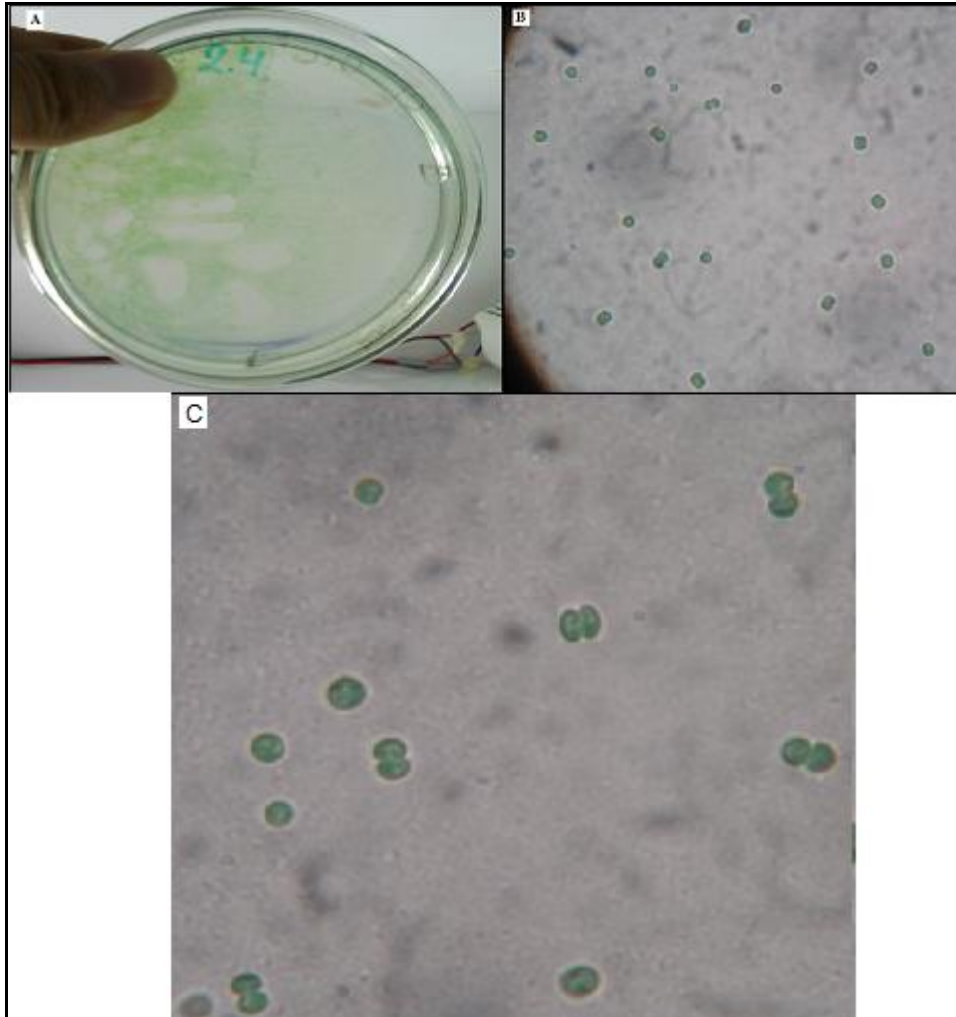
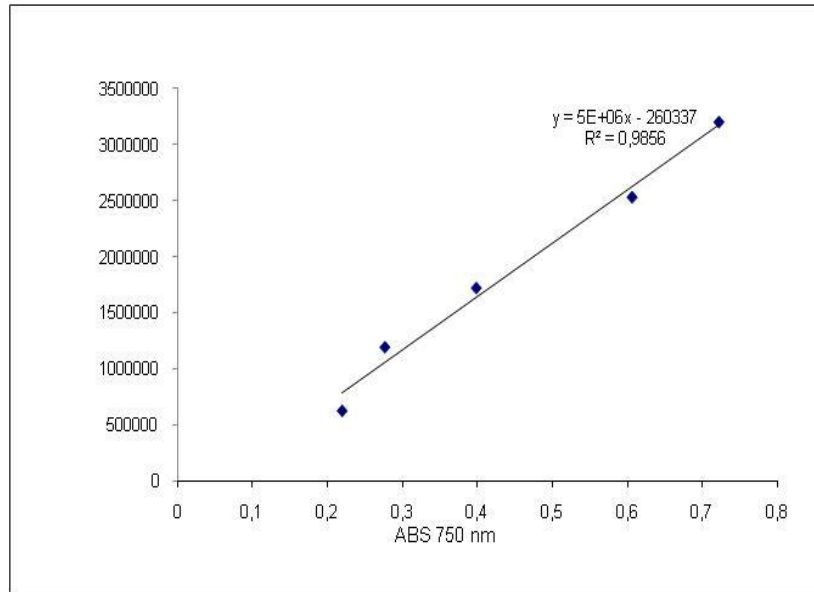


Figura 3.22.- **A**-Medio BG11 sólido con *Synechocystis* sp. aislada totalmente . **B** y **C**-*Synechocystis* sp. aislada totalmente (100x)

### 3.3.2 Densidad celular máxima

Se obtuvo la curva de calibración obtenida de Absorbancia a 750 nm versus el número de células por mililitro (*figura 3.23*) que describe una regresión lineal con  $R^2$  de 0,985.



**Figura 3.23.-** Relación entre densidad celular de *Synechocystis* sp. y absorbancia a 750 nm.

Los valores obtenidos con respecto a la densidad celular máxima ( $\text{cel.mL}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. se muestran en la tabla 3.25, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $5,42 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 6000 lux y el menor de  $3,23 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  en Agua de vertiente a 10000 lux.

Tabla 3.25.- Densidades celulares máximas (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Synechocystis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	4789663	5284663	4484663	3349663	3649663	3234663	3834663	5349663	3684663	4484663	5424663	4339663	3489663	5114663	3314663
II	4749663	5239663	4474663	3334663	3654663	3229663	3849663	3849663	3674663	4494663	5419663	4334663	3289663	5099663	3304663
III	4889663	5279663	4469663	3339663	3664663	3244663	3824663	3824663	3684663	4504663	5429663	4329663	3409663	5104663	3309663
<b>Sumatoria</b>	14428989	15803989	13428989	10023989	10968989	9708989	11508989	13023989	11043989	13483989	16273989	13003989	10188989	15318989	9928989
<b>Promedio</b>	4809663	5267996	4476330	3341330	3656330	3236330	3836330	4341330	3681330	4494663	5424663	4334663	3396330	5106330	3309663

La figura 3.24 muestra que los valores más altos en todos los medios de cultivo fueron a 6000 lux, mientras que los menores fueron a 10000 lux.

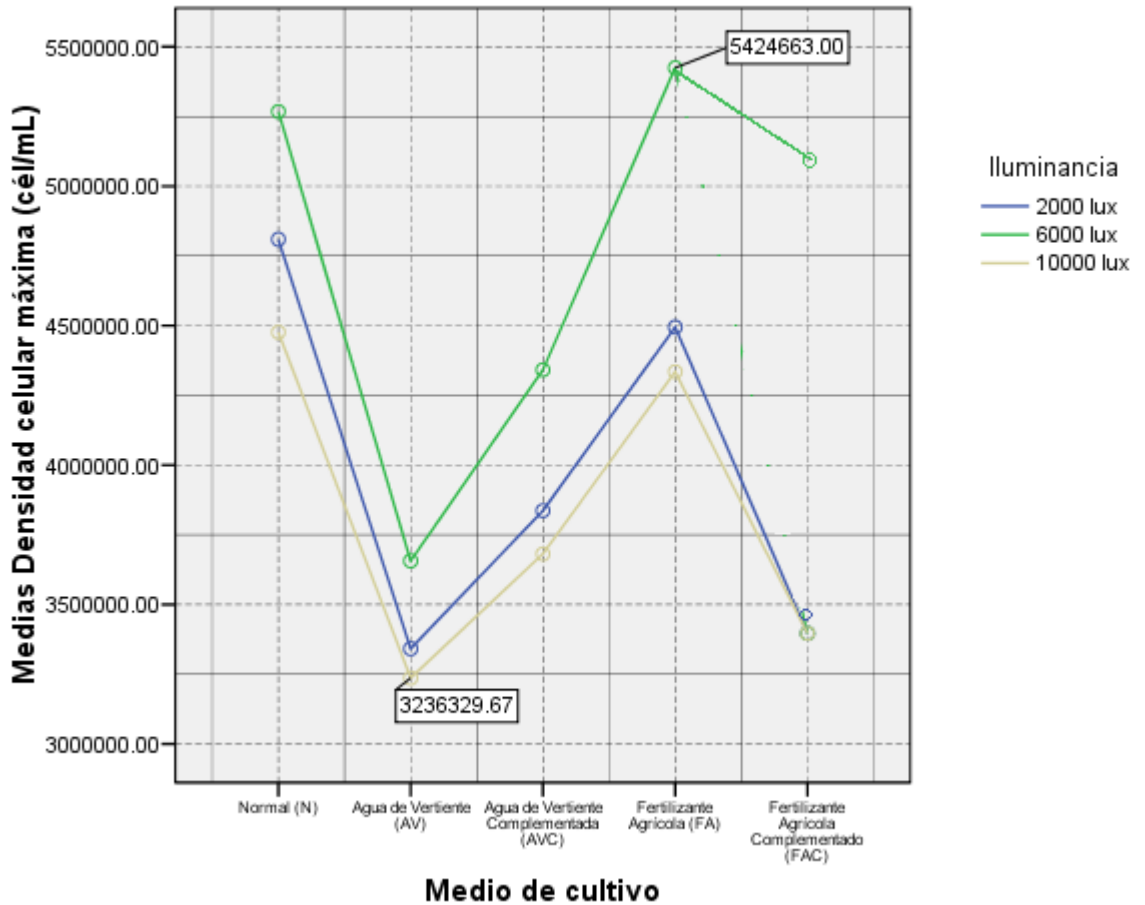


Figura 3.24.- Densidades celulares máximas promedio de *Synechocystis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la densidad celular máxima de *Synechocystis* sp. (tabla 3.26) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia≠0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.26 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la densidad celular máxima de *Synechocystis* sp.

Tabla 3.26 Análisis de Varianza con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Synechocystis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Iluminancia	2843143333 333,326	2	14215716666 66,663	26,671	0,000
Medio de cultivo	1778416999 9999,990	4	44460424999 99,998	83,416	0,000
Iluminancia * Medio de cultivo	1184673333 333,345	8	14808416666 6,669	2,778	0,020
Total	7698072460 20605,000	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.27 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.27.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Synechocystis* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T3(N.10000)	333.333,33333	188.501,89114	0,087	-51.638,8869	718.305,5536
	T10 (FA.2000)	315.000,00000	188.501,89114	0,105	-69.972,2202	699.972,2202
T2 (N.6000)	T11 (FA.6000)	-156.666,66667	188.501,89114	0,412	-541.638,8869	228.305,5536
T3(N.10000)	T1 (N.2000)	-333.333,33333	188.501,89114	0,087	-718.305,5536	51.638,8869
	T8 (AVC.6000)	135.000,00000	188.501,89114	0,479	-249.972,2202	519.972,2202
	T10 (FA.2000)	-18.333,33333	188.501,89114	0,923	-403.305,5536	366.638,8869
	T12 (FA.10000)	141.666,66667	188.501,89114	0,458	-243.305,5536	526.638,8869
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	-315.000,00000	188.501,89114	0,105	-699.972,2202	69.972,2202
	T6 (AV.10000)	105.000,00000	188.501,89114	0,582	-279.972,2202	489.972,2202
	T13 (FAC.2000)	-55.000,00000	188.501,89114	0,772	-439.972,2202	329.972,2202
	T14 (FAC.6000)	-55.000,00000	188.501,89114	0,772	-439.972,2202	329.972,2202
	T15 (FAC.10000)	-55.000,00000	188.501,89114	0,772	-439.972,2202	329.972,2202
T7 (AVC.2000)	T5 (AV.6000)	180.000,00000	188.501,89114	0,347	-204.972,2202	564.972,2202

	T9 (AVC.10000)	155.000,00000	188.501,89114	0,417	-229.972,2202	539.972,2202
T13 (FAC.2000)	T4 (AV.2000)	55.000,00000	188.501,89114	0,772	-329.972,2202	439.972,2202
	T5 (AV.6000)	-260.000,00000	188.501,89114	0,178	-644.972,2202	124.972,2202
	T6 (AV.10000)	160.000,00000	188.501,89114	0,403	-224.972,2202	544.972,2202
	T9 (AVC.10000)	-285.000,00000	188.501,89114	0,141	-669.972,2202	99.972,2202
	T15 (FAC.10000)	0,00000	188.501,89114	1,000	-384.972,2202	384.972,2202

### 3.3.3 Tasa de crecimiento

Los valores obtenidos con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. se muestran en la tabla 3.28, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,33 d^{-1}$  en el medio Agua de Vertiente a 2000 lux y el menor de  $0,16 d^{-1}$  en el medio Normal y Fertilizante agrícola a 10000 lux.



Tabla 3.28.- tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de *Synechocystis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,19	0,20	0,16	0,34	0,31	0,28	0,18	0,21	0,16	0,17	0,19	0,16	0,19	0,20	0,17
II	0,19	0,20	0,16	0,33	0,30	0,28	0,18	0,21	0,16	0,17	0,19	0,16	0,18	0,20	0,17
III	0,21	0,20	0,16	0,33	0,31	0,28	0,18	0,21	0,18	0,17	0,19	0,16	0,19	0,20	0,17
<b>Sumatoria</b>	0,60	0,61	0,48	1,00	0,92	0,84	0,55	0,62	0,51	0,52	0,58	0,47	0,56	0,61	0,51
<b>Promedio</b>	0,20	0,20	0,16	0,33	0,31	0,28	0,18	0,21	0,17	0,17	0,19	0,16	0,19	0,20	0,17

En la figura 3.25 se observa que la tasa de crecimiento fue mayor en el medio Agua de Vertiente a 2000 lux, siendo siempre menor en todos los medios de cultivo a 10000 lux.

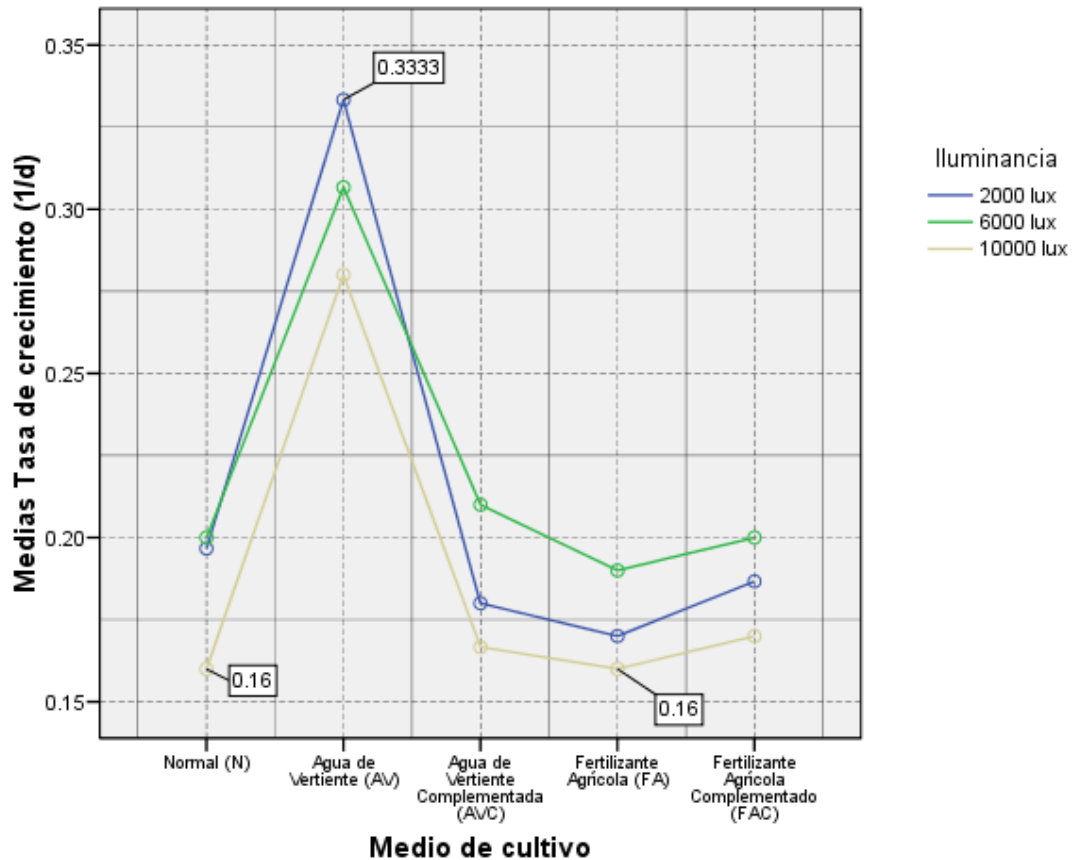


Figura 3.25.- Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) promedio de *Synechocystis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. (tabla 3.29) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia $\neq$ 0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.29 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la tasa de crecimiento de *Synechocystis* sp.

Tabla 3.29 Análisis de Varianza con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de *Synechocystis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,112	4	0,028	1145,591	0,000
Iluminancia	0,009	2	0,005	193,909	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,003	8	0,000	17,659	0,000
Error	0,001	30	2,44E-005		
Total	2,060	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.30 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado

de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos. Como se observa en la tabla 3.30 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

**Tabla 3.30.-** Diferencia Mínima Significativa con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu, d^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T2 (N.6000)	-0,00333	0,00943	0,726	-0,0226	0,0159
	T7 (AVC.2000)	0,01667	0,00943	0,087	-0,0026	0,0359
	T8 (AVC.6000)	-0,01333	0,00943	0,168	-0,0326	0,0059
	T11 (FA.6000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
	T13 (FAC.2000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
T2 (N.6000)	T1 (N.2000)	0,00333	0,00943	0,726	-0,0159	0,0226
	T8 (AVC.6000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T11 (FA.6000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T13 (FAC.2000)	0,01333	0,00943	0,168	-0,0059	0,0326
T3(N.10000)	T9 (AVC.10000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126
	T10 (FA.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T12 (FA.10000)	0,00000	0,00943	1,000	-0,0193	0,0193
	T15 (FAC.10000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
T7 (AVC.2000)	T1 (N.2000)	-0,01667	0,00943	0,087	-0,0359	0,0026
	T9 (AVC.10000)	0,01333	0,00943	0,168	-0,0059	0,0326
	T10 (FA.2000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T11 (FA.6000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T13 (FAC.2000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126
	T14 (FAC.6000)	0,00333	0,00943	0,726	-0,0159	0,0226
	T15 (FAC.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
T8 (AVC.6000)	T1 (N.2000)	0,01333	0,00943	0,168	-0,0059	0,0326
	T2 (N.6000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
T9 (AVC.10000)	T3(N.10000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
	T7 (AVC.2000)	-0,01333	0,00943	0,168	-0,0326	0,0059
	T10 (FA.2000)	-0,00333	0,00943	0,726	-0,0226	0,0159
	T12 (FA.10000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
	T14 (FAC.6000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T15 (FAC.10000)	-0,00333	0,00943	0,726	-0,0226	0,0159
T10 (FA.2000)	T3(N.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T7 (AVC.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T9 (AVC.10000)	0,00333	0,00943	0,726	-0,0159	0,0226
	T12 (FA.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T13 (FAC.2000)	-0,01667	0,00943	0,087	-0,0359	0,0026

	T14 (FAC.6000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126
	T15 (FAC.10000)	0,00000	0,00943	1,000	-0,0193	0,0193
T11 (FA.6000)	T1 (N.2000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126
	T2 (N.6000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T7 (AVC.2000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T13 (FAC.2000)	0,00333	0,00943	0,726	-0,0159	0,0226
	T14 (FAC.6000)	0,01333	0,00943	0,168	-0,0059	0,0326
T12 (FA.10000)	T3(N.10000)	0,00000	0,00943	1,000	-0,0193	0,0193
	T9 (AVC.10000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126
	T10 (FA.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T14 (FAC.6000)	-0,01667	0,00943	0,087	-0,0359	0,0026
	T15 (FAC.10000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
T13 (FAC.2000)	T1 (N.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T2 (N.6000)	-0,01333	0,00943	0,168	-0,0326	0,0059
	T7 (AVC.2000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
	T10 (FA.2000)	0,01667	0,00943	0,087	-0,0026	0,0359
	T11 (FA.6000)	-0,00333	0,00943	0,726	-0,0226	0,0159
	T14 (FAC.6000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T15 (FAC.10000)	0,01667	0,00943	0,087	-0,0026	0,0359
T14 (FAC.6000)	T3(N.10000)	0,01667	0,00943	0,087	-0,0026	0,0359
	T7 (AVC.2000)	-0,00333	0,00943	0,726	-0,0226	0,0159
	T9 (AVC.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T10 (FA.2000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
	T11 (FA.6000)	-0,01333	0,00943	0,168	-0,0326	0,0059
	T12 (FA.10000)	0,01667	0,00943	0,087	-0,0026	0,0359
	T13 (FAC.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T15 (FAC.10000)	0,00667	0,00943	0,485	-0,0126	0,0259
T15 (FAC.10000)	T1 (N.2000)	-,02667(*)	0,00943	0,008	-0,0459	-0,0074
	T3(N.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T7 (AVC.2000)	-0,01000	0,00943	0,297	-0,0293	0,0093
	T9 (AVC.10000)	0,00333	0,00943	0,726	-0,0159	0,0226
	T10 (FA.2000)	0,00000	0,00943	1,000	-0,0193	0,0193
	T12 (FA.10000)	0,01000	0,00943	0,297	-0,0093	0,0293
	T13 (FAC.2000)	-0,01667	0,00943	0,087	-0,0359	0,0026
	T14 (FAC.6000)	-0,00667	0,00943	0,485	-0,0259	0,0126

La figura 3.26 muestra que los hay mucha similitud en los valores obtenidos tanto a 2000 como a 6000 y 10000 lux en todos los medios de cultivos con excepción del medio agua de vertiente.

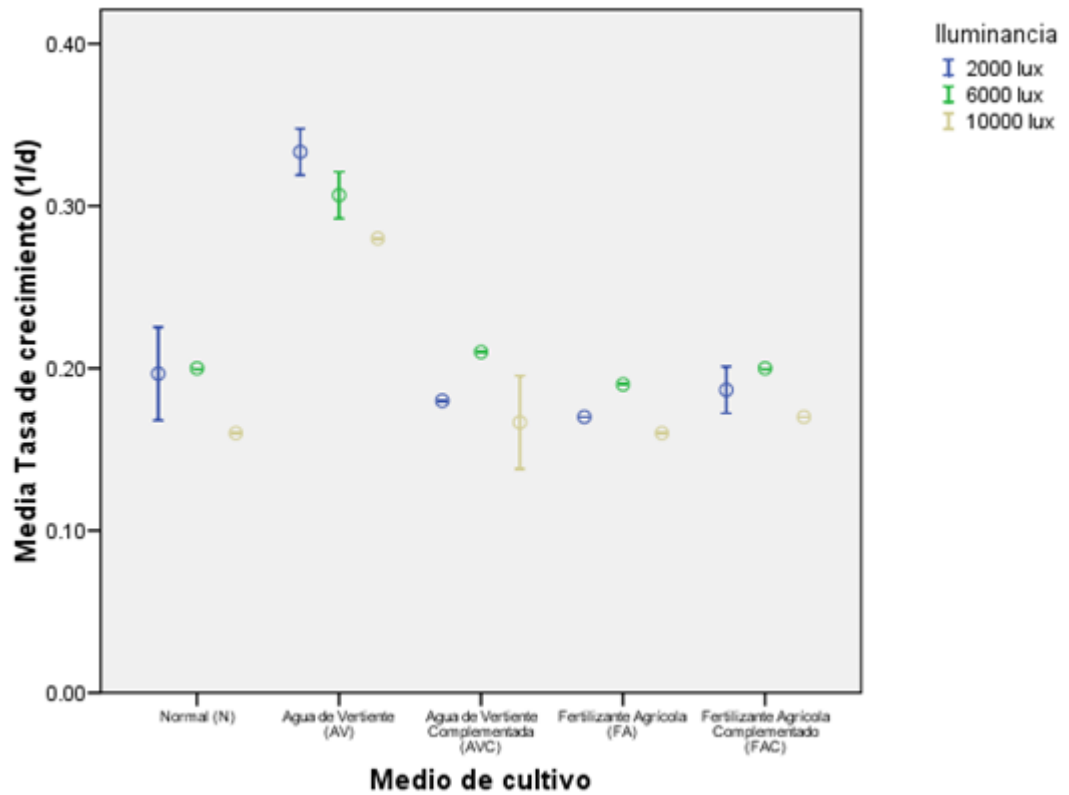


Figura 3.26.- Medias de Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.3.4 Biomasa

Los valores obtenidos con respecto a la biomasa ( $g.L^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. se muestran en la tabla 3.31, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,52 g.L^{-1}$  en el medio Normal a 6000 lux y el menor de  $0,19 g.L^{-1}$  en Agua de Vertiente y Fertilizante Agrícola Complementado a 10000 lux.

Tabla 3.31.- Biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux															
I	0,48	0,52	0,45	0,21	0,23	0,19	0,31	0,43	0,29	0,40	0,48	0,38	0,24	0,35	0,20
II	0,47	0,51	0,44	0,20	0,24	0,19	0,32	0,42	0,29	0,43	0,47	0,38	0,20	0,33	0,19
III	0,50	0,53	0,43	0,22	0,24	0,19	0,33	0,43	0,30	0,46	0,48	0,38	0,22	0,34	0,19
<b>Sumatoria</b>	1,45	1,56	1,33	0,63	0,71	0,56	0,96	1,28	0,88	1,29	1,44	1,14	0,66	1,02	0,59
<b>Promedio</b>	0,48	0,52	0,44	0,21	0,24	0,19	0,32	0,43	0,29	0,43	0,48	0,38	0,22	0,34	0,19

En la figura 3.27 se observa los valores más altos a 6000 lux y los menores a 10000 lux en todos los medios de cultivo sin excepción.

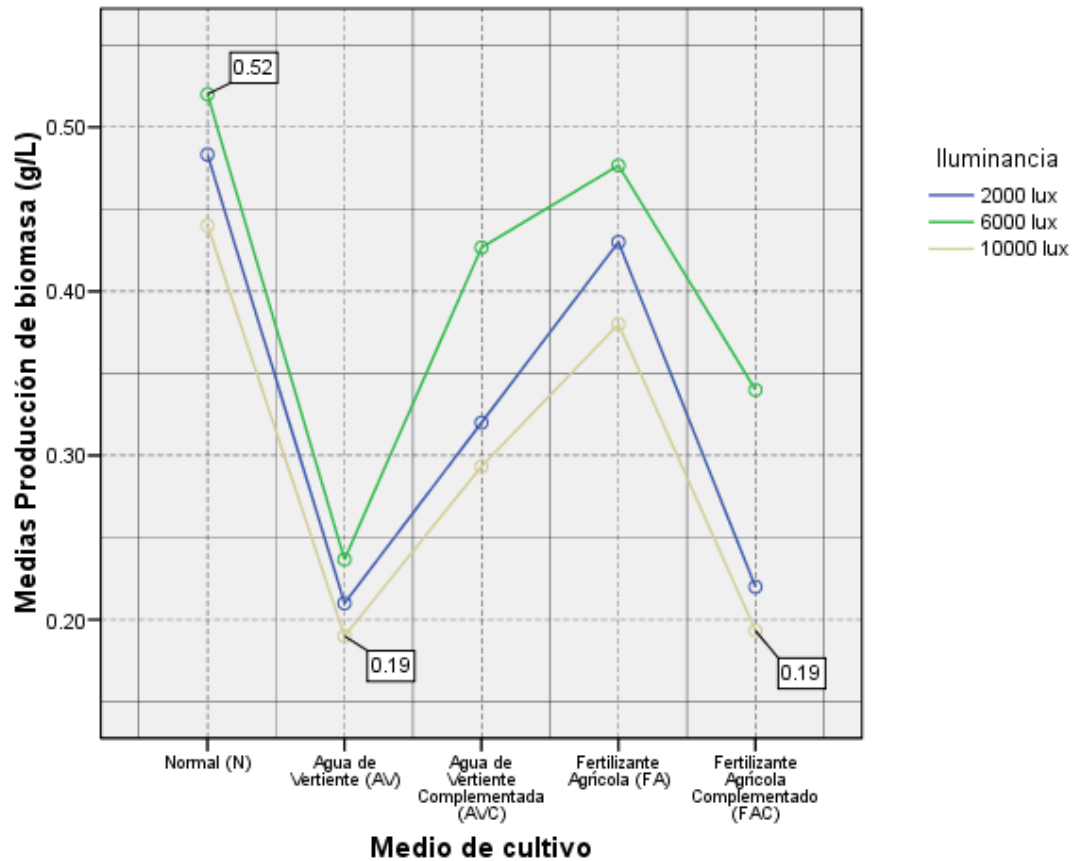


Figura 3.27.- Biomasa promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. (tabla 3.32) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia $\neq$ 0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq$ 0



Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la tabla 3.32 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de biomasa de *Synechocystis* sp.

Tabla 3.32 Análisis de Varianza con respecto a la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados tipo	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,468	4	0,117	797,826	0,000
Iluminancia	0,079	2	0,039	268,955	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,015	8	0,002	12,383	0,000
Error	0,004	30	0,000		
Total	5,891	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.33 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.33.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T11 (FA.6000)	0,00667	0,00989	0,505	-0,0135	0,0269
T3(N.10000)	T8 (AVC.6000)	0,01333	0,00989	0,188	-0,0069	0,0335
	T10 (FA.2000)	0,01000	0,00989	0,320	-0,0102	0,0302
T4 (AV.2000)	T6 (AV.10000)	0,02000	0,00989	0,052	-0,0002	0,0402
	T13 (FAC.2000)	-0,01000	0,00989	0,320	-0,0302	0,0102
	T15 (FAC.10000)	0,01667	0,00989	0,102	-0,0035	0,0369
T5 (AV.6000)	T13 (FAC.2000)	0,01667	0,00989	0,102	-0,0035	0,0369
T6 (AV.10000)	T4 (AV.2000)	-0,02000	0,00989	0,052	-0,0402	0,0002
	T15 (FAC.10000)	-0,00333	0,00989	0,738	-0,0235	0,0169
T7 (AVC.2000)	T14 (FAC.6000)	-0,02000	0,00989	0,052	-0,0402	0,0002
T13 (FAC.2000)	T4 (AV.2000)	0,01000	0,00989	0,320	-0,0102	0,0302
	T5 (AV.6000)	-0,01667	0,00989	0,102	-0,0369	0,0035

Como se observa en la tabla 3.33 y en la figura 3.28 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

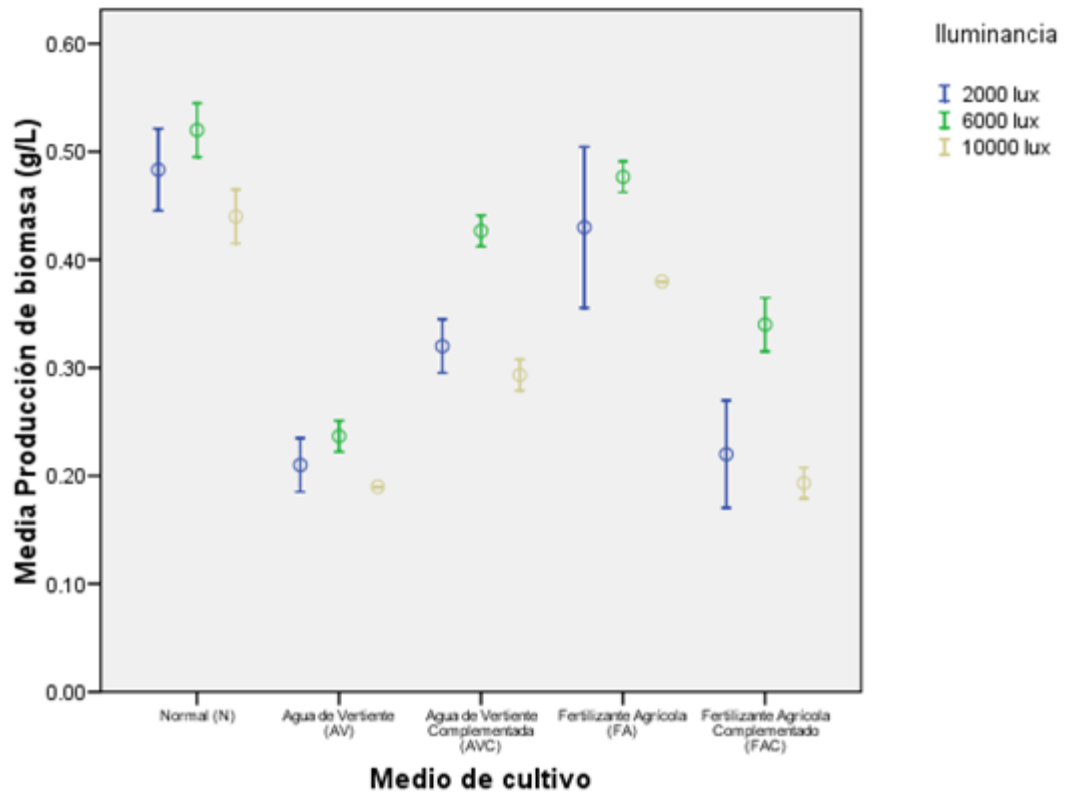


Figura 3.28.- Medias de Producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.3.5 Aceite

Los valores obtenidos con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. se muestran en la tabla 3.34, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,031\text{g.L}^{-1}$  en el medio Normal a 6000 lux y el menor de  $0,007\text{ g.L}^{-1}$  en Agua de Vertiente Complementado a 10000 lux.

Tabla 3.34.- Concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,026	0,032	0,018	0,010	0,011	0,008	0,014	0,021	0,007	0,016	0,020	0,011	0,011	0,017	0,007
II	0,024	0,030	0,018	0,009	0,013	0,008	0,014	0,021	0,008	0,015	0,019	0,012	0,009	0,017	0,008
III	0,028	0,032	0,018	0,010	0,012	0,008	0,014	0,022	0,007	0,014	0,019	0,012	0,010	0,017	0,008
<b>Sumatoria</b>	0,078	0,094	0,054	0,030	0,036	0,025	0,042	0,065	0,022	0,044	0,058	0,035	0,030	0,051	0,023
<b>Promedio</b>	0,026	0,031	0,018	0,010	0,012	0,008	0,014	0,022	0,007	0,015	0,019	0,012	0,010	0,017	0,008
<b>% P/P</b>	5,37	6,03	4,09	4,7	5,1	4,4	4,35	5,06	2,47	3,45	4,01	3,06	4,57	4,99	3,97

Se observa en la figura 3.29 que los valores a 6000 lux fueron los mayores, mientras que a 10000 lux fueron los menores en todos los medios de cultivo evaluados.

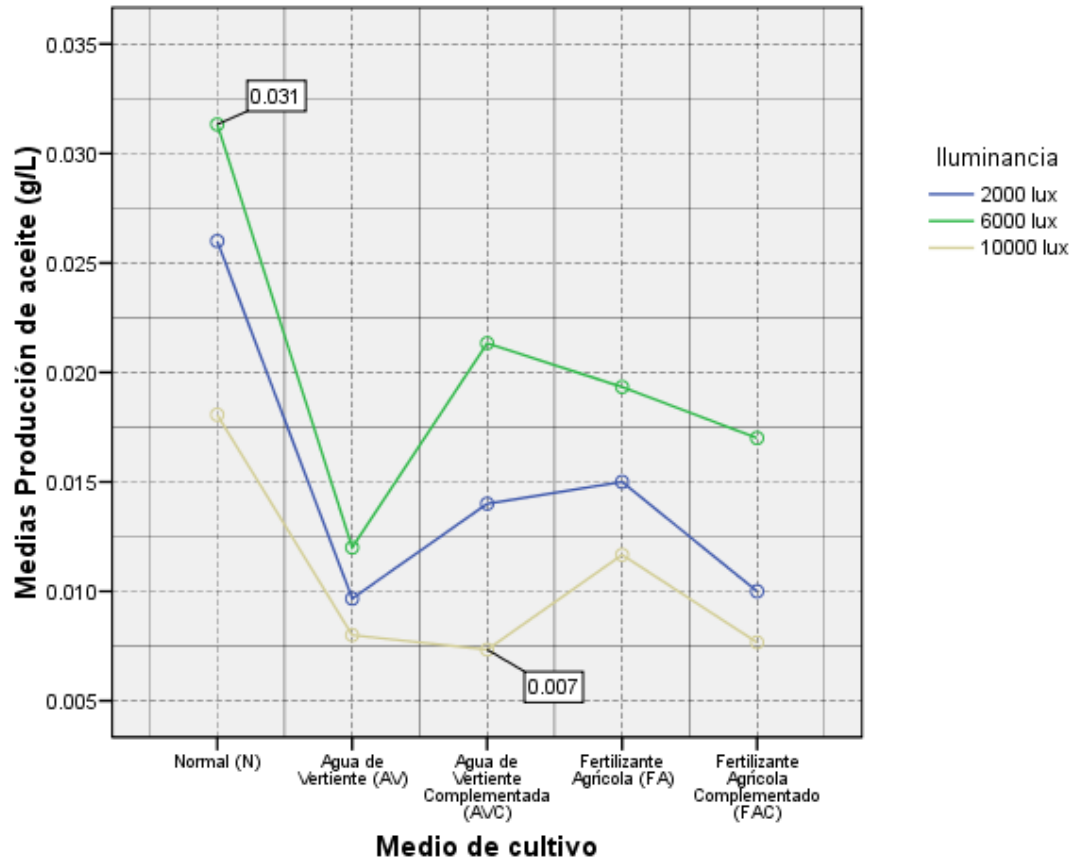


Figura 3.29.- Aceite promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. (tabla 3.35) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia $\neq$ 0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.35 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de aceite de *Synechocystis* sp.

Tabla 3.35 Análisis de Varianza con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,001	4	0,000	458,145	0,000
Iluminancia	0,001	2	0,000	505,574	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,000	8	1,44E-005	20,779	0,000
Error	2,08E-005	30	6,93E-007		
Total	,013	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.36 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

*Tabla 3.36.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechocystis* sp. en los tratamientos evaluados.*

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T3(N.10000)	T11 (FA.6000)	-0,001333	0,000678	0,058	-0,00272	0,00005
	T14 (FAC.6000)	0,001000	0,000678	0,150	-0,00038	0,00238
T4 (AV.2000)	T13 (FAC.2000)	-0,000333	0,000678	0,626	-0,00172	0,00105
T5 (AV.6000)	T12 (FA.10000)	0,000333	0,000678	0,626	-0,00105	0,00172
T6 (AV.10000)	T9 (AVC.10000)	0,000667	0,000678	0,333	-0,00072	0,00205
	T15 (FAC.10000)	0,000333	0,000678	0,626	-0,00105	0,00172
T7 (AVC.2000)	T10 (FA.2000)	-0,001000	0,000678	0,150	-0,00238	0,00038

Como se observa en la tabla 3.36 y en la figura 3.30 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

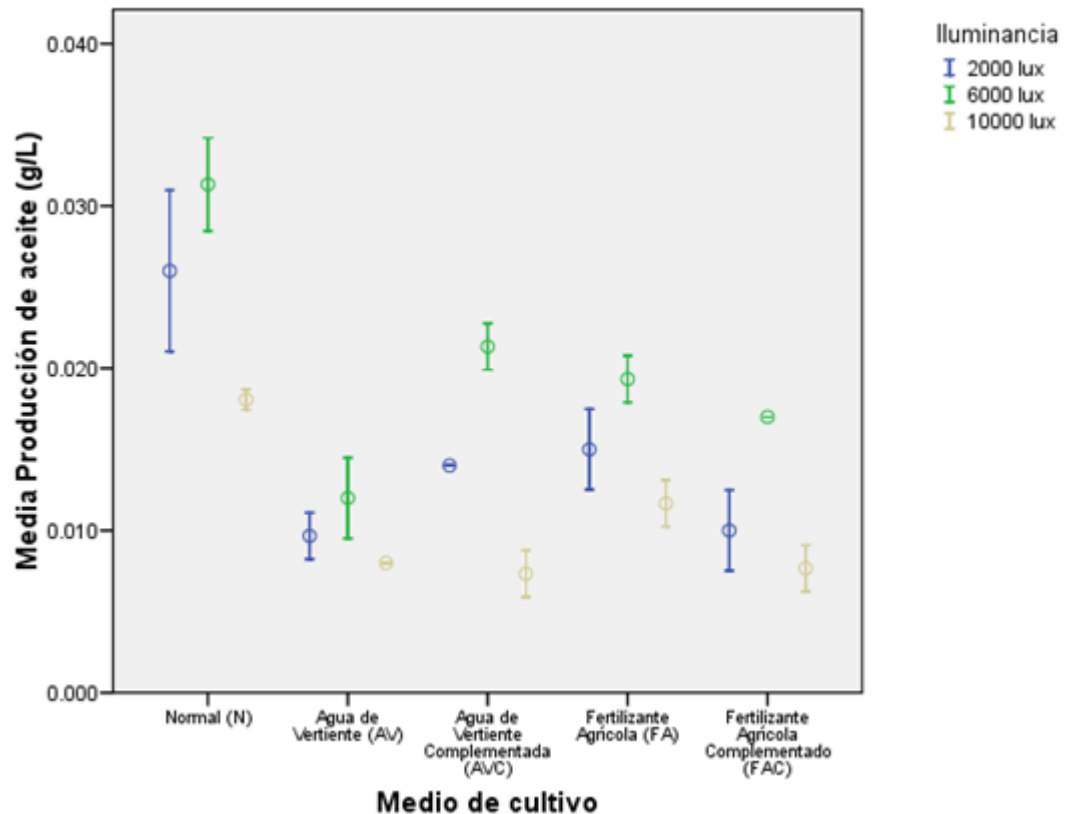


Figura 3.30.- Media de Producción de Aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Synechosystis* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.4 *Botryococcus* sp.

#### 3.4.1 Aislamiento e identificación

La muestra de agua tiene una procedencia: Provincia de Pichincha, Quito (Puengasí) en el Reservorio de agua de la EMAAP-Q (Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable de Quito), cuyas coordenadas son Latitud  $0^{\circ}14'13.84''$  S y Longitud  $78^{\circ}29'38.41''$  O, con Altura de 2984 msnm.

Según las claves de identificación según Whitford L. & Schumacher G. (1973) se obtuvieron los siguientes resultados:

- Célula piramidal u ovalada en colonia, esférica en forma libre



- Forma colonias irregulares en el cual las células están unidas por el mucílago
- Color: café-amarillento, verde
- Hábitat: agua dulce (lagos, reservorios, pozos)
- Sin motilidad, de vida libre
- Presencia de mucílago no estratificado
- Longitud: 5-17  $\mu\text{m}$ , diámetro 3-10  $\mu\text{m}$
- Presencia de un pirinoide
- Clasificación:
  - Dominio Eukaryota
  - Reino Plantae
  - Subreino Viridaeplantae
  - Filo Chlorophyta
  - Clase Chlorophyceae
  - Orden Chlorococcales
  - Familia Botryococcaceae
  - Género *Botryococcus*

La muestra procedente de Puengasí (*figura 3.31*) fue obtenida en colaboración con el Dr. Ever Morales de la Universidad del Zulia (Venezuela), la cual fue mantenida en iluminación 12:12 y alimentada con medio Chu-13 modificado.



*Figura 3.31.- Muestra original de Puengasí, (Quito- Provincia de Pichincha)*

Una vez estimulado el crecimiento se procedió a la observación microscópica de la muestra visualizándose las colonias de *Botryococcus* sp. (*figura 3.32*).

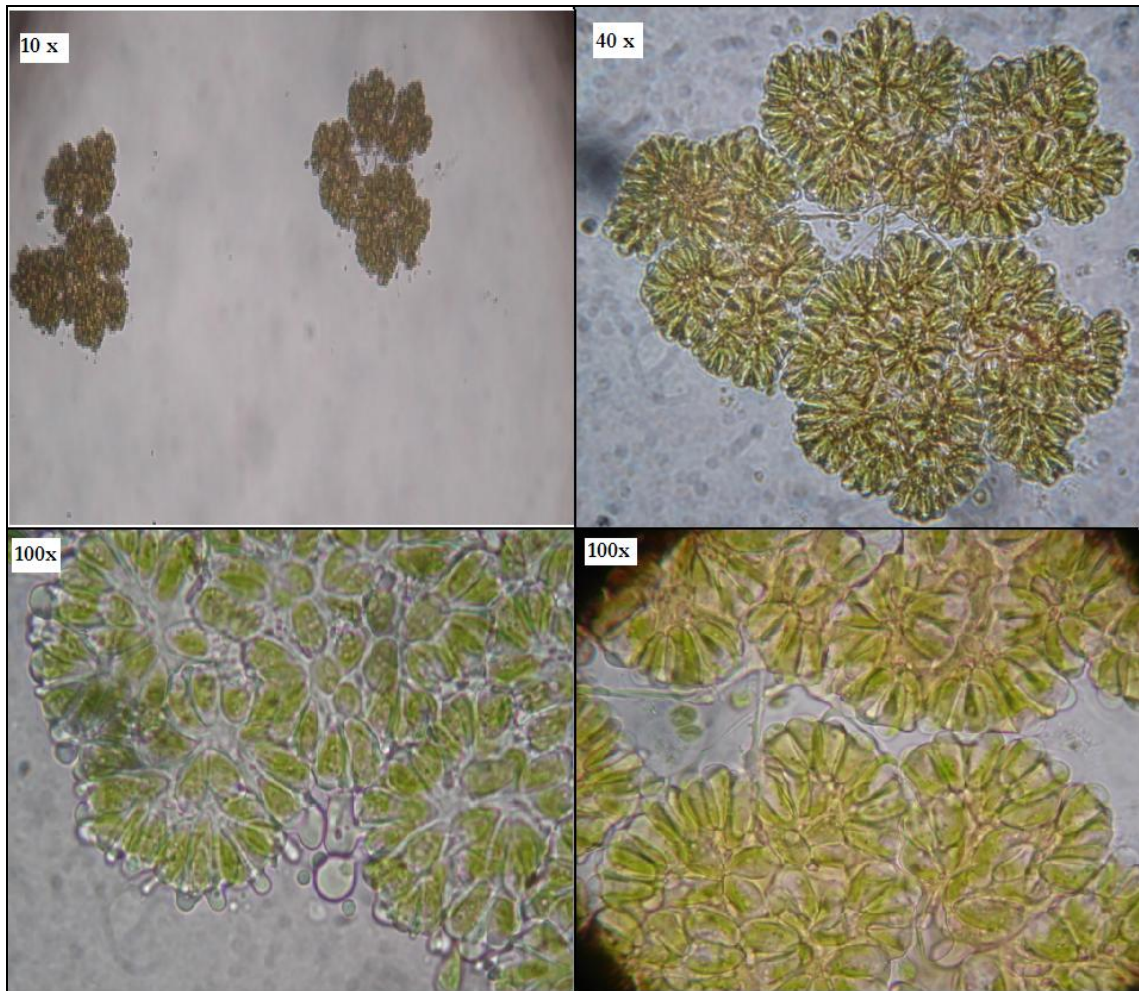


Figura 3.32.- vistas al microscopio de *Botryococcus* sp. procedente de Puengasí

### 3.4.2 Densidad celular máxima

Se obtuvo una regresión lineal con la curva de calibración de Absorbancia a 750 nm versus el número de células por mililitro mediante conteo celular (*figura 3.33*) con un  $R^2$  de 0,99.

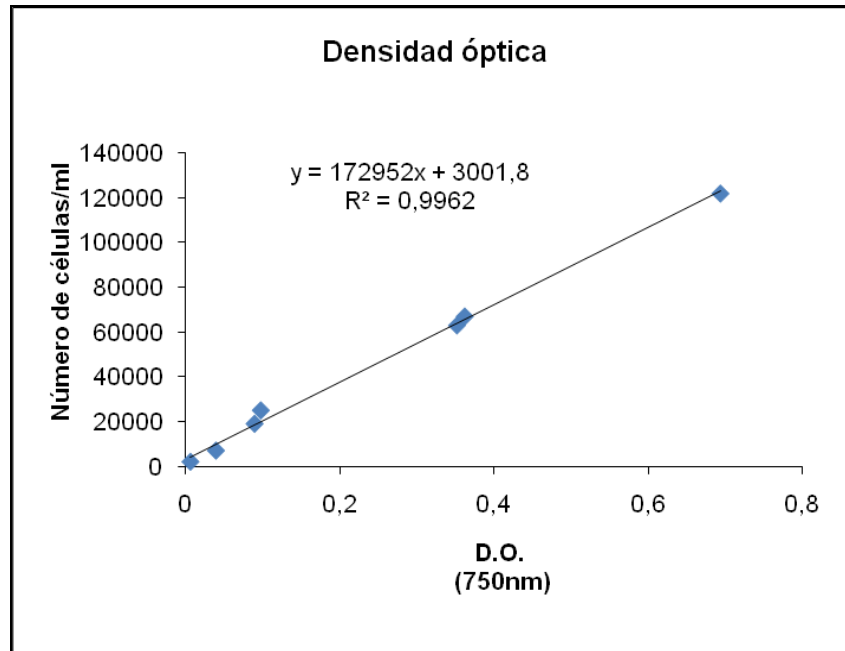


Figura 3.33.- Relación entre densidad celular de *Botryococcus* sp. y absorbancia a 750 nm.

Los valores obtenidos con respecto a la densidad celular máxima ( $\text{cel.mL}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. se muestran en la tabla 3.37, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $1,61 \times 10^5 \text{ cél.mL}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 10000 lux y el menor de  $9,3 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$  en Agua de vertiente a 2000 lux.

Tabla 3.37.- Densidades celulares máximas (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Botryococcus* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	145341,30	147935,58	158485,65	92417,98	94666,36	106254	144130	149319	158485	141363	146551	160388	143784	148281	155891
II	144822,44	148281,48	159004,50	92763,89	94839,31	106945	144303	149492	158312	143438	146897	160734	144130	148454	156237
III	145168,34	148454,43	158658,60	92936,84	95012,26	106600	143784	149146	158312	141709	146724	160906	143611	148627	155891
<b>Sumatoria</b>	435332	444671	476149	278119	284518	319800	432219	447958	475111	426512	440175	482029	431527	445363	468020
<b>Promedio</b>	145111	148224	158716	92706	94839	106600	144073	149319	158370	142171	146725	160676	143842	148454	156007

La figura 3.34 indica que los valores más altos fueron a 10000 lux y los menores a 2000 lux en todos los medios de cultivo evaluados.

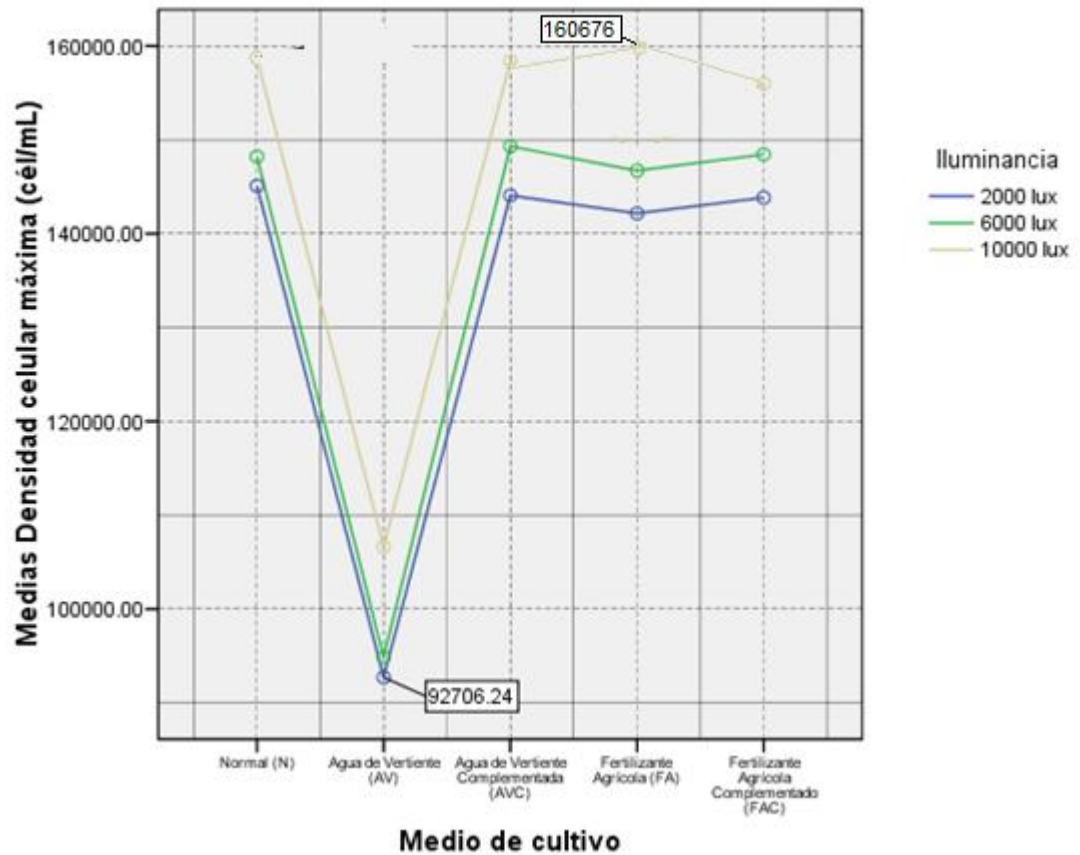


Figura 3.34.- Densidades celulares máximas promedio de *Botryococcus* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la densidad celular máxima de *Botryococcus* sp. (tabla 3.38) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia≠0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo ≠0

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia≠0

El análisis de varianza de la tabla 3.38 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia) y factor B (Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales, mientras que para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) se acepta la hipótesis nula ya que esta interacción presenta un efecto no significativo sobre la densidad celular máxima de *Botryococcus* sp.

Tabla 3.38 Análisis de Varianza con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Botryococcus* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	18926214673,034	4	4731553668,259	654,299	0,000
Iluminancia	1134957476,971	2	567478738,486	78,473	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	110129487,430	8	13766185,929	1,904	0,097
Error	216944698,190	30	7231489,940		
Total	888724266208,335	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.39 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado

de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.39.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la densidad celular máxima (cél.mL<sup>-1</sup>) de *Botryococcus* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T2 (N.6000)	-3.113,13667	2.195,67604	0,167	-7.597,3054	1.371,0320
	T7 (AVC.2000)	1.037,71333	2.195,67604	0,640	-3.446,4554	5.521,8820
	T8 (AVC.6000)	-4.208,49667	2.195,67604	0,065	-8.692,6654	275,6720
	T10 (FA.2000)	2.940,18667	2.195,67604	0,191	-1.543,9820	7.424,3554
	T11 (FA.6000)	-1.614,21667	2.195,67604	0,468	-6.098,3854	2.869,9520
	T12 (FA.10000)	-3.401,38667	2.195,67604	0,132	-7.885,5554	1.082,7820
	T13 (FAC.2000)	1.268,31333	2.195,67604	0,568	-3.215,8554	5.752,4820
	T14 (FAC.6000)	-3.343,73667	2.195,67604	0,138	-7.827,9054	1.140,4320
T2 (N.6000)	T1 (N.2000)	3.113,13667	2.195,67604	0,167	-1.371,0320	7.597,3054
	T7 (AVC.2000)	4.150,85000	2.195,67604	0,068	-333,3187	8.635,0187
	T8 (AVC.6000)	-1.095,36000	2.195,67604	0,622	-5.579,5287	3.388,8087
	T11 (FA.6000)	1.498,92000	2.195,67604	0,500	-2.985,2487	5.983,0887
	T13 (FAC.2000)	4.381,45000	2.195,67604	0,055	-102,7187	8.865,6187
	T14 (FAC.6000)	-230,60000	2.195,67604	0,917	-4.714,7687	4.253,5687
T3(N.10000)	T9 (AVC.10000)	345,90000	2.195,67604	0,876	-4.138,2687	4.830,0687
	T15 (FAC.10000)	2.709,58000	2.195,67604	0,227	-1.774,5887	7.193,7487
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	-2.133,07333	2.195,67604	0,339	-6.617,2420	2.351,0954
T7 (AVC.2000)	T1 (N.2000)	-1.037,71333	2.195,67604	0,640	-5.521,8820	3.446,4554
	T2 (N.6000)	-4.150,85000	2.195,67604	0,068	-8.635,0187	333,3187
	T10 (FA.2000)	1.902,47333	2.195,67604	0,393	-2.581,6954	6.386,6420
	T11 (FA.6000)	-2.651,93000	2.195,67604	0,237	-7.136,0987	1.832,2387
	T13 (FAC.2000)	230,60000	2.195,67604	0,917	-4.253,5687	4.714,7687
	T14 (FAC.6000)	-4.381,45000	2.195,67604	0,055	-8.865,6187	102,7187
T8 (AVC.6000)	T1 (N.2000)	4.208,49667	2.195,67604	0,065	-275,6720	8.692,6654
	T2 (N.6000)	1.095,36000	2.195,67604	0,622	-3.388,8087	5.579,5287
	T11 (FA.6000)	2.594,28000	2.195,67604	0,247	-1.889,8887	7.078,4487
	T14 (FAC.6000)	864,76000	2.195,67604	0,696	-3.619,4087	5.348,9287
T10 (FA.2000)	T1 (N.2000)	-2.940,18667	2.195,67604	0,191	-7.424,3554	1.543,9820
	T7 (AVC.2000)	-1.902,47333	2.195,67604	0,393	-6.386,6420	2.581,6954
	T13 (FAC.2000)	-1.671,87333	2.195,67604	0,452	-6.156,0420	2.812,2954
T11 (FA.6000)	T1 (N.2000)	1.614,21667	2.195,67604	0,468	-2.869,9520	6.098,3854
	T2 (N.6000)	-1.498,92000	2.195,67604	0,500	-5.983,0887	2.985,2487
	T7 (AVC.2000)	2.651,93000	2.195,67604	0,237	-1.832,2387	7.136,0987
	T8 (AVC.6000)	-2.594,28000	2.195,67604	0,247	-7.078,4487	1.889,8887
	T12 (FA.10000)	-1.787,17000	2.195,67604	0,422	-6.271,3387	2.696,9987



	T13 (FAC.2000)	2.882,53000	2.195,67604	0,199	-1.601,6387	7.366,6987
	T14 (FAC.6000)	-1.729,52000	2.195,67604	0,437	-6.213,6887	2.754,6487
T13 (FAC.2000)	T1 (N.2000)	-1.268,31333	2.195,67604	0,568	-5.752,4820	3.215,8554
	T2 (N.6000)	-4.381,45000	2.195,67604	0,055	-8.865,6187	102,7187
	T7 (AVC.2000)	-230,60000	2.195,67604	0,917	-4.714,7687	4.253,5687
	T10 (FA.2000)	1.671,87333	2.195,67604	0,452	-2.812,2954	6.156,0420
	T11 (FA.6000)	-2.882,53000	2.195,67604	0,199	-7.366,6987	1.601,6387
T14 (FAC.6000)	T1 (N.2000)	3.343,73667	2.195,67604	0,138	-1.140,4320	7.827,9054
	T2 (N.6000)	230,60000	2.195,67604	0,917	-4.253,5687	4.714,7687
	T7 (AVC.2000)	4.381,45000	2.195,67604	0,055	-102,7187	8.865,6187
	T8 (AVC.6000)	-864,76000	2.195,67604	0,696	-5.348,9287	3.619,4087
	T11 (FA.6000)	1.729,52000	2.195,67604	0,437	-2.754,6487	6.213,6887
	T12 (FA.10000)	-57,65000	2.195,67604	0,979	-4.541,8187	4.426,5187

### 3.4.3 Tasa de crecimiento

Los valores obtenidos con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. se muestran en la tabla 3.40, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,09 d^{-1}$  en el medio Agua de Vertiente a 10000 lux y el menor de  $0,04 d^{-1}$  en los medios Agua de vertiente complementado, Fertilizante agrícola y Fertilizante Agrícola complementado a 2000 y 6000 lux.

Tabla 3.40.- tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,06	0,06	0,07	0,07	0,08	0,09	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	0,05
II	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,09	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	0,05
III	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,09	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	0,05
<b>Sumatoria</b>	0,17	0,18	0,21	0,21	0,22	0,26	0,13	0,13	0,15	0,13	0,13	0,18	0,13	0,13	0,15
<b>Promedio</b>	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,09	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	0,05

En la figura 3.35 se observa los valores mayores a 10000 lux en los medios de cultivo, identificándose poca variación a 2000 y 6000 lux.

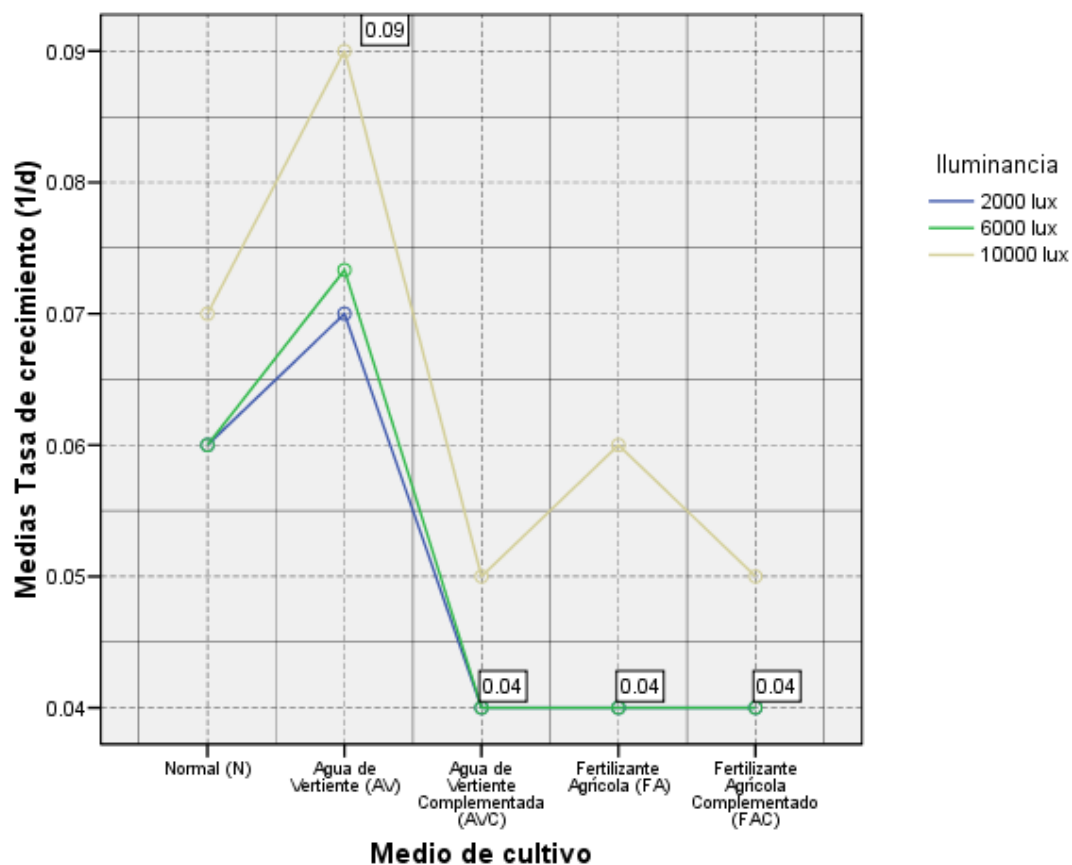


Figura 3.35.- Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) promedio de *Botryococcus* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. (tabla 3.41) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto iluminancia=0

Ha: efecto iluminancia $\neq$ 0

Ho: efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.41 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la tasa de crecimiento de *Botryococcus* sp.

Tabla 3.41 Análisis de Varianza con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ , d<sup>1</sup>) de *Botryococcus* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,008	4	0,002	941,500	0,000
Iluminancia	0,002	2	0,001	421,000	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,000	8	2,72E-005	12,250	0,000
Error	6,67E-005	30	2,22E-006		
Total	0,146	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.42 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado

de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

*Tabla 3.42.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. en los tratamientos evaluados.*

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
T1 (N.2000)	T2 (N.6000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
	T12 (FA.10000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
T3(N.10000)	T4 (AV.2000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
T7 (AVC.2000)	T8 (AVC.6000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
	T10 (FA.2000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
	T11 (FA.6000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
	T13 (FAC.2000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
	T14 (FAC.6000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025
T9 (AVC.10000)	T15 (FAC.10000)	0,00000	0,00122	1,000	-0,0025	0,0025

Como se observa en la tabla 3.42 y en la figura 3.36, los tratamientos que presentaron diferencias no significativas, es decir son estadísticamente iguales, fueron T1(N.2000) = T12(FA.10000) = T2(N.6000), T3(N.10000) = T4 (AV.2000), T7 (AVC.2000) = T8(AVC.6000) = T10(FA.2000) = T11 (FA.6000) = T13 (FAC.2000) = T14,y T9 (AVC.10000) = T15 (FAC.10000).

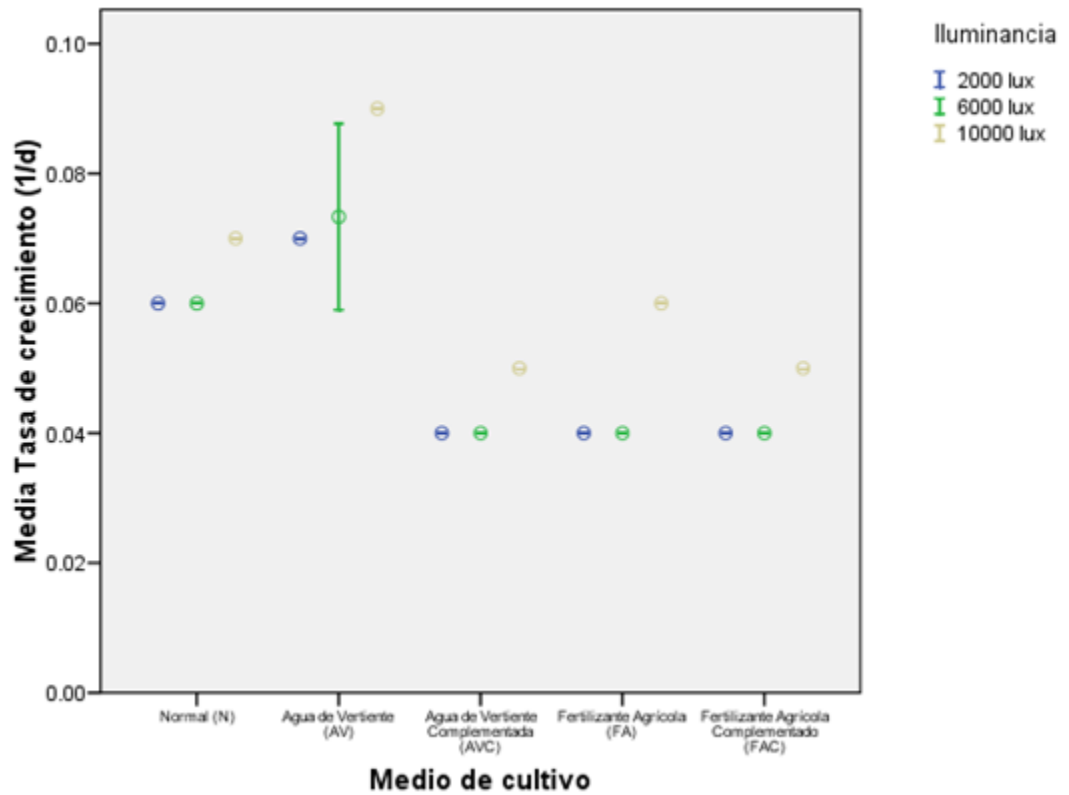


Figura 3.36.- Medias de Tasa de crecimiento ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

#### 3.4.4 Biomasa

Los valores obtenidos con respecto a la biomasa ( $g.L^{-1}$ ) de la microalga *Botryococcus* sp. se muestran en la tabla 3.43, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,84 g.L^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a 10000 lux y el menor de  $0,46 g.L^{-1}$  en Agua de Vertiente a 2000 y 6000 lux.

Tabla 3.43.- Biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
lux															
I	0,76	0,77	0,82	0,44	0,45	0,50	0,73	0,74	0,82	0,71	0,73	0,83	0,72	0,74	0,78
II	0,74	0,78	0,83	0,47	0,46	0,53	0,74	0,75	0,81	0,73	0,74	0,84	0,74	0,75	0,79
III	0,75	0,78	0,82	0,48	0,48	0,51	0,71	0,74	0,81	0,70	0,74	0,84	0,72	0,75	0,78
<b>Sumatoria</b>	2,25	2,33	2,47	1,39	1,39	1,54	2,18	2,23	2,44	2,15	2,21	2,51	2,18	2,25	2,35
<b>Promedio</b>	0,75	0,78	0,82	0,46	0,46	0,51	0,73	0,74	0,81	0,72	0,74	0,84	0,73	0,75	0,78

La figura 3.37 indica valores mayores a 10000 lux en todos los medios de cultivo, con poca diferencia a 2000 y 6000 lux.

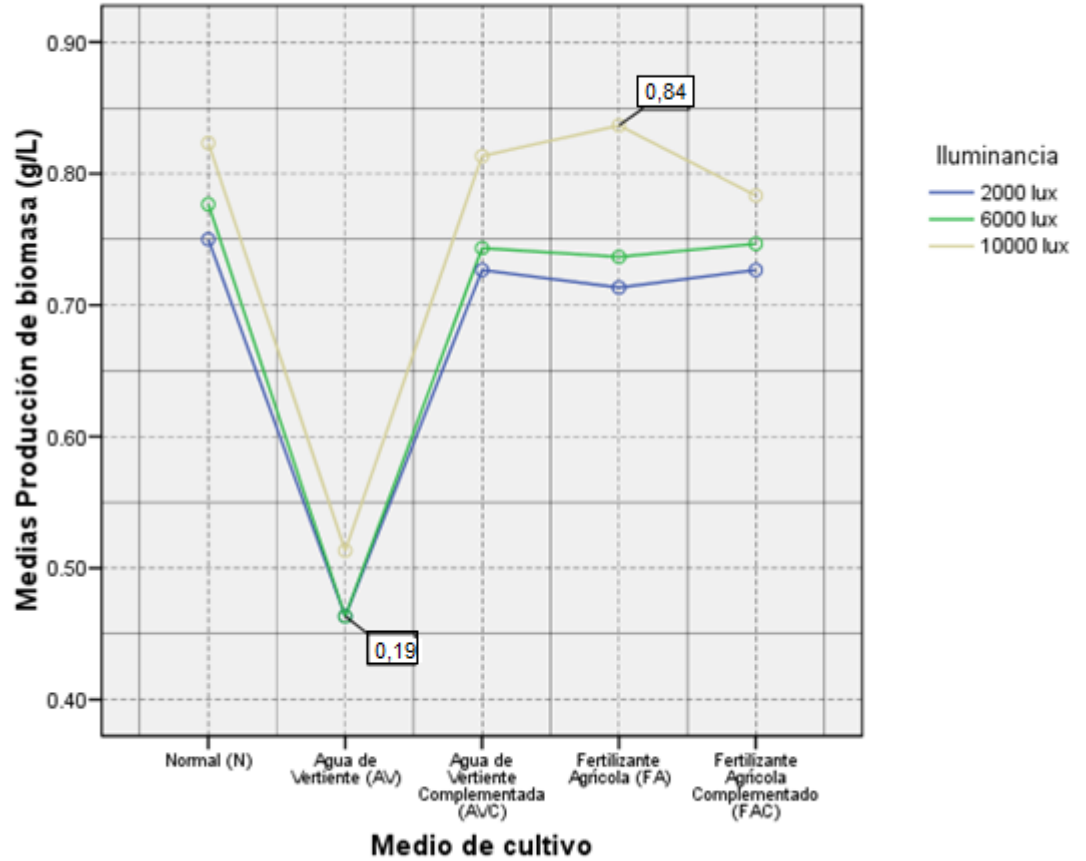


Figura 3.37.- Biomasa promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias.

Se realizó el análisis de varianza para la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. (tabla 3.44) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0



Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.44 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de biomasa de *Botryococcus* sp.

Tabla 3.44 Análisis de Varianza con respecto a la producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,588	4	0,147	1182,009	0,000
Iluminancia	0,050	2	0,025	202,196	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,006	8	0,001	6,371	0,000
Error	0,004	30	0,000		
Total	23,192	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.45 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel

prefijado de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3.45.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la biomasa ( $g.L^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. en los tratamientos evaluados.

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T8 (AVC.6000)	0,00667	0,00911	0,470	-0,0119	0,0253
	T11 (FA.6000)	0,01333	0,00911	0,154	-0,0053	0,0319
	T14 (FAC.6000)	0,00333	0,00911	0,717	-0,0153	0,0219
T2 (N.6000)	T15 (FAC.10000)	-0,00667	0,00911	0,470	-0,0253	0,0119
T3(N.10000)	T9 (AVC.10000)	0,01000	0,00911	0,281	-0,0086	0,0286
	T12 (FA.10000)	-0,01333	0,00911	0,154	-0,0319	0,0053
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	0,00000	0,00911	1,000	-0,0186	0,0186
T7 (AVC.2000)	T8 (AVC.6000)	-0,01667	0,00911	0,077	-0,0353	0,0019
	T10 (FA.2000)	0,01333	0,00911	0,154	-0,0053	0,0319
	T11 (FA.6000)	-0,01000	0,00911	0,281	-0,0286	0,0086
	T13 (FAC.2000)	0,00000	0,00911	1,000	-0,0186	0,0186

Como se observa en la tabla 3.45 y en la figura 3.38 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

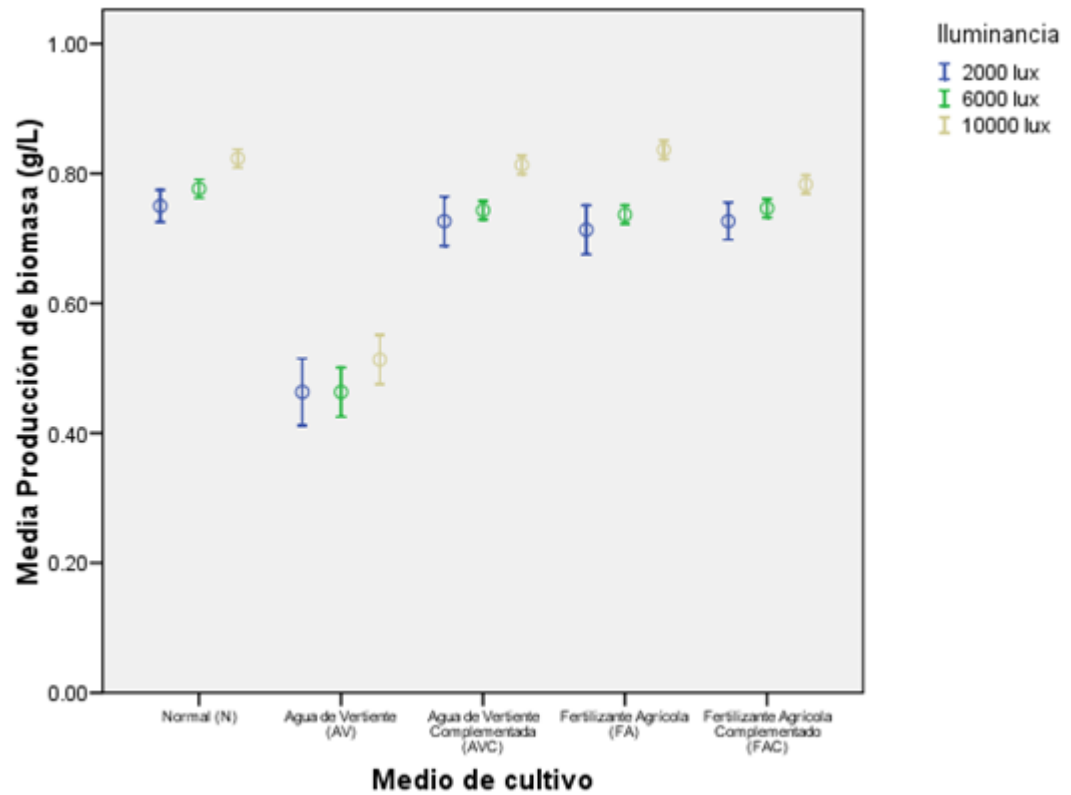


Figura 3.38.- Medias de Producción de biomasa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

### 3.4.5 Aceite

Los valores obtenidos con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. se muestran en la tabla 3.46, en la cual se observa que el valor más alto fue de  $0,126 \text{ g.L}^{-1}$  en el medio Fertilizante Agrícola a  $10000 \text{ lux}$  y el menor de  $0,057 \text{ g.L}^{-1}$  en Agua de Vertiente a  $2000 \text{ lux}$ .

Tabla 3.46.- Concentración de aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Botryococcus* sp. obtenidas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias.

medio de cultivo	N (normal)			AV (agua de vertiente)			AVC (agua de vertiente complementado)			FA (fertilizante agrícola)			FAC (fertilizante agrícola complementado)		
	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000	2000	6000	10000
I	0,099	0,102	0,115	0,054	0,057	0,068	0,098	0,102	0,117	0,097	0,101	0,125	0,097	0,101	0,113
II	0,098	0,106	0,117	0,056	0,058	0,071	0,100	0,104	0,119	0,099	0,101	0,126	0,101	0,103	0,115
III	0,101	0,108	0,118	0,061	0,060	0,070	0,093	0,103	0,117	0,098	0,103	0,128	0,098	0,103	0,116
<b>Sumatoria</b>	0,297	0,316	0,350	0,171	0,176	0,209	0,291	0,309	0,352	0,294	0,305	0,379	0,296	0,306	0,344
<b>Promedio</b>	0,099	0,105	0,117	0,057	0,059	0,070	0,097	0,103	0,117	0,098	0,102	0,126	0,099	0,102	0,115
<b>% P/P</b>	13,23	13,57	14,17	12,34	12,6	13,6	13,34	13,83	14,47	13,68	13,77	15,14	13,57	13,65	14,63

En la figura 3.39 se identifica los valores más altos a 10000 lux en todos los medios de cultivo evaluados, mientras que los menores fueron a 2000 lux.

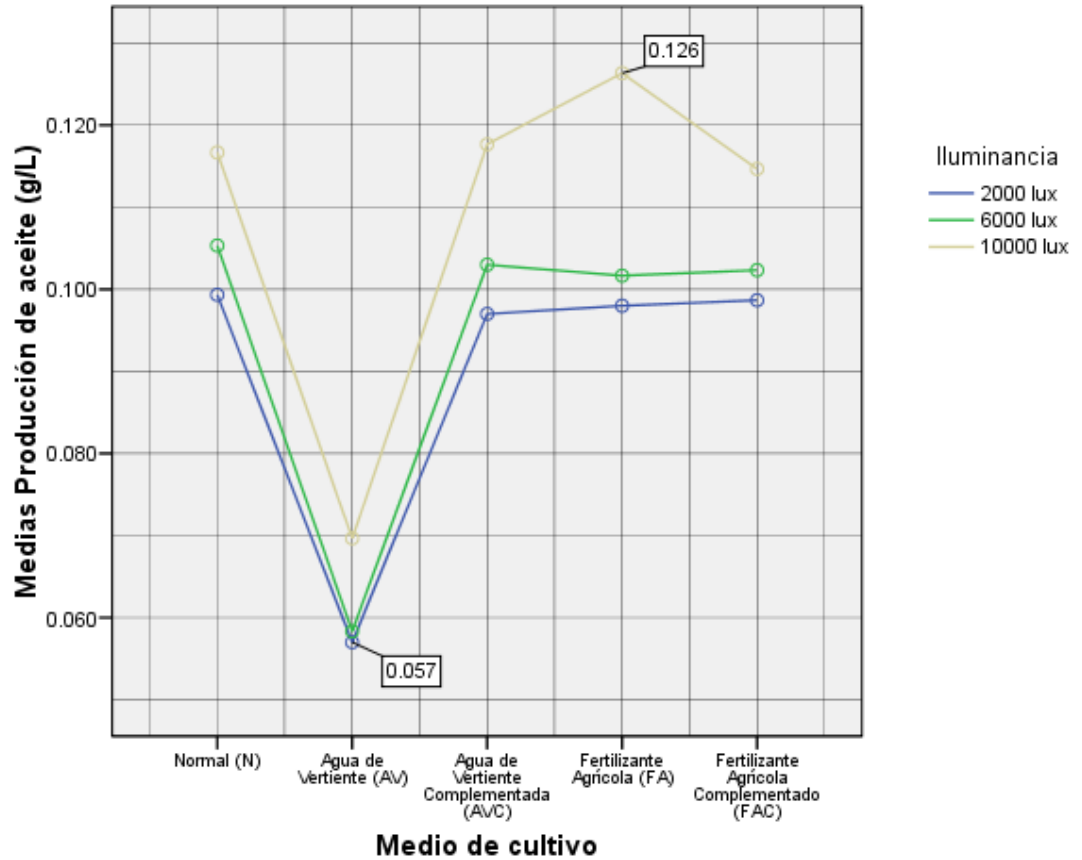


Figura 3.39.- Aceite promedio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. en los cinco medios de cultivo y a las diferentes iluminancias

Se realizó el análisis de varianza para la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. (tabla 3.47) en el cual se verificó las siguientes hipótesis:

$H_0$ : efecto iluminancia=0

$H_a$ : efecto iluminancia $\neq$ 0

$H_0$ : efecto del medio de cultivo=0

Ha: efecto del medio de cultivo  $\neq 0$

Ho: efecto medio de cultivo x iluminancia=0

Ha: efecto medio de cultivo x iluminancia $\neq 0$

El análisis de varianza de la tabla 3.47 muestra que las significancias obtenidas para el factor A (Iluminancia), factor B (Medio de cultivo) y para la interacción de los factores A\*B (Iluminancia \* Medio de cultivo) es menor que el nivel de significancia prefijado de 0.05 por lo que se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores individuales y de su interacción respecto a su efecto sobre la concentración de aceite de *Botryococcus* sp.

Tabla 3.47 Análisis de Varianza con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Medio de cultivo	0,015	4	0,004	922,494	0,000
Iluminancia	0,003	2	0,001	376,531	0,000
Medio de cultivo * Iluminancia	0,000	8	3,56E-005	8,940	0,000
Error	0,000	30	3,98E-006		
Total	0,448	45			

Para el análisis de Diferencia Mínima Significativa se planteó las siguientes hipótesis para las medias de los quince tratamientos aplicados:

Ho:  $\mu_i = \mu_j$

Ha:  $\mu_i \neq \mu_j$

La tabla 3.48 muestra los datos en los que se acepta la hipótesis nula (Ho:  $\mu_i = \mu_j$ ) ya que presentan una significancia mayor al nivel prefijado

de 0.05, los datos no mostrados fueron en los que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) ya que existen diferencias entre los tratamientos.

*Tabla 3.48.- Diferencia Mínima Significativa con respecto a la concentración de aceite ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de *Botryococcus* sp. en los tratamientos evaluados.*

(I) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	(J) Tratamiento (Medio de cultivo.lux)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
T1 (N.2000)	T7 (AVC.2000)	0,002333	0,001628	0,162	-0,00099	0,00566
	T10 (FA.2000)	0,001333	0,001628	0,419	-0,00199	0,00466
	T11 (FA.6000)	-0,002333	0,001628	0,162	-0,00566	0,00099
	T13 (FAC.2000)	0,000667	0,001628	0,685	-0,00266	0,00399
	T14 (FAC.6000)	-0,003000	0,001628	0,075	-0,00633	0,00033
T2 (N.6000)	T8 (AVC.6000)	0,002333	0,001628	0,162	-0,00099	0,00566
	T14 (FAC.6000)	0,003000	0,001628	0,075	-0,00033	0,00633
T3(N.10000)	T9 (AVC.10000)	-0,001000	0,001628	0,544	-0,00433	0,00233
	T15 (FAC.10000)	0,002000	0,001628	0,229	-0,00133	0,00533
T4 (AV.2000)	T5 (AV.6000)	-0,001333	0,001628	0,419	-0,00466	0,00199
T7 (AVC.2000)	T1 (N.2000)	-0,002333	0,001628	0,162	-0,00566	0,00099
	T10 (FA.2000)	-0,001000	0,001628	0,544	-0,00433	0,00233
	T13 (FAC.2000)	-0,001667	0,001628	0,314	-0,00499	0,00166
T8 (AVC.6000)	T2 (N.6000)	-0,002333	0,001628	0,162	-0,00566	0,00099

	T11 (FA.6000)	0,001333	0,001628	0,419	-0,00199	0,00466
	T14 (FAC.6000)	0,000667	0,001628	0,685	-0,00266	0,00399
T9 (AVC.10000)	T3(N.10000)	0,001000	0,001628	0,544	-0,00233	0,00433
	T15 (FAC.10000)	0,003000	0,001628	0,075	-0,00033	0,00633
T10 (FA.2000)	T1 (N.2000)	-0,001333	0,001628	0,419	-0,00466	0,00199
	T7 (AVC.2000)	0,001000	0,001628	0,544	-0,00233	0,00433
	T13 (FAC.2000)	-0,000667	0,001628	0,685	-0,00399	0,00266
T11 (FA.6000)	T1 (N.2000)	0,002333	0,001628	0,162	-0,00099	0,00566
	T8 (AVC.6000)	-0,001333	0,001628	0,419	-0,00466	0,00199
	T13 (FAC.2000)	0,003000	0,001628	0,075	-0,00033	0,00633
	T14 (FAC.6000)	-0,000667	0,001628	0,685	-0,00399	0,00266
T13 (FAC.2000)	T1 (N.2000)	-0,000667	0,001628	0,685	-0,00399	0,00266
	T7 (AVC.2000)	0,001667	0,001628	0,314	-0,00166	0,00499
	T10 (FA.2000)	0,000667	0,001628	0,685	-0,00266	0,00399
	T11 (FA.6000)	-0,003000	0,001628	0,075	-0,00633	0,00033
T14 (FAC.6000)	T1 (N.2000)	0,003000	0,001628	0,075	-0,00033	0,00633
	T2 (N.6000)	-0,003000	0,001628	0,075	-0,00633	0,00033
	T8 (AVC.6000)	-0,000667	0,001628	0,685	-0,00399	0,00266
	T11 (FA.6000)	0,000667	0,001628	0,685	-0,00266	0,00399
T15 (FAC.10000)	T3(N.10000)	-0,002000	0,001628	0,229	-0,00533	0,00133
	T9 (AVC.10000)	-0,003000	0,001628	0,075	-0,00633	0,00033



Como se observa en la tabla 3.48 y en la figura 3.40 existen varios tratamientos que presentan igualdad estadística.

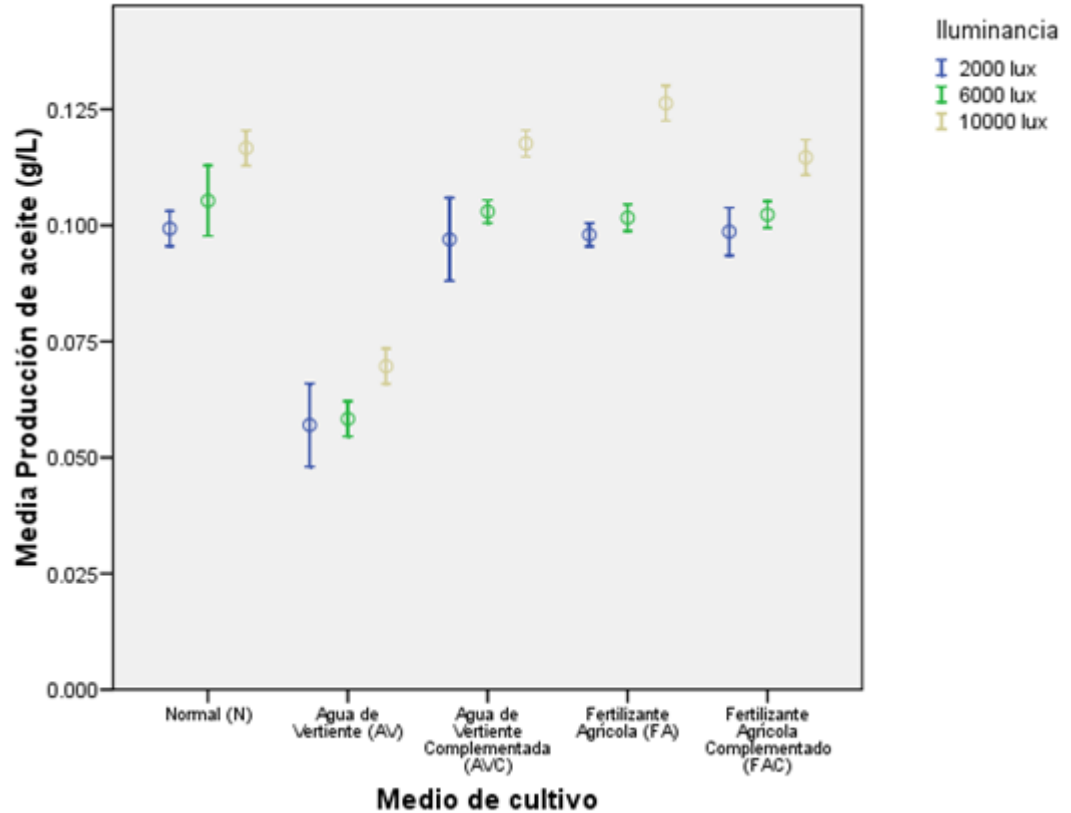


Figura 3.40.- Medias de Producción de Aceite (g.L<sup>-1</sup>) de *Botryococcus* sp. con intervalos de Diferencia Mínima Significativa.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Densidad celular máxima

Las cuatro microalgas crecieron en los cinco medios de cultivo evaluados, debido a que éstos contienen elementos como nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, sodio, hierro, manganeso, boro, zinc, entre otros, los cuales son nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas (*Richmond A., 2004*).

De acuerdo a las proporciones atómicas N:P óptimas para el crecimiento de microalgas de agua dulce, de 6-10 : 1 (*Wuang L. et al., 2009*) se observa que

las proporciones en los medios de cultivo Fertilizante Agrícola, Fertilizante Agrícola Complementado y Agua de Vertiente Complementado se encuentran dentro de ese rango lo que se evidencia en una mayor densidad celular del cultivo en *Chlorella* sp.

Además en *Chlorella* sp. se observa un aumento de la densidad celular en el medio Fertilizante Agrícola Complementado con relación al medio Fertilizante Agrícola evidenciando que los micronutrientes son un aporte importante para el crecimiento de *Chlorella* sp., como lo reporta Villalobos L. *et al.* (2004) en el crecimiento de *Isochrysis galbana*. También se identifica un aumento en la densidad celular proporcional al aumento de la iluminancia, siendo las mayores densidades a 10000 lux, resultados similares han sido obtenidos por Chao C. (2008) con *Chlorella vulgaris*. Los resultados obtenidos con *Chlorella* sp. son mayores que los obtenidos por Brito D. *et al.* (2006) en medios con el mismo fertilizante Nitrofoska.

La densidad celular máxima de *Nannochloropsis* sp. aumentó según la iluminancia, siendo las mayores a 10000 lux en el medio fertilizante agrícola, seguido de los medios agua de vertiente complementado y fertilizante agrícola complementado por lo que al analizar la proporción N:P (nitrógeno:fósforo) de los medios de cultivo se observa que solo el medio Normal con una proporción N:P de 24:1 se encuentra dentro del rango óptimo (16 - 24:1) para las especies de microalgas marinas (Corsini M. & Karydis M., 1990), sin embargo el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. en el medio de cultivo Normal fue menor que en el resto de medios de cultivo, con excepción del medio agua de vertiente, esto puede deberse a que el medio Normal, es decir, en este caso, el medio F/2 Guillard fue formulado para ser preparado con agua de mar, mientras que en este estudio se lo preparó con agua dulce destilada debido a la dificultad de obtener el agua de mar, esterilizar y ajustar su salinidad, lo que anuló el aporte de metales traza que aporta el agua de mar. Por otro lado, los medios Fertilizante Agrícola, Agua de Vertiente Complementado y Fertilizante Agrícola Complementado poseen proporciones N:P

de 6:1, el cual es un valor fuera del rango óptimo, lo que indica una limitación por nitrógeno, sin embargo el crecimiento no se vio afectado, probablemente porque tanto el nitrógeno como el fósforo se encuentran en cantidades suficientes, resultados similares de crecimiento adecuado fuera del rango óptimo de N:P han sido reportados por Sánchez H. *et al.*(2008) en *Nannochloropsis oculata*. Se puede mencionar que cuando los nutrientes se encuentran en exceso, la relación de suministro de N:P se vuelve irrelevante. Por otra parte, las tasas de absorción de los nutrientes pueden ser diferentes, lo que aclara que la relación entre ambiente no puede reflejar la relación celular que afecta a los procesos fisiológicos de crecimiento. Por lo tanto, las proporciones N:P se deben utilizar cuando sea posible (*Stevenson J. et al., 1996*).

*Botryococcus* sp. aumentó su densidad celular máxima proporcional a la intensidad de luz, al igual que *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp., este comportamiento ha sido reportado por Qin J. (2005) en el que *Botryococcus braunii* aumentó su densidad celular hasta una intensidad de luz aproximada de 17000 lux. Además de acuerdo a las proporciones N:P óptimas para microalgas de agua dulce (6-10 : 1), todos los medios de cultivo, a excepción del medio Agua de Vertiente, están dentro de este rango, por lo que independientemente de las concentraciones, los resultados obtenidos en cada intensidad de luz son estadísticamente iguales, por lo que es posible usar el medio de cultivo de menor concentración y obtener el mismo resultado que el de mayor concentración, lo que implica un ahorro en gastos de cultivo.

*Synechocystis* sp. aumentó proporcionalmente su densidad celular hasta 6000 lux siendo la máxima obtenida en el medio Fertilizante Agrícola el cual es estadísticamente igual al medio de cultivo Normal. A diferencia del resto de microalgas estudiadas, *Synechocystis* fue fotoinhibida a 10000 lux ocasionando una reducción en la densidad celular de la misma, ya que según Walstad D. (1999) entre 2427 – 3345 lux se dan condiciones de luz de saturación generando una tasa de crecimiento máxima constante en cianobacterias, este rango es

aumentado por Anderson S. & McIntosh L. (1991) hasta 5550 lux para *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, por lo que intensidades de luz mayores a ésta ocasionan efectos de fotoinhibición en el crecimiento de esta cianobacteria.

#### 4.2 Tasa de crecimiento

En *Chlorella* sp. la tasa de crecimiento aumenta proporcional a la iluminancia, siendo las mayores a 10000 lux, datos similares han sido reportados por Chao C. (2008) con *Chlorella vulgaris*, sin embargo manifiesta una mayor tasa de crecimiento en un medio de cultivo con urea como fuente de nitrógeno, a diferencia de este estudio en el que la mayor tasa de crecimiento se obtuvo en medio Normal ( $0,19 \text{ d}^{-1}$ ) con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, en el cual el amonio es asimilado con preferencia por los microorganismos (Richmond A., 2004), seguido del medio Fertilizante Agrícola que posee un 10% en peso de Nitrógeno del cual 1% P/P es nitrógeno nítrico, 0.5% P/P es nitrógeno amoniacal, y 8.5% P/P es nitrógeno ureico.

En *Nannochloropsis* sp. la tasa de crecimiento aumenta de acuerdo a la iluminancia, siendo mayores a 10000 lux específicamente en los medios que contienen el fertilizante agrícola en su composición lo que manifiesta que el nitrógeno ureico y amónico son de asimilación más rápida al igual que en *Chlorella* sp. de este estudio.

En *Botryococcus* sp. la tasa de crecimiento aumentó de acuerdo a la intensidad de luz, siendo las mayores a 10000 lux, sin embargo los valores más altos se consiguieron en el medio Agua de Vertiente, mientras que los más bajos se obtuvieron en los medios de cultivo que contenían al fertilizante agrícola en su composición, por lo que al parecer *Botryococcus* sp. tiene un crecimiento más lento a concentraciones elevadas de nutrientes. El valor más alto fue  $0,09 \text{ d}^{-1}$  en medio Agua de Vertiente a 10000 lux, el cual es mayor al reportado por Qin J. (2005) de alrededor de  $0,078 \text{ d}^{-1}$ , sin embargo reportó un valor de  $0.120 \pm 0,002 \text{ d}^{-1}$

<sup>1</sup> a un aproximado de 17000 lux, al igual que Lee S. et al. (1998) con una valor aproximado de 0,8 d<sup>-1</sup>.

En *Synechocystis* sp. la tasa de crecimiento aumenta hasta los 6000 lux en todos los medios de cultivo, a pesar que el nitrógeno amónico es la forma más rápida asimilable por parte de *Synechocystis* sp. (Drath M. et al., 2008) no se obtuvo valores elevados de tasa de crecimiento en los medios Fertilizante Agrícola y Fertilizante Agrícola Complementado que contienen este elemento. Además se observó que a los 10000 lux la tasa de crecimiento disminuye como efecto de la caída de la tasa fotosintética o fotoinhibición (Richmond A., 2004).

### **4.3 Biomasa**

Esta variable es proporcional a la densidad celular y a la iluminancia, siendo las mayores a 10000 lux en *Chlorella*, *Nannochloropsis* y *Botryococcus* y en los medios de cultivo que contuvieron el fertilizante agrícola en su composición.

En *Botryococcus* la concentración mayor de 0.84 g.L<sup>-1</sup> de biomasa es menor que los reportados por Dayananda C. et al. (2007) con una concentración aproximada de 1,2 g.L<sup>-1</sup>

*Synechocystis* sp. a diferencia de las tres microalgas presentó valores de concentración de biomasa mayores a una intensidad luminosa de 6000 lux y los más bajos a 10000 lux como consecuencia de la fotoinhibición.

### **4.4 Aceite**

En *Chlorella* sp., al igual que el resto de variables, la producción de aceite, aumentó proporcional a la iluminancia, siendo las mayores concentraciones a 10000 lux, con respecto al contenido de aceite (% P/P) el medio Fertilizante Agrícola presentó el mayor con una valor de 12 % ya que posee nitrógeno ureico como principal fuente de nitrógeno lo que va acorde a lo reportado por Chao C.

(2008) en *Chlorella vulgaris* siendo mayor al reportado por el mismo. Además el medio Fertilizante Agrícola Complementado tuvo un contenido de aceite máximo de 10,65 % lo que parece indicar que los micronutrientes añadidos a este medio de cultivo en comparación al medio Fertilizante Agrícola afecta negativamente a la producción de aceite la *Chlorella* sp. estudiada. El contenido de aceite 12 % P/P, es menor que el reportado por Rattanapoltee P. *et al.* (2008) en *Chlorella vulgaris*.

*Nannochloropsis* sp. obtuvo valores más altos de concentración de aceite a 10000 lux corroborando el trabajo de Chang W. (2005) en el que se obtuvo valores máximos hasta 14000 lux en *Nannochloropsis oculata*, siendo el mayor contenido de aceite 16,92% P/P en medio Fertilizante Agrícola seguido de Fertilizante Agrícola Complementado y Agua de Vertiente Complementado lo que al parecer el fertilizante agrícola favorece la producción de aceite como lo corrobora Valenzuela E. *et al.* (2004) en cultivos de *Rhodomonas* sp., este porcentaje de aceite es mayor al reportado por Purba E. & Taharuddin T. (2008) en *Nannochloropsis oculata* con 11,37 % de aceite.

*Botryococcus* sp. alcanzó valores más altos de concentración de aceite proporcional al aumento de iluminancia como lo reportado por Qin J. (2005) hasta un valor aproximado de 17000 lux, además con respecto al contenido de aceite, éstos fueron mayores en los medios de cultivo que contuvieron al fertilizante agrícola en su composición, siendo el valor más alto a una concentración de fertilizante agrícola de 1 mL.L<sup>-1</sup>, sin embargo se aprecia que si a esta concentración se le adiciona micronutrientes ocasiona una leve disminución en el contenido de aceite. De esta manera se identifica que el mayor contenido de aceite fue de 15,14 % P/P en medio de Fertilizante Agrícola, el cual es mayor al reportado por Dayananda C. *et al.* (2007) con *Botryococcus braunii* en los que obtuvieron concentración de aceite en el rango de 13 a 15 % P/P. Sin embargo otros estudios han obtenido mayor contenido de aceite como el reportado por Lee S. *et al.* (1998) con 32,2 % P/P hasta un 58 % por Tsukahara K. & Sawayama S.

(2005) en medio Chu 13, y aproximadamente 20 % por Dayanada C. *et al.* (2006) en medio con urea como fuente de nitrógeno.

En *Synechocystis* sp. la concentración de aceite aumentó ligeramente hasta los 6000 lux hasta un contenido máximo de 6,03 % P/P en el medio Normal, observándose una disminución, al igual que el resto de variables, a 10000 lux con un contenido máximo de aceite de 4,4 % P/P en el medio Agua de Vertiente, por lo que la fotoinhibición a más de afectar el crecimiento de *Synechocystis* también afectó la producción de aceite, posiblemente porque la mayor parte de energía de la cianobacteria en condiciones fotoinhedoras se destinan a reparaciones principalmente del fotosistema II (*Richmond A., 2004*).

Al comparar los mejores resultados de las cuatro microalgas evaluadas en este estudio, se puede determinar una productividad teórica mediante un supuesto cultivo semicontinuo con cosechas diarias (*tabla 4.1*). En la cual se observa que la mejor microalga con relación a la productividad de aceite es *Nannochloropsis* sp. con un valor de  $0,037 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , sin embargo este valor es menor a obtenidos en otros estudios como el de Sheng Y., *et al.* (2009) con *Nannochloropsis* que obtuvo una tasa de crecimiento de  $0.497 \pm 0.032 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  y  $0.151 \pm 0.021 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  de aceite que representa un contenido de  $30.7 \pm 2.4 \%$  P/P pero con aireación enriquecida con 2% de CO<sub>2</sub>, por lo que queda de manifiesto la importancia de analizar otros factores ambientales (ej: pH, % CO<sub>2</sub>, temperatura, salinidad, fuente de carbono, etc.) en el cultivo de estas microalgas con el fin de aumentar la productividad de aceite de las mismas.

*Tabla 4.1* Comparación de los mejores resultados de las cuatro microalgas evaluadas y planteamiento de un cultivo semicontinuo teórico.

	<b>Chlorella</b>	<b>Nannochloropsis</b>	<b>Botryococcus</b>	<b>Synechocystis</b>
Densidad celular máxima (cél.mL <sup>-1</sup> )	4391720	4504604	160676	5267996

Biomasa máxima (g.L <sup>-1</sup> )	1,36	1,1	0,84	0,52
Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	0,17	0,32	0,06	0,16
Aceite máximo (g.L <sup>-1</sup> )	0,162	0,187	0,126	0,031
Contenido de Aceite (% P/P )	11,97	16,92	15,14	6,03
Medio de Cultivo	FA	FA	FA	N
Iluminancia (lux)	10000	10000	10000	6000
<b>Cultivo semicontinuo teórico (cosechas diarias)</b>				
<b>Densidad celular cosechada (cél.mL<sup>-1</sup>)</b>	488126	896022	6545	552955
<b>Cultivo Cosechado (%)</b>	11,11	19,89	4,07	10,50
<b>Biomasa (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	0,15	0,22	0,03	0,05
<b>Aceite (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	0,018	0,037	0,005	0,003

Por lo tanto, la microalga ecuatoriana de la Provincia de Esmeraldas, *Nannochloropsis* sp. es una buena candidata para continuar con futuras investigaciones con el fin de optimizar su cultivo, producción y productividad de aceite y así proceder a un escalamiento piloto e industrial de su cultivo.

## 5. CONCLUSIONES

1. Cuatro microalgas con potencial de producción de aceite fueron aisladas e identificadas en las provincias ecuatorianas de Orellana (*Chlorella* sp.), Esmeraldas (*Nannochloropsis* sp.), Imbabura (*Synechocystis* sp.) y Pichincha (*Botryococcus* sp.).
2. El cultivo de las cuatro microalgas aisladas fue establecido a nivel de laboratorio en los medios de cultivo e iluminancias evaluados, identificándose la disponibilidad de usar medios de cultivo alternativos al normal o común de laboratorio con resultados igual o mejores para los cultivos de *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. y *Botryococcus* sp.
3. El contenido de aceite fue determinado de la biomasa seca de las cuatro microalgas aisladas en los diferentes medios de cultivo e iluminancias, observándose diferencias entre tratamientos, siendo *Nannochloropsis* sp. la



de mayor contenido con 16,92% P/P, seguido de *Botryococcus* sp. con 15,14 %, *Chlorella* sp. y *Synechocystis* sp. con 6,03 %.

4. El medio de cultivo y la condición de iluminancia óptimos para la producción de aceite de las cuatro microalgas fueron, para *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Botryococcus* sp. el medio de cultivo de Fertilizante Agrícola a 10000 lux, mientras que para *Synechocystis* sp. el medio Normal a 6000 lux.
5. Hubo un aumento en el crecimiento y producción de aceite proporcional a la iluminancia en las microalgas *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Botryococcus* sp., mientras que *Synechocystis* sp. (cianobacteria) presentó fotoinhibición a 10000 lux.
6. *Nannochloropsis* sp. se presenta como la mejor candidata en este estudio con una producción de aceite de  $0,187 \text{ g.L}^{-1}$  y una productividad teórica de  $0,037 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para continuar con la optimización de su cultivo para un futuro escalamiento del mismo.

## 6. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de otros factores que afectan el crecimiento y producción de aceite en las tres mejores microalgas como pH, fuentes de carbono, salinidad, temperatura y porcentaje de  $\text{CO}_2$ .
- Evaluar diversos tipos de cultivo ya que éstos también afectan al crecimiento y producción de aceite en las microalgas.
- Evaluar diversos usos para la biomasa sobrante de las microalgas, y diversos métodos de cosecha de biomasa y extracción de aceite a fin de escalarlos a escala piloto.

- Determinar y valorar los usos industriales del aceite de las microalga, ya sea alimenticio, salud o biocombustibles.
- Experimentar medios de cultivo orgánicos o residuales de otros procesos industriales a fin de hacerlo más amigable con el ambiente.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Albarracín I., (2007). XV Simposio Electrónico Internacional. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Microalgas: Potenciales Productoras De Biodiesel.

[Algae Aviation Fuel](http://www.algaeaviationfuel.com). (2010). Dry Process Algae Bio Jet Fuel. USA.  
www.algaeaviationfuel.com

Algaebase (2009). Nannochloropsis. www.algaebase.org

Anderson S. & McIntosh L. (1991). Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. Abstract. USA: Journal of Bacteriology; 173(9): 2761-2767.

Barsanti L. & Gualtieri P., (2006). Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Biodisol. (2008). Biocombustibles a partir de algas, future cercano y prometedor. España. www.biodisol.com

[Brito D.](#), [Milani N.](#), [Pereira G.](#), [González M.](#), [Morán R.](#) (2006). [Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska](#). Venezuela. [*Versión electrónica*]

Castillo G., (2004). Ensayos Toxicológicos y métodos de Evaluación de la Calidad de aguas (pp 25-30). Primera edición. México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.

Chao C. (2008). Production of biodiesel from microalgae. Taiwan: ELSEVIER. [*Versión electrónica*]

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. Palmerston North, Nueva Zelanda: ELSEVIER. [*Versión electrónica*]: 294–306

Chiu S., Kao C., Ta M., Ching S., Hsun C. & Sheng C., (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. Taiwan. [*Versión electrónica*]

Corsini M., Karydis M. (1990). An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. Journal of Applied Phycology.

D'andrea A., (2008). Biodiesel a partir de aceite de microalgas. Director de la Licenciatura en Biotecnología de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE). [www.bbc.com.uk](http://www.bbc.com.uk).

Dayananda C., Sarada R., Shamala T. & Ravishankar G., (2006). Influence of Nitrogen Sources on Growth, Hydrocarbon and Fatty Acid Production by *Botryococcus braunii*. Mysore, India. [Versión electrónica]

Dayananda C., Sarada R., Kumar V., Ravishankar G., (2007). Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. India: Electronic Journal of Biotechnology

Dimitrov K., Ph.D., (2007). GreenFuel Technologies: A Case Study for Industrial Photosynthetic Energy Capture. Brisbane, Australia. [Versión electrónica]

Drath M., Kloft N., Batschauer A., Marin K., Novak J., Korchhammer K., (2008). Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Alemania: American Society of Plant Biologists. [Versión electrónica]

FAO. (2008). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Tercera parte – Funcionamiento del criadero: cultivo de algas. [Versión electrónica]

FAO. (2009). Departamento de Pesca. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. CULTIVO DE MICROALGAS. [Versión electrónica]

González M., (2000). Alternativas en el Cultivo de Microalgas. Tesis de Grado. Universidad Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.

Hensyl W. (2000). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (pp: 385-386). Philadelphia, USA: Williams & Wilkins.

Instituto De Salud Pública De Chile. (2008). Subdepartamento Laboratorios Del Ambiente. Sección Química De Alimentos. Procedimiento Para Determinar Materia Grasa. Método Soxhlet.

Johnson M., (2009). Microalgal Biodiesel Production through a Novel Attached Culture System and Conversion Parameters. Tesis de Maestría. Universidad de Virginia Blacksburg, USA.

Komárek J. & Anagnostidis K. (1998): Cyanoprokaryota 1: Chroococcales (pp 548-549). Stuttgart, Alemania: Gustav Fischer.

Lee S., Kim S., Kim J., Kwon G., Yoon B., Oh H., (1998). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. Andong, Korea: Letters in Applied Microbiology. [Versión electrónica]

Lubián L., (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva *Eustigmatophyceae* marina. Cádiz, España. [Versión electrónica]

Martínez J., (2008). Superalgas. Bio Fuel Systems. [www.biopetroleo.com](http://www.biopetroleo.com).

Mendoza H., (2003), Aplicaciones de las microalgas. Instituto tecnológico de Canarias (ITC). [www.itccanarias.org](http://www.itccanarias.org).

Next Fuel. 2008. Biocombustibles. [www.biodiesel.com.ar](http://www.biodiesel.com.ar)

Ohse S., Bianchini R., Ávila R., Villela M., Cunha P., Pavan C., Estevão M., (2008). Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. Brasil: Biotemas. [*Versión electrónica*]

Prescott L., Harley J. & Klein D., (2002). Microbiología (pp. 614-625). Quinta edición. España: McGraw Hill Interamericana.

Purba E. & Taharuddin T. (2008). CO<sub>2</sub> reduction using microalgae *Nannochloropsis oculata* and production of oil algae. Indonesia. Bandar Lampung, Indonesia. [*Versión electrónica*]

Qin J. (2005). Bio-Hydrocarbons from Algae: Impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation. [*Versión electrónica*]

Raja R., Hemaiswarya S., Ashok N., Sridhar S., Rengasamy R. , (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. USA: Informa Healthcare. *[Versión electrónica]*

Rattapoltee P., Chulalaksananukul W., James A., Kaewkannetra P. (2008). Comparison of Autotrophic and Heterotrophic cultivation of microalgae as a raw material for Biodiesel production. Tailandia. *[Versión electrónica]*

Richmond A., (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Primera edición. USA: Blackwell Publishing

Sánchez H., Juscamaita J., Vargas J., Oliveros R. (2008). Producción de la Microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Lima, Perú. *[Versión electrónica]*

Serrano M., (2008). Combustibles fabricados a partir de aceite de algas. Almería, España: MKM. *[Versión electrónica]: 5-8.*

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J. & Roessler P., (1998). A look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae (pp 15-94). Golden, Colorado: A National Laboratory of the U.S. Department of Energy.

Sheng Y., Chien Y., Ming T, Seow C., Chiun H., Chih S. (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. Taiwan: Elsevier. [Versión electrónica]

Sieg D., (2008). Making Algae Biodiesel at home (pp 56-69). Bangkok, Tailandia: Copyright David Sieg.

Stevenson J., Bothwell M. & Lowe R., (1996). Algal Ecology: Fresh water Benthic Ecosystems. USA: Elsevier.

Tsukahara K. & Sawayama S (2005). Liquid Fuel Production Using Microalgae. Japan: Japan Petroleum Institute. [Versión electrónica]

Valenzuela E., Lafarga F., Millán R., Núñez F. (2004). Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. México: Ciencias Marinas. [Versión electrónica]

Venkataraman, L. & Becker, E. (1985). Biotechnology and utilization of algae. The Indian experience. Abstract. New Delhi, India.

Villalobos L. y Martínez P., (2004). Cultivo de la microalga marina *Isochrysis galbana* (variedad Tahití) utilizando diferentes fertilizantes agrícolas de uso doméstico. Santiago, Chile. [Versión electrónica]



Walstad D., (1999). Ecology of the Planted Aquarium: A practical Manual and Scientific Treatise for the Home Aquarist. Chapel Hill, North Carolina, USA: Echinodorus Publishing

Wang B., Li Y., Wu N. & Lan C., (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [*Versión electrónica*]

Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y., (2009). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. USA : Springer Science. [*Versión electrónica*]

Witford L. & Schumacher G., (1973). A manual of fresh- water algae in North Carolina. North Carolina: Sparks Press.