



**PRODUCCIÓN DE *Haematococcus pluvialis* EN UN BIORREACTOR
TECFERM DE 5 L EN MEDIOS DE CULTIVO RM Y BBM**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

INFORME FINAL
BOGOTÁ D.C., MAYO 2018



**PRODUCCION DE *Haematococcus pluvialis* EN UN BIORREACTOR
TECFERM DE 5 L EN MEDIOS DE CULTIVO RM Y BBM.**

YENI ANDREA LEITON ARCOS

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN, PhD

ASESORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

INFORME FINAL

BOGOTÁ D.C, MAYO 2018.

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino, a mi madre por su dedicación y cariño durante todo este proceso a mi hermano por su apoyo incondicional, a toda mi familia por su compañía.
A Cristian Jiménez por su amor, comprensión y guía para crecer cada día más profesional y personalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiar mis pasos en este proyecto, por brindarme sabiduría, y darme la fortaleza para seguir adelante cada día a pesar de las adversidades, por llenar mi vida de bendiciones y nunca permitir que perdiera mi camino.

Un agradecimiento especial a la docente Judith Elena Camacho Kurmen por su guía, apoyo y paciencia en la ejecución de este proyecto, porque sin ella no hubiera sido posible su culminación.

Agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a la Facultad de Bacteriología y Laboratorio por brindarme todo lo necesario para el desarrollo de la investigación,

Un agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron y guiaron para alcanzar mis metas propuestas desde el inicio de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
1 ANTECEDENTES	6
2 MARCO TEÒRICO	18
2.1 Microalgas.	18
2.2 Descripción de la Microalga <i>H. pluvialis</i>	19
2.2.1 Historia y Clasificación de la microalga <i>H. Pluvialis</i>	19
2.2.2 Ciclo celular de <i>H. pluvialis</i>	20
2.2.3 Morfología y fisiología	22
2.2.4 Composición de la Microalga <i>H. Pluvialis</i>	22
2.2.5 Aplicaciones de la microalga <i>H. pluvialis</i>	28
2.2.7 Factores de cultivo que afectan el crecimiento y la acumulación de metabolitos en microalgas.	32
2.2.8 Medios de cultivo	35
2.2.9 Sistemas de cultivo	37
2.2.10 Fotobiorreactores	38
2.2.11 Fermentador Tecferm de 5L	40
2.3 Microbiología predictiva	41
2.3.1 Modelos predictivos de crecimiento	41
3 DISEÑO METODOLÒGICO	44
3.1 TIPO DE ESTUDIO	44
3.2 HIPÓTESIS	44
3.3 VARIABLES	44
3.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	45
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSIÓN	59
6 CONCLUSIONES	65

Índice de tablas.

Tabla 1 Clasificación de <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Tabla 2. Composición de <i>Haematococcus pluvialis</i>	24
Tabla 3. Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas.....	27
Tabla 4. Ecuaciones estequiométricas de los diferentes metabolismos en las microalgas.....	31
Tabla 5. Composición de medio BBM.....	36
Tabla 6. Composición de medio RM..	37
Tabla 7. Modelos primarios y sus ecuaciones.....	42
Tabla 8. Composición de medio MES volvox.....	46
TABLA 9. Densidad celular en medio RM y BBM.....	51
Tabla 10. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.....	52
TABLA 11: Análisis de costos para producir 1L de medio RM y BBM....	57
Tabla 12. Cuadro resumen de los parámetros trabajados durante el estudio.....	58

Índice de figuras.

Figura 1. Ciclo celular <i>H. pluvialis</i>	21
Figura 2. Diferentes fases encontradas en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> . Fotos tomas por la estudiante.....	22
Figura 3. Estructura molecular de clorofila a y b.....	29
Figura 4. Diseños de sistemas de cultivo	38
Figura 5. Biorreactor airlift, biorreactor de columna.....	39



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

**PRODUCCIÓN DE *Haematococcus pluvialis* EN UN BIORREACTOR
TECFERM DE 5 L EN MEDIOS DE CULTIVO RM Y BBM**

RESUMEN

H. pluvialis es una fuente rica de astaxantina, carotenoides y ácidos grasos de interés en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, sin embargo, esta posee un crecimiento lento y complejo lo cual dificulta la obtención de una buena cantidad de biomasa. Es por esto que se propone como objetivo determinar las condiciones de cultivo para un crecimiento y producción de biomasa adecuados en cantidad y calidad de la microalga en el biorreactor Tecferm de 5L.

El cultivo se realizó bajo temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, agitación a 180 rpm, aire filtrado y pH de 6.8- 7.1 por un periodo de 21 días. Se determinó concentración celular, peso seco, contenido de clorofila, nitratos y fosfatos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de costos y un ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

El medio de cultivo con mayor crecimiento fue RM con 1.25×10^5 cel/mL. Se presentaron diferencias significativas para el contenido de fosfatos ($P < 0.05$), con excepción de crecimiento celular, contenido de clorofila y nitratos en los dos medios ensayados. El uso del biorreactor Tecferm 5L para el cultivo de *H. pluvialis* muestra que este proceso se puede realizar debido a que las células se mantuvieron en estado vegetativo.

Se concluye que el biorreactor Tecferm 5L obtuvo un buen crecimiento en especial con el medio RM en donde se encontró una velocidad de

crecimiento máxima de 0.040 cél/día, además el análisis de costos determinó que este medio tiene un costo menor

PALABRAS CLAVE: microalga, crecimiento celular, biorreactor, condiciones de cultivo, medios de cultivo.

Estudiante: Yeny Andrea Leiton Arcos

Asesor: Judith Elena Camacho Kurmen, PhD

INTRODUCCIÓN

H. pluvialis es una microalga de gran interés en áreas industriales, alimenticias, farmacéuticas, biotecnológicas, nutraceuticas, cosméticas y de combustibles debido a que se pueden obtener diferentes compuestos útiles como biocombustibles, antioxidantes y colorantes para alimentos.

La síntesis de estos compuestos químicos es un proceso costoso. Por esto el cultivo adecuado de la microalga será útil para la síntesis de sustancias de interés. *H. pluvialis* posee un ciclo de vida complejo encontrándose en él tres fases celulares en las que la microalga cambia su estructura morfológica y sus condiciones de crecimiento, entre estas fases encontramos 3 formas celulares, célula vegetativa, palmella y aplanospora

Este ciclo de crecimiento es lento y se necesita de las condiciones adecuadas sin que lleguen a afectar su ciclo biológico, su crecimiento, su cultivo y así no generar tasas de crecimiento bajas, ya que con un cultivo adecuado sería útil para obtener una biomasa en calidad y cantidad óptimas para los procesos en los que se utilice.

El desarrollo del cultivo se puede apoyar en el uso de tecnologías como los biorreactores y/o fotobiorreactores tubulares, lo cuales permiten utilizar condiciones controladas de pH, temperatura, concentración de aire o CO₂, agitación y esterilidad, con los cuales se espera que se incremente la producción de biomasa hasta niveles adecuados para ser utilizada en procesos biotecnológicos.

Lo cual resalta la importancia de desarrollar un cultivo donde se garanticen las condiciones de crecimiento adecuadas como suministro de micronutrientes y macronutrientes usando los medios de cultivo

recomendados por la literatura como el BBM y RM, para el mantenimiento de la fase vegetativa de la microalga sin que esta entre en fase de enquistamiento.

En este trabajo se utilizó el biorreactor Tecferm de 5 L, haciendo por primera vez el escalamiento de la producción de esta microalga en la universidad, para ser utilizado posteriormente, con las condiciones establecidas y ajustadas, para producir los diferentes metabolitos de interés.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biomasa adecuados en cantidad y calidad a partir de la microalga *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 litros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el cultivo de *H. Pluvialis* en el biorreactor de 5 litros utilizando medios de cultivo RM y BBM, bajo condiciones previamente establecidas.
- Evaluar la morfología de *H. Pluvialis* durante el cultivo en los diferentes medios ensayados.
- Determinar el medio de cultivo adecuado y las condiciones de crecimiento para una buena producción de biomasa de *H. pluvialis* en el biorreactor utilizado.

1 ANTECEDENTES

Las microalgas, organismos unicelulares, fotosintéticos, han adquirido importancia en la industria, química, farmacéutica, biotecnológica, alimentaria, ambiental y cosmetológica debido a su capacidad de producir metabolitos de interés, como carotenos, ácidos grasos, clorofila, además de servir como indicadores de contaminación en aguas residuales. (1)

Las microalgas se han utilizado a lo largo de la historia como fuente alimenticia. En la segunda mitad del siglo XX se inician las investigaciones en el área industrial para aprovecharlas en el área médica y nutritiva. A partir de la escasez alimenticia en los años 1935 y 1940 surge el interés de encontrar nuevas proteínas a partir de algas, esta fue la primera aplicación a nivel industrial (1).

Entre los compuestos de más interés obtenidos de las microalgas, destacan los carotenoides, biodiesel, ficobiliproteínas, lípidos, polisacáridos, y compuestos con actividad biológica provenientes de las especies más utilizadas tales como *Dunaliella sp*, *Spirullina sp* y *Porphyridium sp* además de *Chlorella sp*, y *Haematococcus sp* (2).

En los últimos años se han reportado aproximadamente 493 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre y otros animales. En países como Alemania, Perú, India, Japón y México, han registrado que algunas especies de microalgas son un excelente complemento alimenticio para el hombre. Por ejemplo, las harinas de *Spirullina sp* y *Scenedesmus sp* se caracterizan por su alto valor proteico y sin efectos tóxicos (3).

El estudio de la microalga *H. pluvialis* data del año 1797 donde Girod C inicia las primeras observaciones del género *Haematococcus*. Hacia el año 1844 Flotow describe por primera vez la especie *H. pluvialis*, en 1899 Herrick describe el ciclo de vida de la microalga, observando la alternancia entre células en reposo y células móviles (4).

Según la literatura se han llevado a cabo diferentes estudios a lo largo de la historia, analizando las condiciones más adecuadas para el cultivo de diferentes especies microalgares en espacios abiertos y cerrados, cuyo cultivo se realiza en fotobiorreactores.

En el año 2013 E.J. Rost y colaboradores estudiaron el desarrollo de un cultivo microalgar en un fotobiorreactor de burbujeo a escala piloto y geometría variable, esta característica permitió optar por dos variantes fluidométricas: flujo restringido con una capacidad de cultivo de 15L y flujo total con una capacidad de cultivo de 22 L, el ensayo se llevó a cabo con dos especies de microalgas, *Phaeodactylum sp*, *P. tricornutum* y *Tetraselmis sp*. La concentración de biomasa obtenida se determinó por técnica de turbidimetría y por peso seco. Para la microalga *P. tricornutum* se obtuvieron concentraciones de biomasa de 2 g/l y para *Tetraselmis sp*. La concentración de biomasa obtenida fue de 2.5 g/l, presentándose mayor velocidad de crecimiento en el cultivo con flujo restringido en el caso de las dos microalgas (5).

En cuanto a *H. pluvialis* se han llevado a cabo diferentes estudios para su crecimiento en diferentes medios de cultivo y bajo diferentes condiciones. A.S Cifuentes y colaboradores en 2003 realizaron el cultivo de *H. pluvialis* con el fin de descubrir las condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina. La microalga fue inicialmente cultivada en medio Bristol con las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura 23°C, intensidad de luz de 35 mmol m⁻²s⁻¹, fotoperiodo 16:8 (L:O), agitada

manualmente dos veces al día. El cultivo se llevó a cabo bajo condiciones autotróficas (con NaNO₃, NH₄Cl y urea) y condiciones mixotróficas (con acetato sódico 4, 8, 12 mM). Se estudiaron tres fuentes de nitrógeno para el crecimiento óptimo de la microalga: nitrato de sodio, cloruro de amonio y urea a una concentración de 2.9 mM, los cultivos se llevaron a cabo bajo dos diferentes densidades de flujo de fotones (35 y 85 mmol m⁻²s⁻¹), con una temperatura de 23 ± 2 °C, con agitación dos veces al día, con un pH de 6.0, la densidad celular inicial fue de 2x10³ cel/ml. El cloruro de amonio resulto ser la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de esta cepa, alcanzando una densidad celular de 2.0x10⁵ y 2.5x10⁵ cél/ml y pesos secos de 228.0 y 257.5 mg/L a 35 y 85 mmol m⁻² s⁻¹, respectivamente. (6)

En el año 2004 Tsang S describe una estrategia para optimizar la producción de *H. pluvialis* a escala industrial en el biorreactor MGM con el fin de maximizar la absorción de CO₂ presente en el ambiente, obteniendo biomasa celular de 6.81x10¹⁰ g y 1.01x10¹⁰ g. Este estudio demostró una vez más la utilidad del cultivo de la microalga, no solo para utilizarla como fuente de metabolitos, también es de gran utilidad debido a su capacidad de captar CO₂, ayudando así a mejorar las condiciones ambientales (7).

En el año 2006 M.C. García *et al* realizan un análisis comparativo en el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en dos reactores diferentes, un reactor tubular de transporte aéreo y un reactor de columna de burbujas, ambos con una capacidad de 55 L, utilizando como medio de cultivo, medio inorgánico libre de acetato. Los cultivos se llevaron a diferentes concentraciones de nitratos, irradiaciones y tiempos de cultivo transcurridos para obtener diferentes tipos de células. Para este fin se utilizaron 8 cultivos diferentes a escala de laboratorio. El número de células en los diferentes cultivos se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer, la concentración de biomasa se determinó

mediante mediciones de peso seco y se determinó el contenido de clorofila mediante el método de Mackinney. (8)

Finalmente, la concentración de biomasa obtenida osciló entre 0.25 y 3.33 g/L, la densidad celular de los cultivos osciló entre $0,46 \times 10^6$ y $3,94 \times 10^6$ cel/ml, mientras que el contenido de clorofila y carotenoides osciló entre 1,12 y 5,90 % en peso y de 0,24 a 2,00% d.w.t (tonelaje de peso muerto), en este trabajo se demostró un mejor crecimiento en reactores tubulares, y se demostró que la concentración de nitratos en los medios debe mantenerse superior a 5Mm (8).

En el año 2009 González M llevo a cabo el estudio comparativo en el crecimiento de cuatro cepas diferentes de *H. pluvialis* aisladas de diferentes microhábitats de dos regiones geográficas de Chile, para los ensayos las cepas se cultivaron en medio Bristol en condiciones autotróficas y mixotróficas, el crecimiento celular se monitoreo mediante recuento celular usando cámara de Utermöhl de 1 ml, en este estudio se demostró que las diferentes concentraciones de acetato, la intensidad de luz y la concentración de las cepas interactuaban significativamente. La cepa CCM-UDEC 022 mostro la densidad celular más alta ($4,4 \times 10^5$ cel/ml) bajo condiciones autotróficas, por otro lado, la cepa CCM-UDEC 023 mostro la densidad celular más alta ($1,2$ a $1,3 \times 10^5$ cel/ml) bajo condiciones mixotróficas. Bajo este estudio se encontró variabilidad fisiología en las cuatro cepas estudiadas, así se encontró que la cepa CCM-UDEC 023 resulto capaz de crecer en condiciones mixotróficas mejorando las perspectivas para el cultivo comercial en latitudes más altas, ya que el cultivo de *H. pluvialis* a gran escala en la mayor parte del mundo se realiza bajo condiciones autotróficas (9).

En el 2011, Choi Yoon *et al* analizaron el crecimiento y producción de astaxantina en fotobiorreactores equipados con diferentes extensiones

lumínicas internas y sugirieron un proceso de múltiples etapas para facilitar la producción de astaxantina, La microalga fue cultivada en medio OHM (optime *Haematococcus* médium). Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron frascos de 250 ml con 100 ml de medio, el cultivo se agito a 180 rpm y se mantuvo a una temperatura de 22°C. Se burbujeó aire en el cultivo del matraz junto con agitación con el fin de suministrar suficiente aireación. Se suministró iluminación continua a una intensidad luminosa media de $50 \text{ E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con tubos fluorescentes blancos cálidos de 20 vatios. La inoculación se realizó extrayendo 200 ml del cultivo de siembra en el medio e inoculando directamente en 5 l de OHM para el funcionamiento del fotobiorreactor. Se construyó un fotobiorreactor con iluminaciones internas para aprovechar la distribución eficiente de la luz, el número de células se determinó por conteo en cámara de Neubauer, y el peso seco se midió filtrando una alícuota de suspensión de algas a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa. (10)

El fotobiorreactor construido fue operado con diferentes extensiones lumínicas y con un suministro de 5% de CO₂, el cultivo se llevó a cabo con 1, 2 y 7 tubos fluorescentes obteniéndose $5.5 \times 10^5 \text{ cel/ml}$ con un tubo, el número de células se redujo cuando aumento la intensidad lumínica, obteniendo $2.5 \times 10^5 \text{ cel/ml}$ con dos tubos y $1.3 \times 10^5 \text{ cel/ml}$ con siete tubos fluorescentes. En base a estos datos se determinó que el número celular se correlacionó inversamente con la intensidad de luz, debido posiblemente a la inhibición de la luz en las divisiones celulares. (10)

Sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios en el crecimiento basado en el peso seco, se encontró el mayor peso seco (2.5 g/L) utilizando dos tubos fluorescentes, se obtuvo un peso seco de 1.2 g/L con un tubo y 1.5 g/L con siete tubos. Se propuso que la inhibición del crecimiento por altas intensidades de luz utilizando siete tubos representa una menor productividad en la biomasa, por tanto se comparó el

crecimiento de la microalga tomando el número de células para las producciones de biomasa, utilizando una unidad de medida diferente (g/cel), se determinó así que el peso seco por célula de la microalga es proporcional a la intensidad de luz, aproximadamente $0,022 \times 10^7$ g/cel de un tubo fluorescente, $0,1 \times 10^7$ g/cel de dos tubos fluorescentes y 0.1154×10^7 g/cel de la operación del fotobiorreactor utilizando siete tubos fluorescentes. Se propuso que este fenómeno se daba por la transformación gradual de las células de *H. pluvialis* en células enquistadas grandes y pesadas para tolerar condiciones de estrés causadas por la exposición de alta irradiancia. (10)

En el mismo año Tocquin Pierre *et al* buscaron un medio de cultivo de bajo costo y que permitiera optimizar el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en su etapa vegetativa basado en el uso de un fertilizante hidropónico de tres componentes, con los cuales se varió la composición de los medios utilizando diferentes relaciones de los tres componentes. Los cultivos fueron iluminados continuamente por lámparas fluorescentes Phillips Master TL5 HO 54W / 827 con una intensidad de luz fue de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la temperatura se mantuvo a 25°C . La densidad celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer, así mismo se analizó la concentración de pigmentos por técnicas espectrofotométricas. Para la selección del medio óptimo de crecimiento, realizaron un método ciego en el cual prepararon 18 medios mezclados los tres componentes del fertilizante hidropónico, cada medio de cultivo fue inoculado con una concentración de 2×10^4 cel/mL, las microalgas fueron cultivadas en luz continua a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 9 días. Entre los 18 medios estudiados, se registró una densidad celular máxima de 1×10^6 células mL^{-1} , en medio M1B5 en el día 9. M1B5 fue el único medio que permitió mantener las células en la etapa verde y móvil después del día 9. (11)

Para el 2013 Ramírez estudia las condiciones óptimas de crecimiento y producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis*, diseñando un fotobiorreactor de tipo airlift y evaluando 5 medios de cultivo (BBM, BG11, OHM, F1, y BBM: BGM). La concentración celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer y peso seco, se encontró que la microalga llegó a la fase exponencial a los 8 días de cultivo con un día de adaptación. En la evaluación de los medios de cultivo no se encontró diferencias estadísticas en la velocidad específica de crecimiento. El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento es el OHM (0.536 días⁻¹), con una densidad máxima de 4.16×10^5 cel/ml, el medio BG11 por otro lado solo alcanzó una velocidad específica de crecimiento de 0.463 días⁻¹ y una densidad celular de 4.02×10^5 cel/ml. (12)

Al analizar la productividad de biomasa se encontró que el medio con menor producción de biomasa fue el medio BG11:BBM y los medios de cultivo de mayor rendimiento fueron BBM y OHM, Se estableció que el medio más apropiado para el cultivo de *H. pluvialis* es el BBM debido a que es un medio autotrófico además de no requerir vitaminas y ser más económico, facilitando su uso a escala de laboratorio. (12)

En el mismo año Galvao R *et al* estudian la producción de biomasa en *H. pluvialis* analizando dos parámetros que afectan el crecimiento de la microalga, la intensidad de luz durante el cultivo y el pH presente en el medio. Los experimentos fueron llevados a cabo en fotobiorreactores de placa plana utilizando el medio de cultivo Rudic (RM). El incremento en la biomasa microalgar fue cuantificado usando el método de conteo celular en cámara de Neubauer. La evaluación del crecimiento microalgar se realizó bajo dos modelos diferentes, en el primero, denominado modelo exponencial donde se consideró una intensidad de luz que osciló entre 2000 y 10000 lux y el segundo un modelo autorregresivo no lineal basado

en una red neural artificial, en el cual se describe el comportamiento del pH durante el crecimiento de la microalga a diferentes intensidades de luz, se encontró que a mayores intensidades lumínicas se produce una menor concentración de biomasa ya que con una intensidad lumínica de 10000 lux la biomasa obtenida fue de 60.476 cel/mL mientras que la biomasa obtenida a 2000 lux fue de 136.265 cel/mL, según el autor las intensidades de luz mayores generan en las células la tendencia a producir pigmentos, retrasando su crecimiento (13).

En 2013 Sipaubá Tavares *et al* compararon la tasa de crecimiento y los diferentes parámetros de los medios de cultivo bajo dos volúmenes diferentes (13 L y 250 L). Para analizar los efectos de los diferentes volúmenes sobre el crecimiento de la microalga sobre el crecimiento de *H. pluvialis*, se utilizó un medio WC, el cultivo se llevó a cabo en volúmenes de 13 L y 250 L con burbujas de aire continuo a 23 ± 2 ° C, se aplicó iluminación continua a una intensidad de luz promedio de 94,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 13-L y 184,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 250-L. La luz provino de lámparas fluorescentes blancas frías para observar la transformación de células vegetativas a quistes. (14)

El crecimiento celular de la microalga se determinó cualitativamente por conteo celular, densidad óptica, peso seco, cantidad de clorofila-a, contenido total de carbono orgánico y midiendo directamente los nutrientes de los medios. El crecimiento de células vegetativas fue mayor cuando se cultivaron en 13-L con 1.33×10^5 cells.mL⁻¹ en el día 12 que cuando se cultivaron en 250-L. En este estudio se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el cultivo de agua de *H. pluvialis*, con la excepción del peso seco, nitritos y amoníaco entre los volúmenes. Los datos obtenidos en este estudio demostraron que para un buen cultivo de *H. pluvialis* en condiciones de laboratorio este debe realizarse en un

volumen de 13 L. La luz jugó un papel importante en el rendimiento directo de *H. pluvialis* en las condiciones biológicas de las algas. (14)

Además del cultivo de *H. pluvialis* en diferentes sistemas de foto biorreactores tanto abiertos como cerrados, Wenduo Zhang y otros en el año 2014 evalúan el crecimiento de la microalga y la producción de astaxantina en un nuevo sistema de cultivo denominado “cultivo unido” en el que las células de las microalgas se fijan sobre materiales de alta densidad separándose en gran medida del medio líquido, mejorando su crecimiento y producción de biomasa microalgar, adicionalmente en este estudio se evalúan parámetros primarios de crecimiento como intensidad de luz, concentración de nitrógeno, densidad de inoculación, entre otros con el sistema de cultivo unido. (15)

En este estudio se utilizó el medio BG-11, utilizando dos estrategias de cultivo, para la obtención de células verdes, la microalga se cultivó en columnas de vidrio esterilizado que contenían 7 L de inóculo de algas, las microalgas verdes fueron utilizadas para el cultivo unido, denominado “etapa roja”. El crecimiento fue evaluado por el método gravimétrico, la concentración de nitratos en medio fue medida por espectrofotometría. Se determinó la densidad inicial óptima de biomasa a una intensidad de luz de 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ los resultados mostraron que la productividad de biomasa fue más alta con 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un valor máximo de $6.6 \pm 0.01 \text{ gm}^{-2} \text{ d}^{-1}$. La luz y el nitrógeno son los factores más importantes que afectaron significativamente los comportamientos de las células de microalgas cultivadas en condiciones fotoautótrofas. Bajo las intensidades de luz 0–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ la productividad de biomasa tuvo un aumento de $0,36 \pm 0,15$ a $4,85 \pm 0,28 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y luego aumentó gradualmente hasta $7,06 \pm 0,14 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ a una intensidad luminosa de 80-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (15)

En el mismo año Infant Santhouse y otros cultivaron la microalga *H. pluvialis* y desarrollaron un fotobiorreactor de doble región utilizado para simplificar el crecimiento celular y la producción de astaxantina, El crecimiento de la microalga se llevó a cabo en medio BBM modificado manteniendo intensidad de luz tenue y administración suficiente de nitratos para lograr el crecimiento de células vegetativas, por otro la se utilizó iluminación excesiva y concentraciones insuficientes de nitratos para la producción de astaxantina. La fase vegetativa fue obtenida a los 26 días de incubación. Se concluyó finalmente que el fotobiorreactor de doble región resulta ser útil para el crecimiento y la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* así mismo se determinó que esta nueva cepa requiere 12:12 horas de luz y oscuridad para un crecimiento vegetativo alto (1.095 OD a 690 nm), la biomasa, producción de pigmento y carotenoides obtenidos fueron los siguientes respectivamente, 125.7 mg L⁻¹, 10.39 µg mL⁻¹, 15.49 µg mL⁻¹. (16)

Sipaùba L *et al* en el año 2015 estudiaron el crecimiento de *H. pluvialis* Flotow en dos medios alternativos, NPK y M+NPK comparando su crecimiento con el medio comercial WC, el crecimiento celular fue monitoreado por cuantificación en cámara de Neubauer y por peso seco, los resultados arrojados por este estudio mostraron una diferencia significativa con respecto al crecimiento celular a una intensidad de luz de 20 µmol.m-2s-1, La concentración de células durante este período alcanzó el valor máximo de 1,5×10⁵ cel/mL-1 en medio de cultivo M+NPK en los días 11 y 13 de cultivo, después de los cuales disminuyó ligeramente. Por otra parte, las concentraciones celulares en los medios WC y NPK fueron más bajas, que van de 0,4 × 10⁵ cel/mL-1 y 1,08 × 10⁵ cel/mL-1 y entre 0,55 × 10⁵ cel/mL-1 y 1,5 × 10⁵ cél/mL-1, el 5º día y el 13º día, respectivamente. (17)

El crecimiento celular a una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ llegó al valor máximo de $2.15 \times 10^5 \text{ cél}/\text{mL}^{-1}$ en medio de cultivo NPK en el día 20. la concentración celular fue significativamente menor en el medio WC en comparación con los medios alternativos NPK y M+NPK bajo las mismas condiciones de cultivo, el medio en el cual se obtuvo el mayor recuento celular fue el medio NPK $5.44 \times 10^5 \text{ Cel}/\text{mL}$ a una intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, se estableció que la intensidad de luz afectó la densidad celular. La eficiencia de los medios alternativos se explicó por su alto contenido de fosfato el cual condujo a efectos beneficiosos sobre el crecimiento celular de la microalga. Este trabajo determinó que los mejores resultados se obtuvieron con los medios NPK y M + NPK a una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. (17)

En el mismo año Granada P evaluó las condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina de la microalga utilizando tres medios de cultivos en base a fertilizantes, medio nitrofoska foliar el cual contiene nitrógeno, magnesio, fósforo, manganeso, azufre, cobre, zinc, boro, hierro y molibdeno, medio algaezim que además de los componentes anteriores posee potasio, calcio, cobalto silicio, bario, estaño, talio, níquel y antimonio y medio fuerza verde el cual se compone de materia orgánica, tiamina, riboflavina, ácido orgánico, extractos húmicos, triptófano entre otros. (18)

El crecimiento celular se determinó por peso seco y evaluación de turbidez por espectrofotometría, se encontró que el medio nitrofoska obtuvo una turbidez mayor con respecto a los otros medios evaluados con un promedio de 1.083 de absorbancia, el medio fuerza verde mostró una absorbancia de 0.577 y el algaezim mostró una absorbancia de 0.687, en cuanto a la biomasa obtenida, el promedio más alto de biomasa producida fue 0.50 g en medio nitrofoska y el más bajo fue 0.009 g en medio fuerza verde. se determinó por tanto que el medio más adecuado

para la producción de biomasa y astaxantina de *H. pluvialis* es el medio nitrofoska y que la agitación constante de cultivo permite un mejor crecimiento ya que los nutrientes se distribuyen de mejor manera (18).

Para el mismo año Niño C y Rodríguez F, evaluaron las condiciones de crecimiento celular en el cultivo de *H. pluvialis*. En este trabajo evaluaron diferentes medios de cultivo (BBM, OHM y RM) el cultivo se llevó a cabo en biorreactores de 500 mL los cuales contenían 350 mL de medio y 1×10^4 cel/mL de inóculo, las condiciones de cultivo que se emplearon fueron CO₂ al 5%, fotoperiodo 16:8 luz:oscuridad, iluminación 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ y pH de 6.7 a 7.0. Los resultados mostraron que la mayor densidad celular obtenida se generó en el medio RM con $7,5 \times 10^5$ cel/ml en el día 36. (19)

En el 2016 Zhang L y colaboradores evaluaron los cambios fotosintéticos y de fotoprotección durante la transformación celular y producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis*, el estudio se realizó en un fotobiorreactor tubular utilizando el medio MCM. El cultivo se llevó a cabo al aire libre, con una temperatura media diaria de 17 y 21°C y una intensidad de luz alrededor de $2300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ al mediodía. En los fotobiorreactores tubulares al aire libre las células de la microalga sufrieron un cambio morfológico a lo largo del tiempo, las células móviles verdes perdieron sus flagelos luego se transformaron en células más grandes, no móviles durante los tres primeros días de incubación (fase de transformación celular). El contenido de clorofila aumentó gradualmente con el tiempo durante los primeros siete días de incubación, pero disminuyó ligeramente después de siete días de incubación, se determinó que la luz de medio día causaba una fotoinhibición en el crecimiento celular, por tanto, para el cultivo masivo de biomasa en la microalga resulta más efectiva la sombra, la cual da protección a células verdes flageladas (20).

2 MARCO TEÒRICO

2.1 Microalgas.

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos, altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilización de energía solar para la producción de biomasa. Estos microorganismos se desarrollan a partir de materia inorgánica, sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica (21). Las microalgas son consideradas como la forma más primitiva de las plantas, sin embargo, estas poseen una capacidad 4 veces mayor para transformar la energía luminosa en energía química (18).

Según su fuente de carbono las microalgas se pueden dividir en:

- **Fotoautòtrofas:** Obtienen energía a partir de luz solar y carbono de compuestos inorgánicos.
- **Foto heteròtrofas:** Obtienen energía a partir del sol y utilizan materia orgánica como fuente de carbono.
- **Mixotròficas:** Capaces de crecer bajo condiciones autótrofas y heteròtrofas, así estas especies obtienen energía a partir de luz y materia orgánica y el carbono es obtenido de compuestos orgánicos y de CO₂.

- **Heterótrofas:** Obtienen energía y fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos, así algunas microalgas pueden desarrollarse en ausencia de luz (21).

2.2 Descripción de la Microalga *H. pluvialis*

Es una microalga verde unicelular también conocida como *como H. lacustris* o *Sphaerella lacustris* del orden Volvocales y familia *Haematococcaceae* (ver tabla 1), es un alga biflagelada móvil en condiciones óptimas (22,11). Suele encontrarse en aguas dulces preferiblemente frescas, sin embargo, también puede encontrarse en sedimentos de aguas estancadas (23).

2.2.1 Historia y Clasificación de la microalga *H. Pluvialis*

En 1797 se realizaron las primeras observaciones de la microalga *H. pluvialis* por por Girod-Chantrons, Flotow en el año 1844 realiza las primeras descripciones y posteriormente en el año 1851 Braun completo las descripciones agregando algunos detalles y corrigiendo errores de las anteriores observaciones; Herrick en 1899 describió su ciclo de vida y señaló que dentro del ciclo de vida la microalga se alternaría entre células móviles y células en reposo; En 1899 Hazen describe de manera extensa el ciclo de vida de *H. pluvialis*, describió a la microalga como una costra adherida de color rojo sangre a piscinas o urnas y cerca al mar. (19)

La naturaleza química de la coloración roja producida por la microalga era desconocida y en ese momento fue denominada con el nombre de "hematocrom", compuesto que en la actualidad es conocido como astaxantina. Peebles describió de forma más detallada el ciclo de vida de la microalga con dibujos detallados de los cambios que se producían en ella. En 1934 Elliot agregó detalles de la morfología celular, durante su ciclo de vida describió 4 tipos celulares, microzoides, macrozoides

flagelados, palmellas no móviles y hematoquistes que se describieron como glóbulos rojos grandes con una pared celular resistente, se describió que los macrozooides predominaban en cultivos con suficientes nutrientes, pero cuando las condiciones ambientales eran desfavorables se producía la etapa de palmella seguida por los hematocitos. Posteriormente después de estar expuestos a un ambiente favorable los hematocitos dan lugar a microzooides móviles que pueden crecer en etapas palmeloides o macrozooides. (19)

PHYLLUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GENERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>Pluvialis</i>

Tabla 1: Clasificación taxonómica *H. pluvialis* (19)

2.2.2 Ciclo celular de *H. pluvialis*

H. pluvialis presenta un ciclo con diferentes formas celulares, en general presenta tres morfologías diferentes dependiendo de los estímulos ambientales, A: vegetativa (verde, biflagelada), B: palmella (verde, esférica, sin flagelos) y C: aplanòspora (roja, roja esférica sin flagelos) la cual produce astaxantina ante estímulos de estrés (ver figura 1).

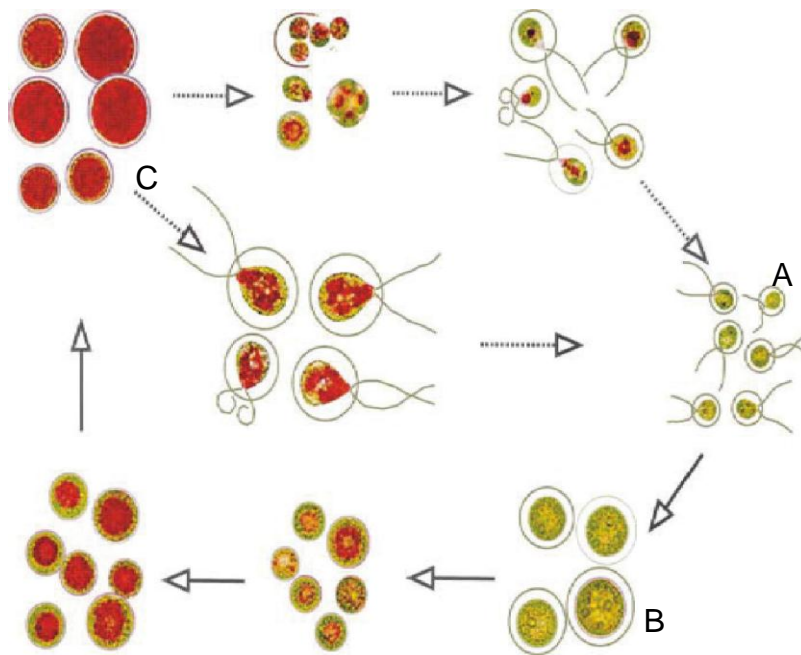


Figura 1: Ciclo celular *H. pluvialis* (22)

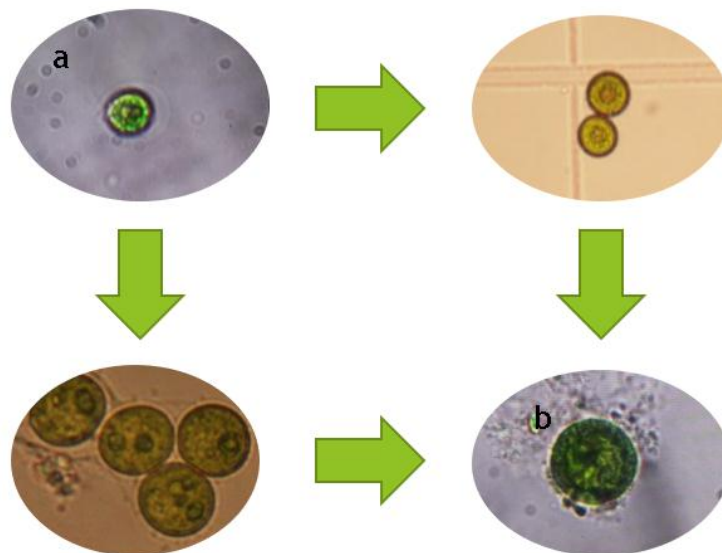


Figura 2: Diferentes fases encontradas en el cultivo de *H. pluvialis*. Fotos tomas por la estudiante.

En la figura 2 se pueden observar las diferentes células que hacen parte del ciclo celular de la microalga, durante el cultivo se pudieron observar células flageladas (a) y aplanosporas (b).

2.2.3 Morfología y fisiología

En condiciones favorables de un cultivo la microalga se compone de células vegetativas flageladas, las cuales presentan forma esférica o elipsoidal, poseen flagelos caracterizados por tener una longitud igual y un solo cloroplasto en forma de copa, las células biflageladas poseen una pared delgada. En condiciones favorables las células poseen clorofila a y b y carotenoides primarios como luteína, violaxantina, zeaxantina y neoxantina. (19)

Las células flageladas tienen la capacidad de parar la división celular después de haber realizado este proceso 5 veces, posterior a esto células denominadas zoosporas dejan de dividirse, se produce fusión celular y el ADN se duplica, a continuación, las células pierden sus flagelos produciendo una forma esférica no móvil. (19)

En condiciones de estrés la microalga produce cambios morfológicos y fisiológicos, modificando así el proceso fotosintético. Se genera la producción de aplanosporas de gran tamaño, durante la transformación a células inmóviles se forma una vaina trilaminar la cual confiere resistencia ante la acetólisis, por último, se genera una gruesa pared secundaria. Mediante todos los cambios morfológicos se da la producción de carotenoides secundarios como la astaxantina. (ver tabla 3) (19)

2.2.4 Composición de la Microalga *H. Pluvialis*

La composición bioquímica de la microalga consiste en proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, carotenoides y minerales (ver tabla 2). (24)

COMPUESTO	CONCENTRACION
PROTEINAS (%)	27.16
CARBOHIDRATOS (%)	40
GRASAS (%)	21.22
HIERRO (%)	1.0
MAGNESIO (%)	1.4
CALCIO (%)	3.3
BIOTINA (mg/lb)	0.665
L-cartina (ug/g)	12
ACIDO FOLICO (mg/100g)	1.48
NIACINA (mg/lb)	35.2
ACIDO PANTOTEICO	10.57
VITAMINA B1 (mg/lb)	4.81
VITAMINA B2 (mg/lb)	9.36
VITAMINA B6	4.5

(mg/lb)	
VITAMINA B16 (mg/lb)	0.912
VITAMINA BC (mg/lb)	82.7
VITAMINA BE (mg/lb)	333

Tabla 2: Composición bioquímica *H. pluvialis* (24)

- **Proteínas:**

En condiciones de crecimiento favorables las proteínas constituyen el 29-45 % del contenido celular, se calculó que en la fase de enquistamiento el contenido proteico de la microalga es de 17-25 % aproximadamente. Según los aminoácidos que componen estas proteínas, se cree que las proteínas se componen principalmente de ácido aspártico, ácido glutámico, alanina y leucina con un contenido total de aminoácidos de 10.02/ 100 mg de los cuales 46 % pertenecen a aminoácidos esenciales. (25)

- **Carbohidratos**

En su etapa verde el contenido de carbohidratos alcanza el 15-17 %, en condiciones de estrés la microalga acumula altos contenidos de carbohidratos alcanzando 36-40 % del contenido celular. Bajo prolongadas condiciones de estrés el almidón es consumido en la célula. (25)

- **Lípidos**

El contenido total de lípidos en condiciones favorables de crecimiento varía de 20-25% con aproximadamente 10% de lípidos compuestos por ácidos grasos poliinsaturados cortos depositados en los cloroplastos. Los lípidos neutros son la clase de lípidos que predominan en ambos estadios (verde y rojo). En la etapa roja, bajo condiciones de

estrés prolongado la microalga produce un flujo mayor para proteger la síntesis de lípidos-triacilgliceroles (TAG). (25)

- **Carotenoides**

Los carotenoides que componen la microalga son principalmente, luteína (75-80%), b-caroteno (10-20%) y otros, incluyendo clorofila a y b, carotenoides primarios, violaxantina, neoxantina, lactucaxantina y zeaxantina. En estados de estrés, el contenido total de carotenoides se incrementa notablemente, y el patrón carotenoide primario característico de la etapa vegetativa es reemplazado por carotenoides secundarios, principalmente astaxantina con un acumulo de 80-90% de los carotenos totales. (25)

La proporción de carotenoides a clorofilas es de aproximadamente 0,2 en la etapa verde y aumenta en la etapa roja alcanzando aproximadamente 2-9. La mayoría de la astaxantina no se deposita en su forma libre, sino que existe dentro de la célula como ésteres de ácidos grasos de astaxantina, usualmente mono o diésteres de ácido palmítico, oleico y orlinoleico. Este tipo de modificación es necesaria para la deposición de esta molécula altamente polar dentro de la matriz no polar de lípidos. (25)

En las células rojas maduras de *H. pluvialis* se encuentran presentes aproximadamente 70% de monoésteres, 25% de diésteres y solo 5% del cetocarotenoide libre. Bajo ciertas condiciones de estrés se ha demostrado que *H.pluvialis* acumula hasta un 3-5% de astaxantina. (25)

- **Clorofila**

Familia de pigmentos color verde presentes en cianobacterias y en aquellos microorganismos que contienen cloroplastos, estos pigmentos son esenciales en el proceso de fotosíntesis en el cual los

microorganismos absorben energía a partir de la luz solar. (26) Su color verde se debe a la capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar, transmitiendo diversos colores cuya mezcla producen diferentes tonos verdes. Cuando una molécula de clorofila capta un fotón de luz, un electrón pasa de su estado basal a otro excitado, de mayor nivel energético. Este estado excitado de la clorofila es estable por muy poco tiempo (10^{-9} seg.) e inmediatamente pueden suceder una de estas tres transiciones: transferir la energía a otra molécula de clorofila y así sucesivamente hasta que se alcanza el centro de reacción del fotosistema correspondiente (PSI o PSII) y el electrón pueda ser utilizado en el proceso fotoquímico, retornar a su nivel básico emitiendo la energía en forma de calor y no emitiendo ningún tipo de fotón, o en lugar de volver a su estado básico emitiendo calor emitir un fotón de mayor longitud de onda que la absorbida en un proceso que se conoce como fluorescencia. La mayor parte de la fluorescencia que es emitida por la clorofila proviene de la clorofila a del PSII. (27)

- **Estructura molecular de la clorofila**

Las moléculas de clorofila consisten en un anillo de tetrapirrol el cual contiene un átomo de magnesio central y un alcohol terpenoide de cadena larga. Estas moléculas se encuentran unidas no covalentemente a apoproteínas. Estructuralmente, los diversos tipos de moléculas de clorofila, a, b, c y d difieren en sus sustituyentes de grupos laterales en el anillo de tetrapirrol, así la clorofila a (verde azulada) presenta un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 3, y la b (verde amarillento) un grupo aldehído (-CHO) en la misma posición. Los diferentes tipos de clorofila poseen dos grandes bandas de absorción principales: azul o verde azulada (450-475

nm) y rojo (630-675 nm), lo que da como resultado su característico color verde. La clorofila a está presente en todos los organismos fotoautótrofos como parte de los complejos nucleares (ver figura 3). (28, 29)

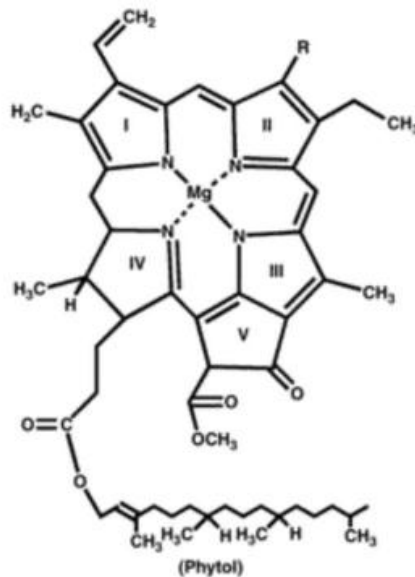


Figura 3: Estructura molecular de clorofila a y b. R= -CH₂ en clorofila a o - CHO en clorofila b. (28)

- **Determinación de clorofila:**

La concentración de clorofila se puede determinar mediante la centrifugación o filtración de las células vegetales, y posteriormente la adición de un solvente que bien puede ser, acetona, metanol o éter dietil en un rango de concentración de 90-95 % con el fin de extraer la clorofila intracelular, después de la extracción los residuos celulares se eliminarán por centrifugación, y el extracto final será cuantificado en espectrofotómetro a 663 y 750 nm. (28). Los pigmentos fotosintéticos pueden extraerse de los tejidos gracias a su solubilidad en disolventes orgánicos como éter y benceno.

Sin embargo, para que su extracción sea completa, el primer paso, la trituración, no se realiza con estas sustancias sino con otras que además de disolver los pigmentos sean solubles en agua, como acetona o alcohol etílico, ya que gran parte del peso fresco de los tejidos vegetales corresponde al agua. Posteriormente el extracto acetónico o alcohólico se mezcla con éter o benceno, en los que se disuelven las clorofilas. La mezcla de pigmento así obtenida puede separarse mediante cromatografía en capa fina utilizándose un eluyente adecuado, identificándose los pigmentos por su comportamiento cromatográfico y espectro de absorción en la zona azul-violeta (429 nm para clorofila a y 453 nm para la clorofila b) acompañada de una absorción secundaria en la zona del espectro rojo (660 nm para clorofila a y 643 para clorofila b). (29)

- **Usos de la clorofila**

Estas moléculas son usadas actualmente como colorantes naturales en industrias alimenticias y farmacéuticas, estos pigmentos se encuentran relacionados con propiedades nutraceuticas, antiinflamatorias, antioxidantes y profilácticas, además de esto sirven como vasoconstrictores plaquetarios. Algunos estudios muestran la reducción en el riesgo de cáncer asociado con el consumo de alimentos que contengan clorofila a, lo que hace de esta molécula un aditivo importante para su uso como un ingrediente en las formulaciones comerciales de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. (30)

2.2.5 Aplicaciones de la microalga *H. pluvialis*

H. pluvialis ha generado gran interés debido a su capacidad de producir astaxantina, esta se ha considerado como una de las mejores fuentes naturales de este carotenoide en especial para ser producido a nivel biotecnológico esta ha demostrado ser una fuente efectiva de

pigmentación para los salmónidos. El cultivo de *H. pluvialis* se ha desarrollado para la síntesis de astaxantina en diferentes campos, en el área farmacéutica, alimenticia, cosmética y de acuicultura (31,32).

Además de producir astaxantina la microalga posee gran valor biotecnológico debido a su capacidad de producir biodisel, posee así mismo alta capacidad de biorremediación en aguas residuales. Se ha utilizado también en la producción de bioproteína para la alimentación animal y humana, así mismo posee la característica especial de acumular ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga útiles para la generación de biocombustibles. (21)

2.2.6 Cultivo de *H. pluvialis*

Según la fuente de energía utilizada, los cultivos pueden ser clasificados en cultivos, heterotróficos, mixotróficos y fotoautótrofos. La incorporación de una fuente de carbono inorgánico u orgánico durante el crecimiento fotosintético, dependen de: especie del alga, intensidad de luz, fuente de energía y carbono (orgánico o inorgánico) y fase de crecimiento (ver tabla 3)

METABOLISMOS	FUENTE DE ENERGÍA	FUENTE DE CARBONO
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánico

Mixótrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y orgánico
------------------	----------------------------	-----------------------

Tabla 3: Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas (27)

La microalga *H. pluvialis* es capaz de crecer bajo condiciones fotoautótrofas, heterotróficas o mixotróficas (ver tablas 3 y 4), en estanques con conductos abiertos o en diferentes biorreactores. (28)

METABOLISMO	ECUACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA
Foto autótrofo	$\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{h\nu} \overset{\text{C}}{\text{(biomasa)}} + 1/2\text{O}_2 + 3\text{OH}^- \Rightarrow \text{pH incrementa}$
Heterótrofo	$(1 + a) \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \overset{\text{C}}{\text{(biomasa)}} + a\text{CO}_2 + (1+a) \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{pH disminuye}$

Mixotrofo	$b\text{HCO}_3 + c\text{CH}_2\text{O} \xrightarrow{h\nu} (b + (c-a)) \overset{\text{C}}{\text{(biomasa)}} + 3\text{OH}^- + a\text{CO}_2 \Rightarrow$	los cambios no son significativos
------------------	--	---

TABLA 4: Ecuaciones estequiométricas de los diferentes metabolismos en las microalgas. (27)

- **Condiciones fotoautótrofas:** En estas condiciones las células vegetales son capaces de crecer en presencia de luz ya que poseen cloroplastos los cuales utilizan para obtener energía por medio de la fotosíntesis, empleando sales minerales añadidas al medio. Estas células se desarrollan con suministro exógeno de CO₂, pero sin adición externa de carbohidratos. (32) El cultivo fotoautótrofo de *H.pluvialis* se lleva a cabo principalmente en estanques abiertos o fotobiorreactores cerrados. Los fotobiorreactores típicos utilizados para su cultivo incluyen fotobiorreactores tubulares o de columna y burbujeo. (25)
- **Condiciones heterotróficas:** Las células que crecen bajo estas condiciones a diferencia de las fotoautótrofas carecen de cloroplastos y por tanto requieren carbohidratos para su crecimiento. Bajo estas condiciones no se necesita luz, ya que los sustratos orgánicos sirven como fuentes de carbono y energía para el crecimiento y la síntesis de metabolitos secundarios. (25,33)
- **Condiciones mixotróficas:** Estos sistemas permiten el crecimiento de la célula en presencia de luz con adición de una fuente carbohidratos, debido a que las células serán capaces de obtener parte de su energía a partir de la fotosíntesis, gracias a

que poseen cloroplastos, capaces de obtener energía a partir de sales minerales añadidas al medio de cultivo. Estas condiciones constituyen una interfase entre los sistemas anteriores y se definen como los cultivos que poseen la habilidad para sintetizar clorofila y asimilar CO₂ pero que además requieren de alguna fuente exógena de carbohidrato para su crecimiento. (33)

2.2.7 Factores de cultivo que afectan el crecimiento y la acumulación de metabolitos en microalgas.

El crecimiento de las microalgas se ve directamente afectado por varios factores fisicoquímicos. Es importante determinar las condiciones óptimas de crecimiento para mejorar la tasa de crecimiento de la microalga. A continuación, se presentan diferentes factores que afectan los diferentes cultivos microalgares.

- **Luz:** Uno de los principales factores implicados en el crecimiento de las microalgas, en escasez de nutrientes, la fotosíntesis se incrementa, aumentando la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento, sin embargo, si la intensidad lumínica es extrema, la microalga alcanzará un punto de inhibición resultando perjudicial para su crecimiento (34). Diferentes autores han reportado distintas intensidades lumínicas favorables para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, en un estudio actual se encontró que a elevadas intensidades lumínicas la microalga incrementa la fotosíntesis, aumentando el CO₂ disuelto en el medio, acidificando finalmente el pH (12). Los sistemas de biorreactores empleados a nivel laboratorio son iluminados interna o externamente por luz artificial con lámparas fluorescentes y diodos emisores de luz (light emitting diodes, LED) entre otros. Para que la luz artificial sea de utilidad en el proceso fotosintético de las

microalgas, los fotones generados deben encontrarse a una longitud de onda de entre los 600 y 700 nm. (35)

- **Temperatura:** El crecimiento de las diferentes especies de microalgas aumenta con la temperatura óptima de cada especie, después de esta el crecimiento celular se reduce (34). La temperatura óptima para el cultivo de *H. pluvialis* se encuentra entre 20-25 °C. (11)
- **pH:** El pH en los medios de cultivo se ve influenciado por la presencia de CO₂ y la composición iónica del medio de cultivo, el pH más adecuado para el crecimiento de las microalgas generalmente es de 8.0, con un rango de 7.0-9.0 a un pH se podría generar la muerte microalgar. El pH puede ser controlado por la inyección de CO₂ (17,34).
- **Nutrientes:** El CO₂ es la principal fuente de carbono utilizada en cultivos de microalgas, al ser consumido el carbono, el oxígeno es producido por fotólisis del agua y este es diluido en el medio de cultivo. Puesto que, las microalgas son capaces de sobrevivir bajo elevadas concentraciones de dióxido de carbono, los gases de invernadero, el dióxido de nitrógeno y diferentes contaminantes de la atmósfera pueden servir como nutrientes para las microalgas. El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas y se incorpora como nitrato, así mismo el fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos, la deficiencia de fósforo en el medio podría afectar el crecimiento microalgar (34).
- **Agitación:** Es un factor de gran importancia en el crecimiento de la microalga ya que permite la distribución homogénea celular, la

captura adecuada de nutrientes y así mismo ayuda a que la célula capte de manera eficiente la luz para generar energía. (17)

- **Nitrógeno:** Generalmente se encuentra alrededor de 7-10% de la célula por peso seco, es un constituyente esencial para las proteínas funcional y estructuralmente en células de algas. La microalga posee una limitada capacidad para producir materiales almacenados de nitrógeno cuando crece bajo condiciones suficientes de nitrógeno. Cuando la microalga crece bajo condiciones limitadas de nitrógeno, se produce la degradación específica y activa de ficobilisomas. (28)
- **Fósforo:** Este macronutriente juega un importante rol en el proceso metabólico celular ya que interfiere en la formación de algunos componentes estructurales y funcionales requeridos para el crecimiento y desarrollo de la microalga. Los ortofosfatos son incorporados como componentes orgánicos a través de la fosforilación. El fosfato inorgánico se presenta se presenta en las células en forma de polifosfatos, acumulándose en gránulos. Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en crecimiento celular normal bajo suficiente fosfato, pero desaparecen en deficiencia de fosfato. (28)
- **Hierro:** Está involucrado en la composición bioquímica celular por sus propiedades redox, además está implicado en procesos fundamentales como la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno y síntesis de ADN. La deficiencia de hierro puede producir varios cambios bioquímicos. (28)

- **Salinidad:** Algunas microalgas son capaces de acumular moléculas pequeñas de sustancias osmorreguladoras (osmotocantes) en respuesta a un incremento en la salinidad o presión osmótica del ambiente. Cantidades de osmotocantes encontrados en microalgas son polioles. Los más comunes son: glicerol, manitol, galactitol, sorbitol, sucrosa, tehalosa y glicerol galactosidasa. (28)

2.2.8 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados a lo largo de la historia para el cultivo de *H. pluvialis* poseen diferentes concentraciones de sales, micronutrientes y vitaminas. El medio más adecuado para la producción de biomasa de esta microalga es aquel capaz de producir una concentración celular mayor y con bajos costos.

- **Medio Basal Bold (BBM):** El un medio para el cultivo de algas de agua dulce, se ha utilizado para cultivar una gran variedad de algas verdes, sin necesidad de extracto de suelo (ver tabla 5) (35).

COMPOSICION MEDIO BOLD BASAL (BBM)		
Reactivos	Solución stock	mL/L
KH ₂ PO ₄	8.75 g/500 mL	10 mL
CaCl ₂ •2H ₂ O	12.5 g/500 mL	1 mL

MgSO ₄ •7H ₂ O	37.5 g/500 mL	1 mL
NaNO ₃	125 g/500 mL	1 mL
K ₂ HPO ₄	37.5 g/500 mL	1 mL
NaCl	12.5 g/500 mL	1 mL
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	10 g/L	1 mL
KOH	6.2 g/L	
FeSO ₄ •7H ₂ O	4.98 g/L	1 mL
H ₂ SO ₄	1 mL/L	
Solución Trace Metal	g/L	1 mL
H ₃ BO ₃	2.86 g	
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81 g	
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.222 g	
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.390 g	
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.079 g	
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.0494 g	
Solución de vitaminas	g/L	1 mL
Vitamina B12	0.001	
2. Biotina	0.001	
3. Tiamina	0.200	

Tabla 5: Composición de medio BBM (35)

- **Medio Rudic (RM):** Medio de cultivo económico utilizado para el cultivo de microalgas, su mayor característica es que en su composición no es necesaria la adición de vitaminas, ha sido utilizado en diferentes estudios como el de Imamoglu (ver tabla 6).

COMPOSICIÓN MEDIO RUDIC (RM)	
Reactivos	mg/L
NaNO ₃	300
K ₂ HPO ₄	80

KH ₂ PO ₄	20
MgSO ₄ * 7H ₂ O	10
CaCl ₂ * H ₂ O	58.5
EDTA	7.5
NaCl	20
H ₃ BO ₃	0.3
MnSO ₄ H ₂ O	1.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.3
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.26
FeCl ₃ .6H ₂ O	17

Tabla 6: composición de medio RM (45)

2.2.9 Sistemas de cultivo

Existen dos sistemas de cultivos para organismos fotoautótrofos, los cultivos abiertos en los que la microalga es expuesta a condiciones medioambientales y cultivos cerrados, generalmente denominados fotobiorreactores en los cuales la biomasa posee poco o ningún contacto con el medio externo (ver figura 4) (32).

- **Sistemas abiertos:** Son los sistemas de cultivo más comunes, compuestos por medios naturales como lagunas y estanques (32).
- **Sistemas cerrados:** Estos sistemas permiten total control sobre los parámetros de cultivo, disminuyendo los diferentes problemas presentes en los sistemas cerrados (33).

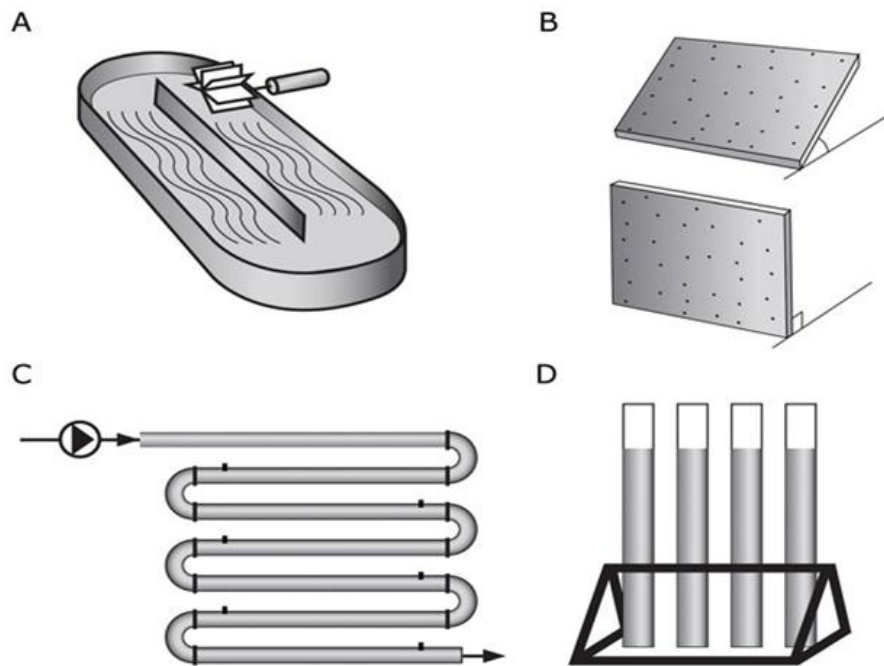


Figura 4: Diseños de sistemas de cultivo. A sistemas abiertos. B C Y D sistemas cerrados (33)

2.2.10 Fotobiorreactores

Son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas (35), estos son biorreactores combinados con algún tipo de luz y están compuestos por varios subsistemas como fuente de luz, sistema de manejo de aire, sistemas de filtración, sistemas eléctricos y sistemas de instrumentación (36).

Los fotobiorreactores poseen dos tipos de diseños diferentes, fotobiorreactores abiertos, en los cuales el cultivo se encuentra en contacto con la atmósfera, al estar expuestos al medioambiente son susceptibles a la invasión de otros microorganismos por lo que este tipo de biorreactores es útil para el cultivo de microalgas robustas y de rápido

crecimiento. Por otro lado, existen fotobiorreactores cerrados, estos mantienen el cultivo totalmente aislado del exterior, generalmente están equipados con sistemas de agitación, aireación, control de pH, adición de medio y CO₂ (36).

- **Fotobiorreactores de columna**

Fotobiorreactores cerrados que consisten en una sola columna de burbujeo de material transparente, con diferentes diámetros y alturas, estos son dispositivos sencillos ya que el burbujeo proporciona la mezcla del cultivo, proporción de CO₂ y la eliminación de O₂. (Ver figura 5) (36)

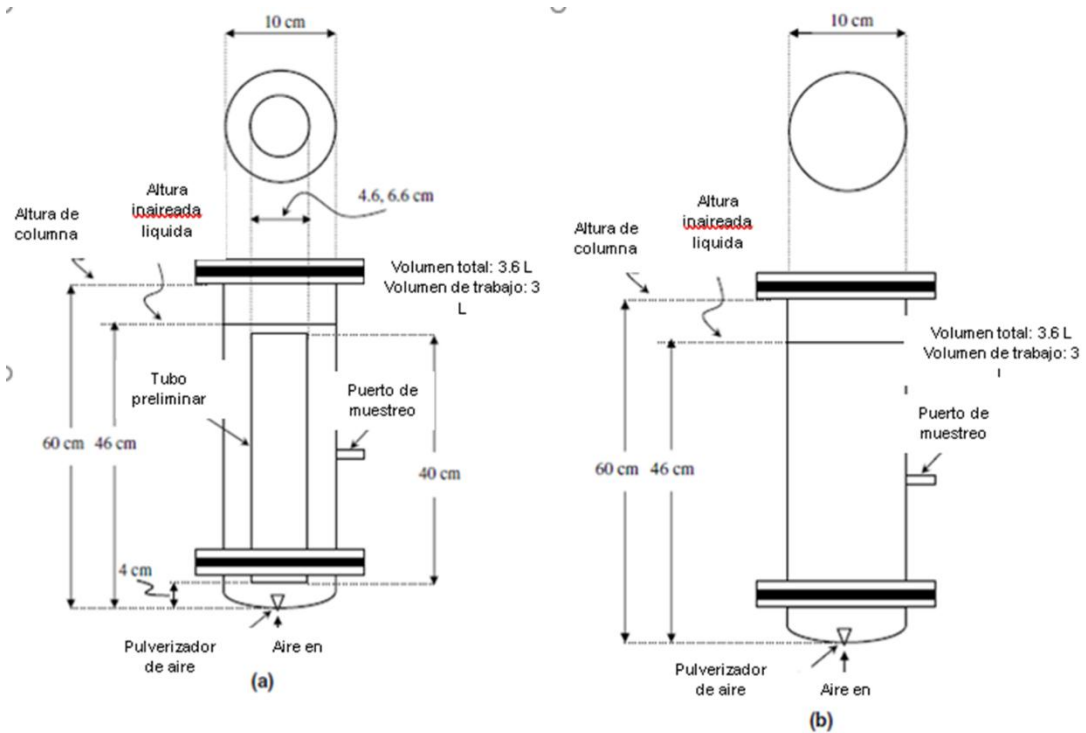


Figura 5: (a) Biorreactor airlift (b) biorreactor de Columna. (37)

- **Fotobiorreactores planos**

Los reactores planos son similares a las columnas en su fundamento, estos incluyen agitación e intercambio de materia en el mismo espacio en el que se capta la luz, pero intentan resolver algunos de los problemas de las columnas como el paso óptico que se puede hacer tan delgado como se quiera. (36)

- **Fotobiorreactores tubulares**

Son los más sofisticados y los más especializados, pero son también los más caros de construir. El diseño distingue dos partes: lazo y desgasificador:

Lazo: Parte en la que se lleva a cabo la captación de la energía solar.

Desgasificador: Parte en el que se lleva a cabo el intercambio de materia y temperatura (36).

2.2.11 Fermentador Tecferm de 5L

Sistema básico de investigación para el cultivo de bacterias y hongos, para el cultivo de células animales o vegetales es necesario ajustar algunos parámetros, este es capaz de operar con vasos de 2, 5, 10 o 20 litros. Consta con un reactor tipo tanque de agitación, con capacidad total de 7.5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 5 litros. El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm, sin embargo, se recomienda operarlo entre 50 y 300 rpm. El rango de temperatura usual es entre 30 y 40 grados, el pH puede ser controlado automáticamente en un rango entre 0 y 14. Este sistema puede operar en forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno (39).

El biorreactor en el que se realiza el cultivo consta de un vaso de acero inoxidable con mirilla lateral, empaque y aro de cierre, así mismo consta de una tapa (tipo head plate) (ver imagen 1 y 2) (39).

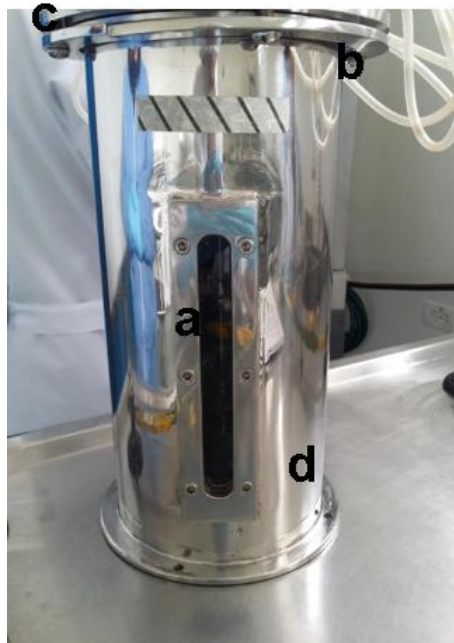


Imagen 1. Biorreactor Tecferm de 5 L donde se observa **a.** mirilla lateral, **b.** Aro de cierre, **c.** tapa tipo head plate y **d.** vaso inoxidable. Imagen tomada en el laboratorio.

2.3 Microbiología predictiva

Esta disciplina de auge mundial puede ser utilizada para describir el crecimiento, sobrevivencia o muerte de diferentes microorganismos en función de sus principales factores de crecimiento. Los modelos predictivos utilizados por esta ciencia permiten interpolar puntos de datos experimentales ayudando a predecir respuestas a condiciones no estudiadas. (40)

2.3.1 Modelos predictivos de crecimiento

Existen varios modelos predictivos, los cuales se pueden clasificar según su complejidad primarios, secundarios o terciarios. (40)

- **Modelos primarios:**

Estudian las respuestas de los microorganismos en función del tiempo. En este tipo de modelo se pueden cuantificar unidades formadoras de colonia (UFC), formación de toxinas o niveles de substrato denominadas como

medidas directas a la respuesta, así mismo se estudian medidas indirectas como la turbidez generada en el medio de cultivo, absorbancia, impedancia o conductancia. Dentro de estos modelos se encuentran el modelo de Gompertz y Baranyi. (41)

MODELO	ECUACIÓN
Modelo de Gompertz:	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$
Modelo de Baranyi:	$y = A + \mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0} \right) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0} \right) - 1}}{e^{(y_{\max} - A)}} \right)$
Modelo logístico:	$y = \frac{A}{\left\{ 1 + \exp \left[\frac{4\mu_{\max}}{A} (\lambda - t) + 2 \right] \right\}}$
Modelo de Huang	$y = A + y_{\max} - \ln \left(e^A + (e^{y_{\max}} - e^A) e^{-\mu_{\max} B(x)} \right)$ $B(x) = x + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-\alpha(x-\lambda)}}{1 + e^{\alpha\lambda}}$

TABLA 7: Modelos primarios y sus ecuaciones (42).

En todos los modelos:

a: Asintota inferior bacteriana

μ_{\max} : tasa de crecimiento específica máxima

v: afecta cerca de la cual se produce el crecimiento máximo asintótico

λ : tiempo de retardo

y_{max} : asíntota superior bacteriana

e: exponente (2.718281828)

t: tiempo de muestreo

α, β, k : parámetros de ajuste de la curva

h_0 : un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. El tiempo de retraso (día-1) se puede calcular como **$h_0 = MAX$**

- **Modelos secundarios:**

Relacionan las respuestas de los modelos primarios frente a las variables ambientales estudiadas, es decir ya las respuestas no se dan en el tiempo, sino que los aumentos o descensos de población son correlacionados con el pH, la temperatura, la actividad de agua, la concentración de sales, y demás. (41)

- **Modelos terciarios:**

Se generan como el resultado de combinar los modelos primarios y secundarios, para llevarlos a herramientas informáticas que muestran las diferentes predicciones en relación al crecimiento, supervivencia o muerte de los microorganismos. (41)

3 DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental, tipo de estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes dentro de una situación de control para el investigador (43), en este se realiza la producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor Tecferm de 5 L en los medios de cultivo RM y BBM.

3.2 HIPÓTESIS

En el biorreactor Tecferm de 5L se produce una biomasa adecuada en cantidad y calidad de *H. pluvialis* utilizando los medios de cultivo RM y BBM en las condiciones preestablecidas.

3.3 VARIABLES

3.3.1 Variable dependiente: Condiciones de cultivo en el biorreactor Tecferm de 5 L.

3.3.1.1 Indicadores:

- Crecimiento celular expresado en cel/ml.
- Morfología celular
- Condiciones de cultivo:

Fotoperiodo: 18:6 Luz:oscuridad

Luz blanca por medio de lamparas fluorescentes blancas

Phillips Master TL5 HO de 54W/827

pH: 7.1

Agitación: 180 rpm

Aireación: Aire filtrado

3.3.1.2 Evaluación del cultivo:

- pH
- Clorofila mg/L
- Nitratos mg/L
- Fosfatos- ortofosfatos mg/L

- Conteo celular (cel/mL)
- Morfología celular

3.3.2 Variable independiente: Microalga *H. pluvialis*

3.3.2.1 Indicadores:

- Morfología
- Crecimiento celular expresado en cel/ml.
- Biomasa (gr)

3.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.4.1 Realización del cultivo de *Haematococcus pluvialis* en biorreactor Tecferm de 5 L.

- **Preparación de Inóculo**

La preparación del inóculo se realizó transfiriendo la cepa *H. pluvialis* UTEX en medio MES volvox estéril. (ver tabla 8), con 10% de inóculo en un biorreactor que contiene 500 mL de medio. (9)

COMPOSICION MEDIO MES VOLVOX	
Reactivos	Para 1 L
MES buffer	1.95 g
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	117.8 mg
Na ₂ -glicerofosfato * 5H ₂ O	60 mg
MgSO ₄ * 7H ₂ O	40 mg
KCl	50 mg
NH ₄ Cl	26.7 mg
Biotina (vitamina H)	0.0025 mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	0.0015 mg
Solución Stock de microelementos	6 mL
Solución Stock de microelementos	
Na ₂ EDTA	750 mg
FeCl ₃ * 6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ * 4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	4 mg
pH = 6.7	

Tabla 8: Composición de medio MES volvox (44)

El inóculo se sometió a las siguientes condiciones: fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, utilizando un timer y luz blanca por medio de lámparas fluorescentes Phillips Master TL5 HO de 54W/827 (21), aire filtrado, pH 7.12, agitación manual por 10 segundos al día y temperatura de 20°C por un periodo de 27 días.

Se monitoreo la morfología y viabilidad celular del inóculo por microscopia cada 3 días, el recuento celular se realizó en cámara de Neubauer (8). Se realizaron curvas de crecimiento estableciendo la tasa de crecimiento.

- **Ensayo en biorreactor Tecferm 5 L**

A partir de la concentración establecida se procedió a determinar el volumen de inóculo a usar para obtener una concentración inicial de 1×10^4 cel/MI mediante la siguiente fórmula:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

A partir de este cálculo se conoció el volumen a tomar del inóculo, para ser transferido a los medios RM y BBM (ver tabla 2 y 3) teniendo una concentración celular de 1×10^4 cel/mL, siguiendo con el cultivo en el biorreactor Tecferm de 5L en un volumen de 2 L, las condiciones de crecimiento fueron, temperatura 20 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, utilizando luz blanca por medio de lámparas de luz fluorescentes blancas (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH DE 7.1 (10, 21).

3.5.2 Fase 2: Determinación de crecimiento celular

El crecimiento celular se determinó por medio de recuento en cámara de Neubauer, cada 7 días (8), tomando muestras por triplicado (11), se realizaron curvas de crecimiento para determinar la tasa de crecimiento celular en los medios RM y BBM.

- **Ajuste de curvas de crecimiento**

A cada medio de cultivo se le realizó un ajuste de crecimiento celular según el modelo logístico empleado, utilizando el software DMFit basado en el modelo de Baranyi. (42)

3.5.3 Fase 3 Determinación de parámetros para la selección del medio

• Clorofila

Se determinó la concentración de clorofila tomando 1 mL de muestra, posteriormente las células fueron extraídas por centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos en cantrifuga Eppendorf centrifuge 5702. El sobrenadante (medio de cultivo) fue retirado, se adiciono 1 mL de metanol al 90% y se incubo a 60°C por 10 min en baño serológico Memert. Para la cuantificación de clorofila se utilizaron patrones de referencia con los cuales se realizaron curvas de calibración (ver anexo 1). La concentración de clorofila se determinó a una longitud de onda de 667 nm en un espectofotometro Jenway. (16, 46)

• Nitratos

Los nitratos en el medio de cultivo se midieron por método colorimétrico con ácido salicílico, 20 ul de medio se incubaron con ácido salicílico al 2.5% H₂SO₄ al 98% durante 20 minutos, se realizó la neutralización con 500 ul de NaOH 3.8 M. La concentración en NO₃⁻ se ensayó midiendo la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro. Utilizando curvas de calibración para determinar la concentración (ver anexo 2). (11)

• Fosfatos

Se midió la concentración de fosfatos, por reacción con ácido ascórbico, mezclado 50 ul de medio diluido con 50 ul de solución, esta contenía ácido ascórbico al 2% (peso / volumen), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,5% (p / v) y H₂SO₄ 0,6 M. Concentración en PO₄ Se ensayó midiendo la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro. Se utilizaron curvas de calibración para determinar la concentración de fosfatos. (ver anexo 3). (11)

• pH

El pH se determinó utilizando un potenciometro marca Hanna Instruments tomando 15 mL de muestra en tubo falcon. El potenciómetro fue calibrado

antes de la medición insertando el electrodo en solución amortiguadora de 7.0 y posterior a lavado en solución de pH 4.0, al finalizar la calibración del potenciómetro, el electrodo se lavó con agua destilada y se procedió a la lectura de la muestra (38)

3.5.4 Costos de medios de cultivo

Se evaluaron los costos en la composición de los medios de cultivos, analizando los precios del complejo de vitaminas, diferentes sales y micronutrientes contenidos en ellos, los aspectos económicos se analizaron con 10 L de producción de medio de cultivo. (16)

3.5.5 Análisis estadístico:

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Se empleó un análisis de varianza ANOVA de un factor para establecer diferencias significativas entre los diferentes tratamientos utilizados. Las diferencias se consideraron significativas a una probabilidad del 5% ($P < 0.05$). Se empleó el programa Excel 2016.

4 RESULTADOS

Fase 1: Revisión teórica:

Con el fin de definir las condiciones de cultivo a utilizar en este estudio se realizó una revisión bibliográfica teniendo en cuenta el uso de biorreactores o fotobiorreactores, los medios de cultivo, condiciones de crecimiento como pH, temperatura, fotoperiodo, agitación y suministro de aire, así como valores de biomasa o concentración celular de la microalga. (ver anexo 9)

Los datos obtenidos en la densidad celular en los medios RM y BBM se resumen en la tabla 1 y gráfica 1. La densidad celular máxima fue de 1.25×10^5 cel/ml y 1.0×10^5 cel/ml en medio RM y BBM durante el tiempo de estudio (21 días), se obtuvo un crecimiento celular mayor en el cultivo con medio RM de 25% con respecto al medio BBM como se puede observar en la gráfica 1 y según los datos mencionados anteriormente.

El peso seco obtenido en los cultivos de la microalga fue de 0.014 gr y 0.010 gr respectivamente obteniéndose mayor biomasa (40% más) en el cultivo con medio RM lo cual concuerda con la densidad celular encontrado. Bajo las condiciones ensayadas en el biorreactor Tecferm de 5 L, a temperatura 20 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, utilizando lámparas de luz blanca (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH de 6.8- 7.1, el medio que presentó los mejores resultados para el crecimiento de la microalga fue el RM.

La morfología obtenida durante el cultivo varió de células flageladas a células palmeloides, sin obtenerse células enquistadas como se puede observar en la tabla 6 ya que no se presentó estrés en el equipo Tecferm de 5L bajo las condiciones trabajadas por los dos tratamientos realizados. En la gráfica 1 se puede observar que la microalga alcanza su fase exponencial de 18 a 20 días en los cuales se presentó mayor incremento celular, así mismo no se observó una fase de desaceleración del crecimiento en el medio BBM a los 22 días de cultivo

Se confirma que las condiciones de cultivo fueron estables y adecuadas para *H. pluvialis*. Según los resultados de crecimiento celular, tuvieron repetitibilidad con un coeficiente de variación <10%, por otro lado, según el análisis de varianza ANOVA (P= 0.918) (ver anexo 9) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para el crecimiento celular de la microalga.

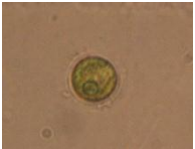
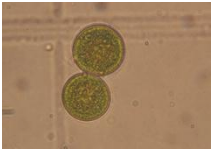
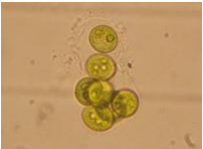

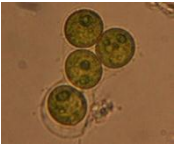
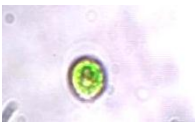
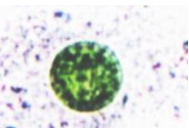
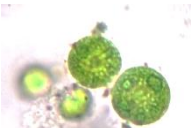
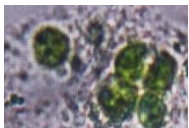

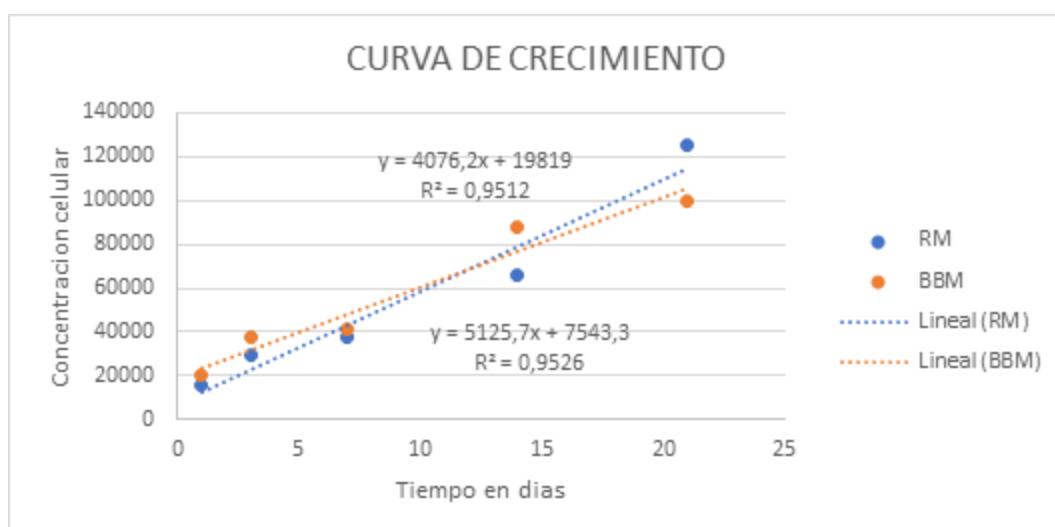
MEDIO	DENSIDAD CELULAR				
	Día 1	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21
RM (Medio Rudic)	1.6×10^4	2.9×10^4	3.7×10^4	6.6×10^4	1.25×10^5
					
BBM (Medio Bold Basal)	2.0×10^4	3.7×10^4	4.1×10^4	8.7×10^4	1.0×10^5
					

TABLA 9. Densidad celular en medio RM y BBM. Objetivo utilizado 40X



Gráfica 1. Curva de crecimiento celular en medios RM y BBM. Realizada por la estudiante.

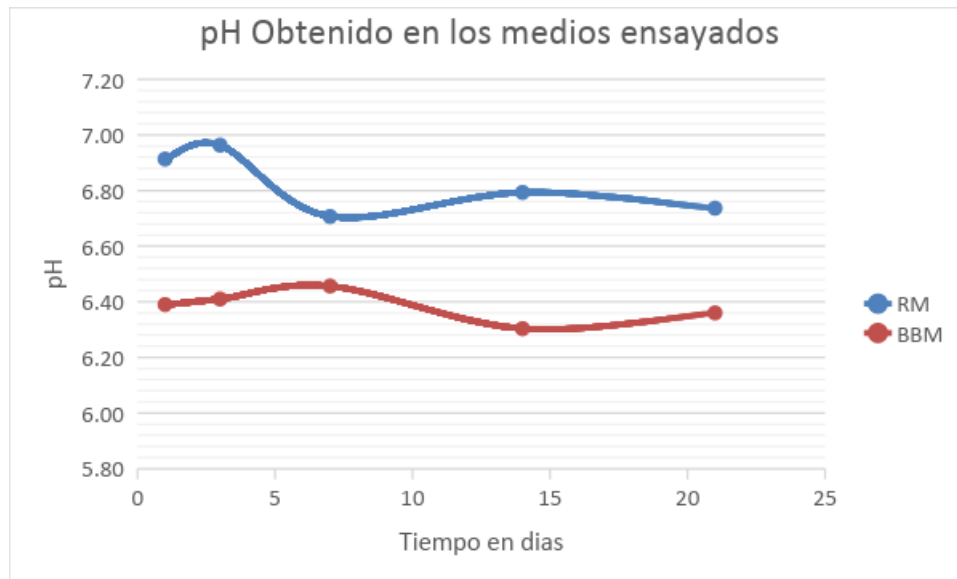
Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores en el eje Y, de los cuales se calculó el logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. El medio de cultivo con mayor velocidad específica de crecimiento fue RM con una velocidad específica de crecimiento de 0.040 cel/día (Ver tabla 10) (Ver anexo 1 curvas ajustadas)

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM	5	4.204	5.096	0.040	96%
BBM	5	4.301	5.000	0.032	88%

Tabla 10. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.

DETERMINACIÓN DE pH

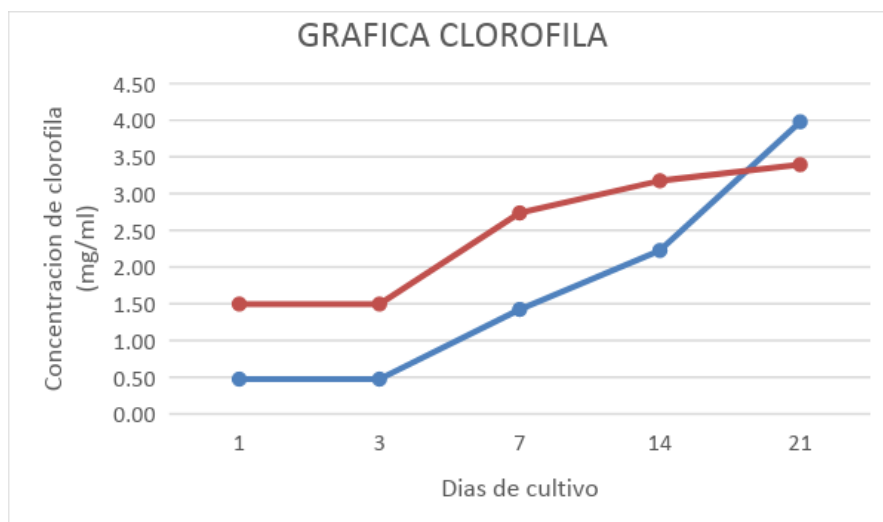
El pH de los cultivos fue monitoreado durante todo el periodo de crecimiento obteniéndose un rango de 6.9 a 6.74 en el medio RM y de 6.39 a 6.36 en medio BBM, a partir de estos datos y comparando el crecimiento celular con el pH en este estudio se observó que se obtiene un mayor crecimiento a pH cercano a la neutralidad, como se puede observar en la gráfica 1, donde el crecimiento celular fue mayor (40%) en el medio RM que en promedio se mantuvo cerca de un pH de 6.82 durante el cultivo de la microalga (ver gráfica 1 y 2). El pH en general nos indica que se mantuvo cercano a la neutralidad en el tiempo de estudio con los dos medios bajo las condiciones trabajadas, (7.0) un pH ideal de crecimiento para los organismos como las microalgas.



Gráfica 2 pH obtenido durante 21 días de cultivo en los medios RM y BBM. Realizada por la estudiante

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

Los resultados obtenidos en la determinación de clorofila se muestran en la gráfica 3, en el cultivo con medio RM la clorofila final obtenida fue de 3.98 mg/ml, por otro lado, la clorofila obtenida en el tratamiento con medio de cultivo BBM fue de 3.39 mg/ml, según los datos obtenidos se observó una mayor concentración (17%) en el tratamiento con medio RM lo que se correlaciona con la gráfica 1 en donde se observa un mayor crecimiento celular con este medio. Según el análisis de varianza ANOVA no se presentaron diferencias significativas ($P= 0.362$) en los medios de cultivo utilizados en este estudio, lo que se correlaciona con el crecimiento celular obtenido. (Ver anexo 6)



Gráfica 3 Concentración de clorofila obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis*. Elaborada por la estudiante.

DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y FOSFATOS

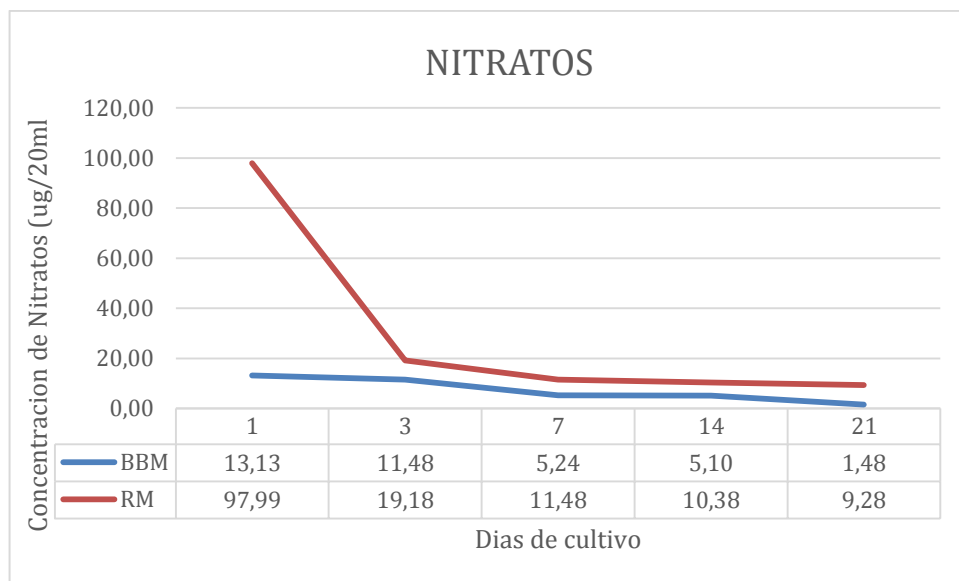
En las gráficas 4 y 5 se observa el consumo de la microalga *H. pluvialis* sobre nitratos y fosfatos respectivamente en los medios ensayados. La concentración inicial de nitrato de sodio (NaNO_3) en medio RM fue de 13.13 $\mu\text{g}/20 \text{ ml}$ la cual al cabo de 21 días disminuyó a 1.48 $\mu\text{g}/20 \text{ ml}$, se produjo una disminución del 88%, en medio BBM la concentración inicial fue de 0.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ llegando a una concentración final 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en el cual se presentó una disminución del 88%. Al realizar el análisis de varianza ANOVA realizado en la concentración de nitrato nos indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0.232$) (ver anexo 8).

En cuanto a Fosfato de potasio (KH_2PO_4) la concentración inicial en medio RM fue de 5.80 mg/ml , su concentración final fue de 2.52 mg/ml , presentándose una disminución del 56 %. En medio BBM la concentración inicial fue de 2.08 mg/ml , la concentración final fue de 1.20 mg/ml , su concentración se redujo en un 42%. Según el análisis ANOVA se produjo una diferencia significativa en cuanto a la concentración de fosfatos en los dos medios estudiados ($p= 0.007$) siendo el medio RM en el que se produjo mayor consumo del compuesto.

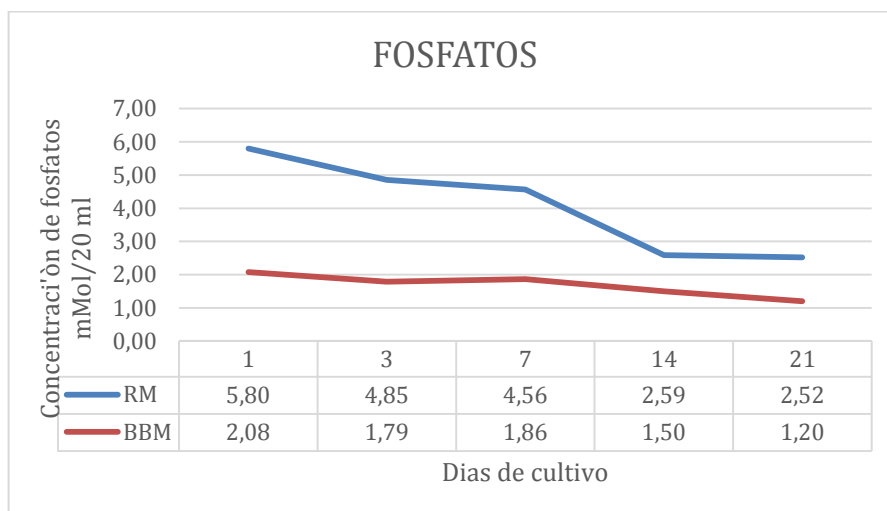
La comparación de consumo de nitratos y fosfatos (gráfica 4 y 5 respectivamente) se observó un aumento en el consumo de nitratos sobre los fosfatos por parte de la microalga, lo cual indica que el

microorganismo requiere más demanda de nitratos durante su ciclo vital, este es un dato de gran utilidad para generar mejores condiciones de crecimiento en cultivos futuros ya que bajo este criterio se conoce que la demanda de la microalga de nutrientes se ve dirigida hacia los nitratos por tanto en futuros medios de cultivo la concentración de nitratos podría ser mayor para obtener mayor biomasa.

En cuanto a los medios según las gráficas se obtuvo una disminución mayor de estos componentes en el medio RM indicando mayor consumo lo cual se vio reflejado en el mayor crecimiento celular previamente mencionado y el mayor contenido de clorofila. Se encontró que la concentración de fosfatos si presentó diferencias significativas en el análisis ANOVA ($P=0.007$) (ver anexo 7).



Gráfica 4 Concentración de nitratos obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis*. Elaborada por la estudiante.



Grafica 5 Concentración de fosfatos obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis*. Elaborada por la estudiante.

ANÁLISIS DE COSTOS

El análisis de costos realizado comparó los costos para producir 1 L de medio BBM y RM, se incluyeron los micronutrientes, macronutrientes, elementos y vitaminas necesarios para el crecimiento y desarrollo de la microalga, se pudo observar que el medio más costoso es el medio BBM con un costo de \$ 232.54. El medio RM genera un costo menor el cual es de \$ 32.99. A partir de estos datos se puede concluir que el medio más económico para ser preparado es el medio RM. (Ver tabla 11)

RUDIC (RM)			MEDIO BOLD BASAL (BBM)		
Reactivos	mg/L	Precio (pesos)	Reactivos	mg/L	Precio (pesos)
NaNO ₃	300	11,4	KH ₂ PO ₄	175	52.5
K ₂ HPO ₄	80	0,95	CaCl ₂ •2H ₂ O	25	1.57
KH ₂ PO ₄	20	0,006	MgSO ₄ •7H ₂ O	75	18.6
MgSO ₄ * 7H ₂ O	10	2,5	NaNO ₃	250	9.5
CaCl ₂ * H ₂ O	58.5	3,69	K ₂ HPO ₄	75	0.89
EDTA	7.5	11,87	NaCl	25	0.25
NaCl	20	0,206	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	10	0.37
H ₃ BO ₃	0.3	0,005	KOH	6200	690
MnSO ₄ H ₂ O	1.5	0,049	FeSO ₄ •7H ₂ O	4.98	0.001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0,313	H ₂ SO ₄	1 mL	0,002
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ *4H ₂ O	0.3	0,006	H ₃ BO ₃	2.86	0.047
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.08	0,448	MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81	0.059
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0.26	1,3	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22	0.68
FeCl ₃ *6H ₂ O	17	0,255	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.39	0,0001
TOTAL		32,9	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.079	0.44
			Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.049	0.24
			Vitamina B12	0.001	0.22
			Biotina	0.001	0.005
			Tiamina	0.200	22
			TOTAL		779.3

TABLA 11: Análisis de costos para producir 1L de medio RM y BBM

Medios	RM	BBM	ANOVA
Densidad celular (cel/ml)	1.25X105	1.0X105	0.91
Fosfatos (mg/ml)	2.52	1.20	0.007
Nitratos (mg/ml)	9.28	1.48	0.23
Clorofila (mg/ml)	3.98	3.39	0.36
Crecimiento máximo (cel/ml)	5.096	5	0.91
Velocidad de crecimiento (mg/ml)	0.0406	0.0327	0.95
Análisis de costos	32.9	42488	0.45

ANOVA (95%). Diferencias significativas entre tratamientos $p < 0.05$

Tabla 12. Cuadro resumen de los parámetros trabajados durante el estudio.

La velocidad de crecimiento y crecimiento máximo celular se obtuvieron a partir del ajuste de crecimiento realizado a las curvas de crecimiento bajo los modelos logístico y de Baranyi.

5 DISCUSIÓN

H. pluvialis es una microalga de gran interés a nivel industrial debido a que sintetiza compuestos de utilidad para diferentes áreas, sin embargo, debido a su complejo ciclo de vida, realizar un cultivo a nivel de laboratorio y obtener una biomasa de calidad y cantidad adecuadas se dificulta. La microalga *H. pluvialis* posee un crecimiento lento, durante su cultivo la microalga produce cambios bioquímicos y morfológicos en respuesta a variaciones en el medio, por tanto, los métodos de caracterización morfológica contribuyen a la optimización de este proceso, como se realizó en este trabajo ya que durante todo el periodo de estudio se evaluó la morfología de la microalga, esta presentó las diferentes formas vegetativas sin pasar a fase de enquistamiento, gracias a las condiciones establecidas anteriormente mencionadas, pH 6.8-7.1, temperatura 25°C, fotoperiodo 18:6 luz:oscuridad, agitación 180 rpm y aire filtrado. Una de las cosas que dificulta el monitoreo y seguimiento del cultivo de la microalga es que los cambios morfológicos se pueden dar de manera repentina por diferentes condiciones como temperatura, luz, fotoperiodo, pH y nutrientes.

En el presente estudio la morfología que más predominó fue la célula palmeloide sin presentarse quistes, células que aparecen en condiciones de estrés, esto indica presuntamente que el cultivo se llevó a cabo de manera adecuada y que las condiciones de cultivo no afectaron a la microalga en su crecimiento lo cual se observa en las curvas de crecimiento durante 21 días donde se observan las diferentes fases (ver gráfica 1). Esto aportó al estudio el tener en cuenta el uso del biorreactor Tecferm 5L para futuras investigaciones en la universidad. La morfología

obtenida en este trabajo fue comparada con otros trabajos, en la investigación de M.C García (8) se presentaron células vegetativas flageladas verdes con mayor predominio. Según este estudio el diámetro medio de las células flageladas es de 20 μm , las células palmeloides presentan un mayor tamaño siendo de 25 μm y los quistes son aún mayores con un diámetro de 30 μm , así como se obtuvieron células flageladas, también se presentaron células palmeloides y quistes, a diferencia del presente estudio donde no se obtuvieron células enquistadas ya que no se buscó generar estrés en la microalga.

Según Sipaubá L (17) se deben resaltar dos aspectos importantes para un adecuado cultivo y obtención de una biomasa de calidad para poder ser utilizada en la obtención de diferentes compuestos como, clorofila, carotenoides y ácidos grasos, uno de ellos son factores ambientales como luz, temperatura, pH, agitación y suministro de aire, por otro lado, se encuentra la selección de un medio de cultivo adecuado. El crecimiento de las microalgas se ve afectado por la luz, ya que en cultivos exclusivos estos la absorben y la dispersan fácilmente, oxígeno disuelto, dióxido de carbono y nutrientes principalmente N y P. La mayoría de los experimentos con células en etapas vegetativas se han llevado a cabo utilizando irradiancias relativamente bajas haciendo que el crecimiento se sature por debajo de 100 $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, la utilización y el comportamiento del cultivo están fuertemente influenciados por varios parámetros, como la concentración celular, la trayectoria de la luz, la velocidad de mezcla y la geometría del vaso de cultivo. (14)

El crecimiento celular obtenido en el presente trabajo se puede atribuir por lo tanto a la intensidad de luz, el pH cercano a la neutralidad y la concentración de nutrientes presentes en los medios ensayados. Según lo reportado por diferentes autores distintas especies de microalgas obtienen un crecimiento óptimo bajo concentraciones de pH cercano a la neutralidad. Encontrándose que para *H. pluvialis* el pH indicado se reporta

alrededor de 7 y 8 (16), en el trabajo realizado se trabajó pH de 6.8-7.1 aproximadamente el cual permitió que se generará un buen crecimiento y desarrollo de la microalga.

Al evaluar el efecto de los medios de cultivo ensayados sobre la microalga, se encontró que la fase exponencial se produjo de 18 a 20 días en ambos medios de cultivo, en el medio BBM se presenta una fase de desaceleración del crecimiento a los 20 días. El crecimiento celular obtenido en este trabajo fue comparado con las concentraciones celulares máximas obtenidas por otros autores, como se reporta a continuación.

Ramirez Landinez (12) obtuvo una concentración celular máxima de 4.02×10^5 - 4.16×10^5 cel/ml en medio BBM y OHM utilizando un fotobiorreactor tipo airlift, esta concentración concuerda con las obtenidas en el presente trabajo que fueron de 1.0×10^5 cel/ml en medio BBM. Por otra parte, la densidad celular obtenida en el medio RM que fue de 1.25×10^5 cel/ml concuerda con el crecimiento obtenido por Rosana M (2013) quien cultivó la microalga en medio RM utilizando fotobiorreactores de placas planas de 4L en donde obtuvo una concentración celular máxima de 1.36×10^5 cel/ml. Sin embargo, con respecto a las concentraciones celulares obtenidas en el medio BBM por Ramírez Landinez el cual se utilizó medio BBM sin vitaminas, al ser comparado con la densidad celular en el presente trabajo en el cual se utilizó medio BBM modificado con adición de vitaminas, se puede observar un mayor crecimiento reportado en el medio BBM sin adición de vitaminas.

Por otro lado M. C Garcia (8) reportó densidades celulares máximas de 0.46×10^6 y 3.94×10^6 cel/ml en Medio inorgánico libre de acetato utilizando un reactor tubular de transporte aéreo y un reactor de columna de burbujas, comparando el crecimiento celular obtenido en este trabajo con el reportado por M. C García se observa diferencias en cuanto a la concentración celular obtenida.

En el desarrollo de cultivos para las microalgas se debe resaltar la importancia de la adición de uno o más micronutrientes para el desarrollo de la microalga. El nitrógeno posee un efecto positivo sobre el crecimiento de la microalga y aún más importante es un elemento esencial para el desarrollo, crecimiento, reproducción y otras actividades fisiológicas de las microalgas, está asimila varias fuentes de nitrógeno, entre ellas nitrato, amonio y urea. (17) En el presente trabajo se observó un aumento en el consumo de nitratos, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. También se explica por qué el medio RM presentó mayor crecimiento celular, ya que este contiene mayor cantidad de nitratos en su composición (300 mg/L NaNO_3) que el medio BBM (100 mg/L KNO_3). Comparando las concentraciones de nitratos obtenidas en el presente trabajo con otras investigaciones encontramos que en la investigación de Sipaubà L (17) se presentaron concentraciones de nitratos de 0.6 ug/ml en el medio W.C, 0.3 ug/ml en el medio NPK y 0.6 ug/ml en el medio M+NPK, en el trabajo realizado se obtuvieron 0.07 ug/ml en medio BBM y 0.4 ug/ml en medio RM, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Sipaubà, por lo cual se podría afirmar que en investigaciones futuras los medios de cultivo seleccionados deberán contener un mayor contenido de Nitrato para optimizar el cultivo de la microalga.

Se ha determinado que el fosfato es un nutriente clave para optimizar el crecimiento de la microalga. En el estudio realizado por Tocquin P, et al (11), se encontró, que en el medio M1B5 el fosfato representa el aumento de la concentración celular. A diferencia del nitrato el fosfato ha recibido menos interés en los enfoques de optimización del cultivo. Se ha considerado como un elemento que promueve el crecimiento celular en concentraciones moderadas o bajas (0.5 mM), en cambio a una mayor concentración podría promover a la carotenogénesis, en este estudio se destaca la proporción más baja de nitrato a fosfato (0.6 %) y la elevada concentración de fosfato en el medio, estas características no se han

reportado en estudios anteriores, ya que como en este trabajo los medios utilizados poseen una mayor concentración de nitratos. La concentración de fosfato obtenida en el estudio de Tocquin P fue de 4.5 mg/ml, en el presente trabajo se obtuvieron 2.52 mg/ml en medio RM y 1.20 mg/ml en medio BBM, estas concentraciones concuerdan con el estudio realizado por Tocquin, El análisis ANOVA realizado mostro diferencias significativas ($P=0.007$), observándose un mayor consumo en el medio RM, esto se puede explicar por el mayor crecimiento celular obtenido en este medio (45%)

El trabajo realizado mostró que los mejores resultados se obtuvieron con el medio RM a una intensidad de luz de 54W/827. Según el trabajo anterior las vitaminas son efectivas para el cultivo de *H. pluvialis* indicando la concentración más adecuada para la vitamina B12 ($12 \mu\text{g.L}^{-1}$). En el presente estudio se utilizó una concentración más baja ($0.0001 \mu\text{g.L}^{-1}$) en el medio BBM lo que puede explicar la poca efectividad del cultivo con este medio. Ya que comparando el crecimiento celular obtenido por Sipaubà (2.1×10^5) con el obtenido en el presente trabajo con medio BBM (1.0×10^5) se observa un menor crecimiento, esto podría ser tomado en cuenta en futuras investigaciones.

El experimento actual mostró que los mejores resultados se obtuvieron con los medios NPK y M + NPK a una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Como NPK y M + NPK contienen cinco vitaminas y el medio de cultivo WC contiene dos (B6-Biotina y B1-tiamina), los primeros son generalmente más caros. De acuerdo con Imamoglu et al. (2007), con respecto a las vitaminas, la tiamina se estableció como un factor de crecimiento para *H. pluvialis*, mientras que la B12 estimuló el crecimiento, aunque no esencialmente.

Las vitaminas son efectivas para el cultivo de *H. pluvialis*. Kaewpintong et al. (2007) informaron que la mejor concentración de B12 fue $12 \mu\text{g.L}^{-1}$. De

hecho, los resultados del estudio actual, basado en la concentración del complejo de vitamina B12, fueron $33 \mu\text{g.L}^{-1}$, mantuvieron la densidad celular durante la etapa vegetativa entre $0.1 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ y $2.1 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$. Los medios de cultivo NPK y M + NPK son más económicos que el medio de cultivo WC en términos de contener los constituyentes. La literatura no ha proporcionado ningún estudio experimental sobre el medio de cultivo M + NPK, excepto Sipaúba-Tavares et al. (2009).

Según el análisis de costos se encontró que el medio BBM genera mayores costos para su preparación esto se puede explicar ya que este medio contiene vitaminas (biotina, tiamina y vitamina B12) por esta razón este medio puede ser más costoso, haciendo al medio RM el más indicado para el cultivo de la microalga.

Con respecto al análisis de varianza ANOVA realizado no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados, lo cual nos indica que ambos medios de cultivo RM y BBM son adecuados para mejorar el proceso de cultivo de la microalga *H. pluvialis* a nivel del laboratorio, así mismo se debe tener en cuenta que las condiciones de cultivo establecidas por diferentes revisiones bibliográficas fueron las adecuadas para generar un buen crecimiento y por tanto una biomasa adecuada en cantidad y calidad.

6 CONCLUSIONES

- Las condiciones de cultivo adecuadas como pH 6.8 - 7.1, temperatura 20°C +/- 1°C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, luz blanca (lámparas Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad favorecen el crecimiento de la microalga al otorgar un ambiente óptimo para su desarrollo en los diferentes medios ensayados en el biorreactor a escala de laboratorio TECFERM 5 L.
- El cultivo de la microalga se llevó a cabo de manera adecuada en los medios RM y BBM, estos medios permiten un buen crecimiento celular 1.25×10^5 y 1.0×10^5 y producción de clorofila 3,98 mg/ml en medio RM y 3,39 mg/ml en BBM respectivamente gracias a su contenido de nutrientes, observándose un buen consumo de fosfatos y nitratos. Obteniéndose diferencias significativas para el consumo de fosfatos ($P < 0.05$), lo cual pudo influir en la obtención de un mejor crecimiento con el medio RM.
- La morfología celular varió entre células flageladas y células palmeloides sin llegar a células enquistadas, lo que nos indica que las condiciones y medios de cultivo utilizados en este estudio fueron favorables y no generaron estrés en el desarrollo de la microalga.
- El análisis de costos estableció que el medio menos costoso para el cultivo del *H. pluvialis* corresponde al BBM, con el que se obtuvo un buen crecimiento y una mayor cantidad de clorofila y mejor aprovechamiento de los micronutrientes.

RECOMENDACIONES

Utilizar el biorreactor Tecferm 5L, con las condiciones establecidas en este estudio para obtener los metabolitos de interés.

Seguir utilizando este biorreactor para otro tipo de investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M, Moreno D, Pérez J. Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia [Internet]. 2013 jun;30. [consultado: 27 mayo 2017]. disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/ambienteydesarrollo/article/view/6049>
2. Biblioteca digital. Moreno J, Evaluación del crecimiento y carotenogenesis de cuatro cepas de microalgas marinas bajo condiciones de estrés por iluminación a temperatura y salidas constantes [Internet]. [consultado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.bidi.uson.mx/TesisIndice.aspx?tesis=20804>
3. Medina Jasso, A., P. Piña Valdez, M. Nieves Soto, J.F. Arzola González y M. Guerrero Ibarra. La importancia de las microalgas. CONABIO. Biodiversitas, 103:1-5 [Internet]. 2012. [consultado: 11 abril 2017]. Disponible en: http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/_9_articulosrevistasdifusion/22.pdf
4. Cyanotech Corporation. Lorenz T. A technical review of Haematococcus Algae. [Internet]. 1999. [consultado 11 abril 2017] Disponible en: <https://www.cyanotech.com/pdfs/bioastin/axbul60.pdf>
5. Rost EJ, Perez LB, Cartens MR, Perales SG. producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor discontinuo en escala piloto de configuración variable en régimen de incremento lineal de la concentración. [Internet]. 2013. [consultado 26 abril 2017] Disponible en: http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/04_025/papers/02a/02a_1487_520.pdf
6. Cifuentes A, Gonzales M, Vargas S, Hoeneisen M. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Biol Res 2011; 36: pp. 343-357
7. Tsang S K. Optimal harvesting strategy for Haematococcus pluvialis using a stella-based model [Internet]. 2004. [consultado 26 abril 2017] Disponible en: http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/handle/10125/10395/uhm_ms_3938_r.pdf?sequence=1

8. Garcia M C, Del Rio E, Casas J, Fernández F, Fernández J, Rivas J, et al. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors [Internet]. 2006 [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: https://www.academia.edu/4108592/Comparative_analysis_of_the_outdoor_culture_of_Haematococcus_pluvialis_in_tubular_and_bubble_column_photobioreactors
9. Gonzales M, Cifuentes A, Gómez P. Growth and total carotenoid content in four chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. [Internet]. 2009. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/4796/1/Tesis%20JORGE%20%20SANCHEZ%20MARTINEZ.pdf>
10. Choi Y, Yeoung-Sang Y, Moon J, Ji-Won Y. Multistage Operation of Airlift Photobioreactor for Increased Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of microbiology and biotechnology*
11. Tocquin P, Fratamico A, Fabrice F, Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. [Internet]. 2011. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <https://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/103905/1/2011-JAPH-2.pdf>
12. Ramirez D. Universidad Nacional de Colombia. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. [Internet]. 2013. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/Proyecto.xhtml?idProyecto=11978>
13. Galvao R, Santana T, Fontes C, Sales E. Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Research*. Agosto 2013, 4: pp 50-56
14. Sipaùba L, Millan R, Berchirlli F. Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Brazilian Journal of Biology*. Agosto 2013; 73(3), pp 585-591
15. Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*. 2014, pp 329-335

16. Santhos B, Elumalai S, Kanna G. Airlift Photobioreactor Cultivation of a New Strain of *Haematococcus pluvialis* Collected from High Altitude Regions of Himalayas. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2014; 3, pp 2289-2289
17. Sipaùba L, Berchielli F, Scardoeli B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*. 2015; 75(4): pp 796-803
18. Granada P, Granada R. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2015. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015_04%28S%29.pdf
19. Niño C, Rodríguez F. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO CELULAR Y FACTORES DE ESTRÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca, Septiembre 2015.
20. Litao Z, Fang S, Chunhui Z, Fengying G, Jianguo L. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. [Internet]. 2016. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297668/>
21. Cajamar ADN Agro, ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. [Internet]. 2015. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.fundacioncajamar.es/pdf/bd/comun/transferecia/microalgas-1444391623.pdf>
22. Cordoba N, Acero N, Duque L, Jimenez L, Serna J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis* [Internet]. 2015. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjioXO3tbTAhVL6iYKHSq8A0AQFgg7MAM&url=http%3A%2F%2Frevistas.ugca.edu.co%2Findex.php%2Fugciencia%2Farticle%2Fdownload%2F426%2F729&usq=AFQjCNEW2Plbhri_XazkF_Idvx2BKj-1A
23. Thalga la beaute marine, Thalga Alemania. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.thalga.es/algues/index.0-h.html>

24. Instituto tecnológico de Sodora, Mc Gahey L, Uzziel A. Produccion de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. [consultado 07 de septiembre de 2017]. Disponible en <https://es.scribd.com/document/333299378/Haematococcus-pluvialis-1>
25. Mahfuzur R, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*. Abril 2016; 531(7): pp 5-8
26. Anónimo. Cuantificación de clorofila a. [Internet]. [consultado 07 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjft4STusnWAhUBXyYKHYYQ6DqgQFgg0MAI&url=http%3A%2F%2Fwww.cofes.org.ar%2Fdescargas%2Frelas%2F5_jornada%2F4_CLOROFILA.pdf&usg=AFQjCNEMS UW5arxW-6mzz_XiPeP-RvPYZg
27. Ecosistemas. Manrique E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>
28. Richmond A. Handbook of Microalgal Culture. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=SM6m4GZ_Ok0C&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+Microalgal+Culture+Amos+Richmond&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook+of+Microalgal+Culture+Amos+Richmond&f=false
29. V. Lallana, M. Lallana. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal [Internet]. 2003. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwib55MvsnWAhUFMyYKHVRVAPQQFggI MA A&url=http%3A%2F%2Fwww.fca.uner.edu.ar%2Ffiles%2Facademica%2Fdeptos%2Fcatedras%2Ffisiologiaveg%2Fm_didactico%2Fmanual_practicas%2FCrecimiento_AED.pdf&usg=AFQjCNGOjOcutOP7e1z PzyqChtWZuFegmQ
30. Nivia S. Nivia, R Luis, Q leila, L Eduardo, Q María, Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. [Internet]. 2015. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwin7qGjv8nWAhUDZCYKHa4AD>

V8QFggI MA A&url=http%3A%2F%2Fwww.uteq.edu.ec%2Frevistacyt%2Fpublico%2Farchivos%2FC2_V8%2520N2%25203Streit%2520et%2520al.pdf&usg=AFQjCNGbOsTxJeiJ8fucyKOMV2uScjFQjg

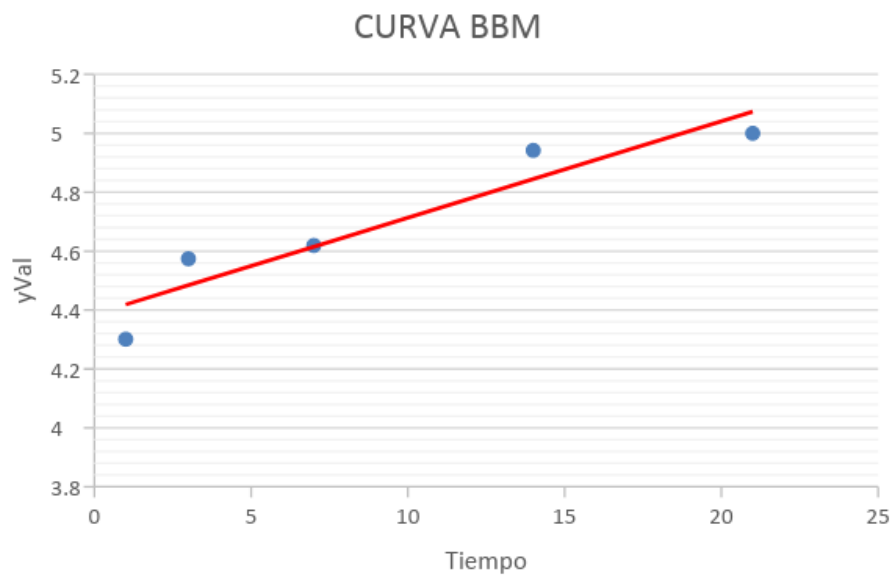
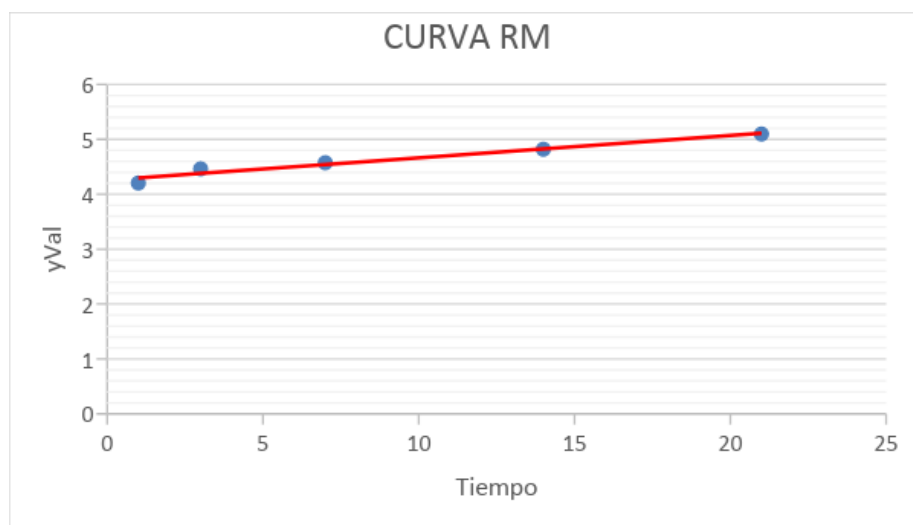
31. Andex Biothechnology, FRANKLIN STREET 567, MANHATTAN, NEW YORK, USA. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.andexs.org/lineas-de-investigacion/haematococcus-pluvialis/>
32. Albade J, Orosa M, Torres E, Cid A. LA MICROALGA Haematococcus COMO FUENTE DE ASTAXANTINA. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10777/CC%2048%20art%205.pdf?sequence=1>
33. Gómez L, Moreno B, Velásquez M, Aguirre C, Aguado G. CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN. ESTABLECIMIENTO Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN. 2014; 37(2): pp 166,167
34. Hernandez A, Labbè J. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2014; 49(2): pp 157-173
35. University of Waterloo, Waterloo ON, Canada [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/bolds-basal-medium>
36. Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Universidad de Almería [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>
37. Lopez F, Rojas R. Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. [Internet]. 2010. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6563/2/133250.pdf>
38. K Kamonpan, S Artiwan, P Sorawit, P Prasert Pavasant. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of Haematococcus pluvialis in airlift bioreactor. Bioresource Technology. 2007; 98: pp 288-295.
39. Zuluaga D. Curso: operación fermentador Tecferm 5L

40. J Cristhian. Microbiología predictiva: una ciencia en auge. . [Internet]. 2013. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/312656779_Microbiologia_predictiva_Una_ciencia_en_auge
41. L. Santtiesteban, A. Lopez. Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramienta para la conservación de alimentos. Temas selesctos de ingeniería de alimentos. 2008; pp 14-26
42. M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. Asian Journal of Plant Biology 2014; 2 (1): pp. 01-06
43. Hernandez R, Fernandez C, Baptista P. Metodología de la investigación. México McGRAWHILLIINTERAMERICMA Biocyclopedia; 2003 [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: http://www.eplantscience.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvo_x_medium_composition.php
44. Biocyclopedia [Internet]. 2012. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: http://www.eplantscience.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvo_x_medium_composition.php
45. Imamoglu E, Vardar F, Conk. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. International Journal of Natural and Engineering Sciences. 2007; 1 (3): pp. 05-09
46. Universidad Autónoma de Tamaulipas, tutorial de análisis de agua. México [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://arturobola.tripod.com/ph.htm> López-Roldán P. Efecto del consumo de Astaxantina en la salud. 2014.

ANEXOS

ANEXO 1

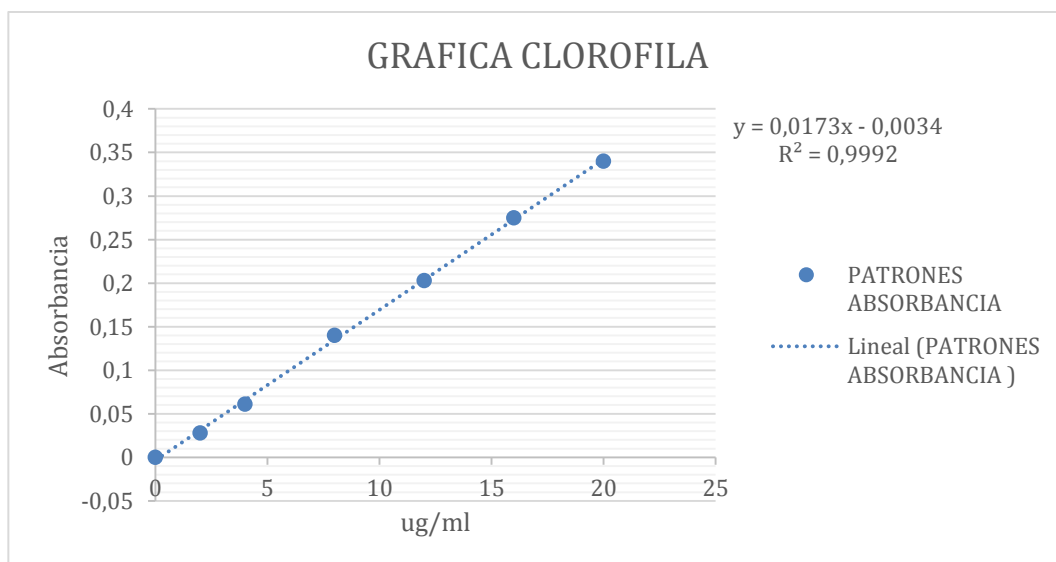
AJUSTE DE DATOS PARA CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS MEDIOS RM Y BBM



ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

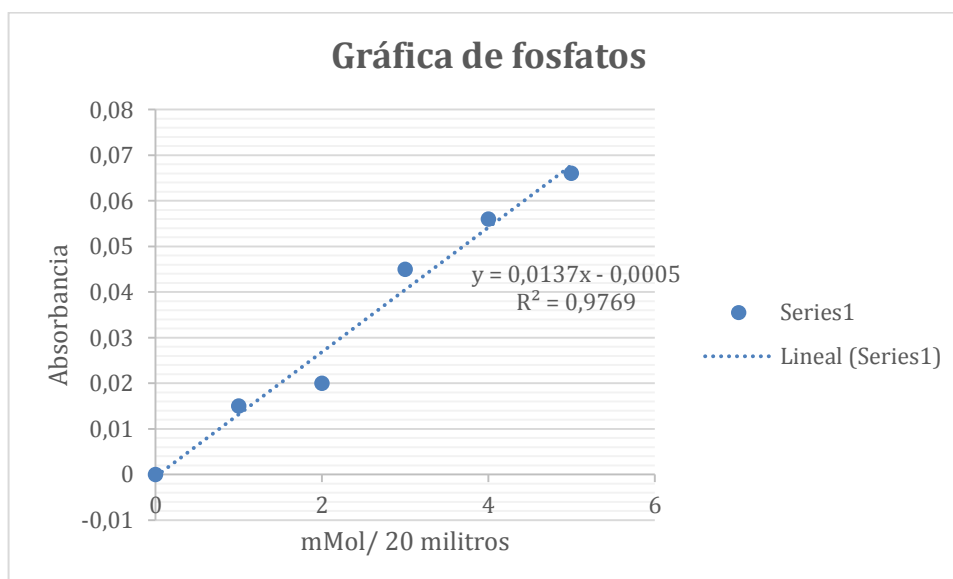
DATOS CURVA CALIBRACIÓN	
Concentración (µg/mL)	A = 667 nm
2	0,028
4	0,061
8	0,140
12	0,203
16	0,275
20	0,340



ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE FOSFATOS

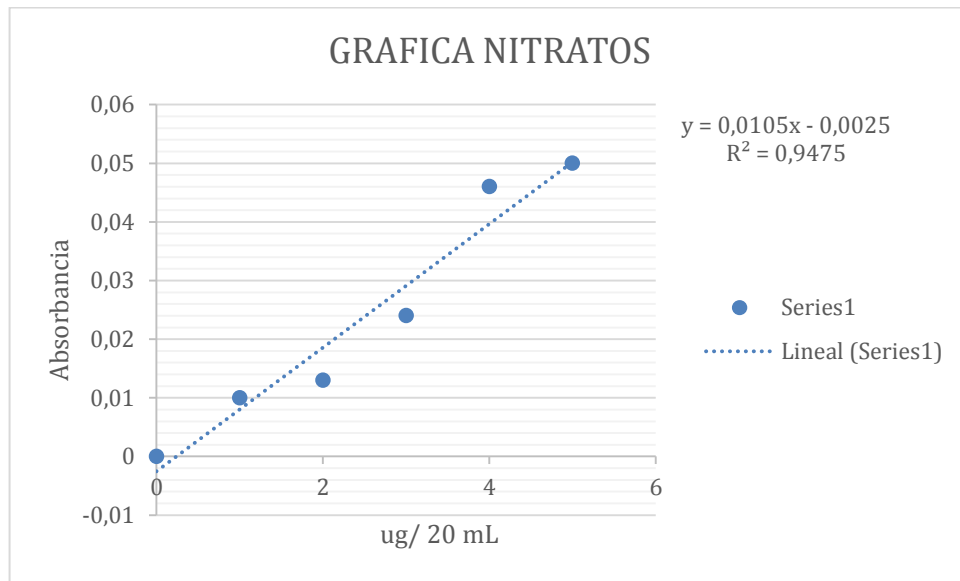
DATOS CURVA CALIBRACIÓN	
Concentración ($\mu\text{Mol}/20\text{ ml}$)	A
0	0
1	0.015
2	0.02
3	0.045
4	0.056
5	0.066



ANEXO 4

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS

DATOS CURVA CALIBRACIÓN	
ug/ 20 mL	A
0	0
1	0.01
2	0.013
3	0.024
4	0.046
5	0.05
0	0



ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CRECIMIENTO CELULAR

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
RM	5	273500	54700	1.9E+09
BBM	5	286600	57320	1.2E+09

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	17161000	1	17161000	0.01117	0.9184	5.3176551
Dentro de los grupos	1.229E+10	8	1536118500			
Total	1.231E+10	9				

ANEXO 6

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
RM	5	8.57664234	1.71532847	2.13650168
BBM	5	12.2992701	2.45985401	0.82955938

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.38579573	1	1.38579573	0.93443506	0.3620231	5.31765507
Dentro de los grupos	11.8642442	8	1.48303053			
Total	13.25004	9				

ANEXO 7

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CONCENTRACION DE FOSFATOS

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
RM	5	20.3284672	4.06569343	2.11359156
BBM	5	8.43065693	1.68613139	0.11614897

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	14.1557888	1	14.1557888	12.6972521	0.00736499	5.31765507
Dentro de los grupos	8.91896212	8	1.11487026			
Total	23.0747509	9				

ANEXO 8

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CONCENTRACIÓN DE NITRATOS

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
RM	5	148.302752	29.6605505	1474.22103
BBM	5	36.4154653	7.28309305	23.6111339

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1251.8765	1	1251.8765	1.67158449	0.23213231	5.31765507
Dentro de los grupos	5991.32864	8	748.91608			
Total	7243.20514	9				

ANEXO 9

CUADRO COMPARATIVO DE CONDICIONES DE CULTIVO EN DIFERENTES BIORREACTORES

Fermentador	Medio de cultivo	condiciones	Evaluación de medios de cultivo	Biomasa obtenida cel/mL	Referencia
fotobiorreactor de burbujeo de escala piloto Flujo restringido: 15L Flujo total: 22L	Phaeodactylum tricoratum y Tetraselmis sp Mantenimiento de cepas: Erdschreiber	Aire: 200 L/min CO ₂ : 5L/min Luminicencia: sistema de luz artificial, con tubos fluorescentes de luz blanca de 30 W cada distribuidos uno alrededor del FBR, irradiancia promedio máxima disponible de 180 $\mu\text{E}/(\text{m}^2.\text{s})$. Fotoperiodo de 16 hs con una intensidad lumínica de 120 $\mu\text{E}/(\text{m}^2.\text{s})$. Temperatura: 21 °C Repiques cada 25 días	Concentración de biomasa obtenida: se determina por técnica turbidimétrica mediante un fotómetro Hach modelo DR2010 y por peso seco de biomasa deshidratada	2 g/l y 2.5 g/l	5

<p>Fotobiorreactor tubular y de columna de burbujas de 2L</p>	<p>medio de cultivo libre de acetato</p>	<p>Los fotobiorreactores se burbujearon con aire a 1,0 v / v / min, Temperatura: 20 ° C por agua termostatica pH: 8.0 por inyeccion de CO2 La irradiancia varió de 50 A 2000 Em⁻² s⁻¹ La concentración de nitrato osciló entre 3,0 y 15,0 mM Se conectaron a un sistema de adquisición de datos para el registro en línea de medición y control Se realizaron 8 cultivos discontinuos a escala de laboratorio</p>	<p>El número de células en los cultivos se determinó en una cámara de recuento de Neubauer La concentración de biomasa se determinó mediante mediciones de peso seco. Para este propósito, se filtraron 50 ml de cultivo a través de un filtro de 0,45 μm Whatmann, se lavó con HCl 0,1 N y secado al horno a 80 ° C durante 24 h. El contenido de clorofila fue determinado por el método de Mackinney (1941), después de disrupción de células por sonicación durante 5 minutos y extracción con metanol a 40 ° C durante 1 h. El contenido total de carotenoides se determinó por espectrofotometría mediante el método de Davies (1976), después de la interrupción de las células por sonicación durante 5 min y extracción con acetona durante 3 h.</p>	<p>3937500</p>	<p>8</p>
---	--	---	---	----------------	----------

	Medio Bristol	Temperatura: 22°C +/-1 Agitación manual dos veces al día sin aireación Dos PFD continuos 20 y 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (suministrados por lámparas fluorescentes diurnas frescas) densidad celular inicial: 1000 cel/mL	El crecimiento celular se monitorizó durante un período de 14 días por recuento celular usando cámaras de Utermöhl de 1 ml y microscopio invertido Zeiss		9
Fotobiorreactor marca airlift	Medio OHM	Temperatura 22 °C Agitador rotado a 180 rpm Iluminación continua con intensidad de 50 $\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con tubos fluorescentes blancos cálidos de 20 vatios Dioxido de carbono : 5%			10
fotobiorreactor tipo airlift.	medio BBM , BG11, OHM, F1, BBM:BG 11	Temperatura: 24 +/- 2 Cº Luminancia: lámparas fluorescentes Sylvania Daylight F48T12/D de 39W, fotoperiodo de 12:12 Luz:oscuridad Aireación: 0.5 vvm, aire atmosférico filtrado con membrana de 0.22 μm Concentración inicial: 4,0 x 10 ⁴ Cel/mL	Se evaluaron 5 medios de cultivo: BBM, BG11, OHM, F1, BBM: BG11 Ensayos por triplicado utilizando inóculo inicial de 4x10 ⁴ Cel/mL Cuento celular a diario en cámara de Neubauer y peso seco	4,02 - 4,16 x 10 ⁵ cel/mL.	12
Fotobiorreactores de placas planas de 4 L.	Medio Rudic RM	Temperatura: 22 +/- 1 °C Luminancia: rango de intensidad de luz, desde 2000 a 10000 lux Vol de reacción: 3.5 L de los cuales el inóculo constituía el 10% pH: 6.5 a 12.5	Se evaluó el crecimiento en medio rudic RM Ensayos por duplicado, conteo en cámara de Neubauer	2000 lux: 136,265	13
fotobiorreactor tubular al aire libre	Medio de cultivo MCM	Temperatura: 17-21 °C			20

ANEXO 10

PROMEDIO, DESVIACION ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTUDIADOS DURANTE EL CULTIVO

CRECIMIENTO CELULAR		
	RM	BBM
PROMEDIO	54700	57320
DESVIACION ESTANDAR	43369,92045	34515,0257
COEFICIENTE DE VARIACION	1880950000	1191287000

CLOROFILA		
	RM	BBM
PROMEDIO	1,72	2,46
DESVIACION ESTANDAR	1,46167769	0,9108015
COEFICIENTE DE VARIACION	2,13650168	0,82955938

FOSFATOS		
	RM	BBM
PROMEDIO	4,07	1,69
DESVIACION ESTANDAR	1,45381965	0,34080635
COEFICIENTE DE VARIACION	2,11359156	0,11614897

NITRATOS		
	RM	BBM
PROMEDIO	29,66	7,28
DESVIACION ESTANDAR	38,395586	4,85912893
COEFICIENTE DE VARIACION	1474,22103	23,6111339

Ph		
	RM	BBM
PROMEDIO	6,82266667	6,384
DESVIACION ESTANDAR	0,11148991	0,0571742
COEFICIENTE DE VARIACION	0,01243	0,00326889