



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

PRODUCCIÓN MIXOTRÓFICA DE HIDRÓGENO USANDO LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* G120 CRECIENDO EN AGUA DE DESCARGA DE CAÑA DE AZÚCAR Y PURINES PORCINOS.

Informe de Proyecto Final de Graduación presentado a la Facultad de Ingeniería como requisito para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas.

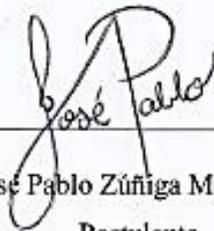
José Pablo Zúñiga Moreno

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2022

Sometido a la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Costa Rica como requisito para optar por el grado académico de: LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DE BIOSISTEMAS.



Ing. José Pablo Zúñiga Moreno, Bach.
Postulante



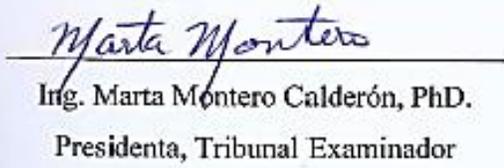
Ing. Ronald Esteban Aguilar Álvarez, PhD.
Director Proyecto Final de Graduación



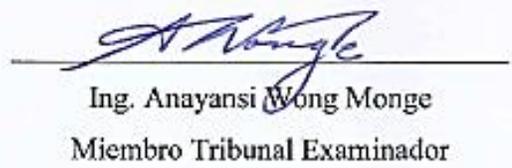
Margarita Silva Benavides, PhD.
Comité asesor



Giuseppe Torzillo, PhD.
Comité Asesor



Ing. Marta Montero Calderón, PhD.
Presidenta, Tribunal Examinador



Ing. Anayansi Wong Monge
Miembro Tribunal Examinador

Dedicatoria

A Sol.

Quien me da energía.

A mi familia, y los que se convirtieron en ella.

Quienes me dieron lo necesario para completar mi carrera universitaria.

Agradecimientos

A Giuseppe Torzillo y Margarita Silva, ambos lectores de la investigación y científicos extraordinarios que me encaminaron desde el inicio hasta el final para completar este proyecto.

A Ronald Aguilar, director de esta investigación, por incentivar me con sus clases de Ingeniería Ambiental a buscar una nueva forma de reciclar nutrientes, motivación principal de este proyecto.

A Ensio Pérez, técnico del taller de Ingeniería de Biosistemas por el apoyo brindado que fue indispensable para realizar los experimentos.

A Anayansi Wong por la orientación para el diseño experimental y estadístico, por los análisis de los compuestos de los purines, y por muchos consejos más.

A la Escuela de Ingeniería de Biosistemas y al Centro de Investigaciones en Ciencias del Mar y Limnología por facilitarme los medio, materiales y laboratorios para las pruebas del proyecto.

Al sistema de becas de la Universidad de Costa Rica, por darme las herramientas necesarias para mantenerme estudiando desde el inicio.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos por los análisis de residuos de azúcares y ácidos volátiles mostrados en esta investigación.

Al Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química por los análisis de contenido de hidrógeno del biogás producido mostrados en esta investigación.

Resumen

Esta investigación motivada en la economía circular evaluó una nueva forma de revalorizar la melaza de caña de azúcar y los purines porcinos, ambos subproductos agrícolas. Estos se probaron como una fuente revalorizable de nutrientes para intentar sustituir la glucosa pura y el nitrato de potasio respectivamente, ambos insumos de uso tradicional necesarios para la producción de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* cepa G120. Esto con el fin de intentar volver más rentable una emergente tecnología de producción de biogás rico en hidrógeno con potencial biocombustible aprovechando el metabolismo de esta microalga. Así mismo, a la vez que se reduce la carga contaminante de dichos subproductos agrícolas que son generalmente aguas de descarga.

En una primera etapa se evaluó la capacidad de crecimiento microalgal y la concentración de clorofila en células de la *Chlorella vulgaris* cuando se usó los medios nutritivos tradicionales con glucosa y nitrato de potasio. Esto bajo las tres rutas tróficas posibles de la microalga: autotrofia (usando solamente minerales (K3)), mixotrofia y heterotrofia (usando glucosa con minerales (GM)). Se obtuvieron los siguientes rendimientos en términos de biomasa microalgal seca, de mayor a menor, con la mixotrofia (5.58 ± 0.31 g/L), la heterotrofia (4.23 ± 0.12 g/L) y la autotrofia (1.05 ± 0.05 g/L). Y una concentración de clorofila en las células con autotrofia ($4.56 \pm 1.36\%$) fue significativamente mayor que en mixotrofia ($2.01 \pm 0.23\%$) y heterotrofia ($1.22 \pm 0.17\%$), siendo estas últimas sin diferencias significativas. En las pruebas de mixotrofia y heterotrofia la glucosa se consumió completamente. Estos resultados demuestran la capacidad de la microalga de seguir acumulando biomasa aprovechando la energía de carbohidratos exógenos para crecer cuando necesita dispensar parcial o completamente de la luz, lo cual es importante de demostrar pues en la siguiente etapa se pretendía utilizar la melaza como fuente revalorizada de carbohidratos, la cual presenta la fuerte desventaja de tener una importante opacidad que podía significar una reducción de la capacidad fotosintética de las microalgas.

Entonces, una vez verificado que la *Chlorella vulgaris* aprovecha la glucosa para crecer en oscuridad, en una segunda etapa se evaluó nuevamente el crecimiento microalgal y concentración de clorofila en las células, pero solamente en mixotrofia y heterotrofia, y ahora reemplazando la glucosa con la melaza, y el nitrato de potasio con los purines porcinos. Se evaluaron entonces tres medios nutritivos alternativos: melaza con minerales (MM), melaza con minerales, pero reemplazando el nitrato de potasio con purines (MP) y glucosa con minerales, pero reemplazando el nitrato de potasio con purines (GP). Se usó 24.0 g/L de melaza y 109.0 ml/L de purines para intentar reemplazar respectivamente los 10

g/L de glucosa y los 2 g/L del nitrato de potasio. Se encontró que, comparando los mismos medios nutritivos, pero entre las dos diferentes rutas metabólicas, siempre en mixotrofia se produjo más biomasa que en heterotrofia, teniendo el mismo comportamiento en ambas rutas metabólicas de un mayor rendimiento cuando se usó MM y el menor rendimiento con MP, quedando el rendimiento cuando se usó GP entre ambos. Las mayores concentraciones de clorofila en las células se obtuvieron usando MM tanto en mixotrofia como heterotrofia ($1.14 \pm 0.09\%$ y $0.98 \pm 0.04\%$ respectivamente) y los niveles más bajos cuando se usó los medios con purines (GP, MP) en ambas rutas metabólicas. Al evaluar el efecto de la opacidad de la melaza se encontró que duplicar la cantidad de luz solamente incrementa la concentración de clorofila en las células de $1.15 \pm 0.15\%$ a $1.55 \pm 0.12\%$, pero no aumenta el crecimiento microalgal (3.88 ± 0.20 g/L y 4.13 ± 0.14 g/L). Estos resultados demuestran que las microalgas son capaces de metabolizar los azúcares de la melaza para crecer, lo cual era necesario demostrar para evaluar este insumo en la siguiente etapa de producción de hidrógeno. Los purines evaluados no demostraron ser un buen sustituto del nitrato de potasio, y por el contrario se podría suponer que están asociados a una baja acumulación de clorofila.

Tras todos los experimentos realizados en esta segunda etapa hubo una remoción casi completa de los azúcares de la melaza y de compuestos nitrogenados de los purines, por lo que desde el punto de vista biorremediativo se logró reducir considerablemente la carga contaminante de ambos subproductos agrícolas, logrando reciclar estos nutrientes en la producción de biomasa microalgal.

En una última etapa se evaluó la producción de hidrógeno únicamente en mixotrofia, comparando los medios nutritivos alternativos MM y MP contra el medio nutritivo tradicional GM. El mayor rendimiento volumétrico de biogás producido se obtuvo con GM acumulando 966.7 ± 38 mL, del cual 190 ± 13 mL eran de hidrógeno (19.6% de pureza), obteniendo un rendimiento de 1.07 ± 0.07 mg de hidrógeno por gramo de glucosa empleado en el medio. Con el medio sustituto MM se produjo 450.0 ± 23.0 mL de biogás, del cual 50.0 ± 3.0 mL eran de hidrógeno (11.1% de pureza), obteniendo un rendimiento de 0.12 ± 0.007 mg de hidrógeno por gramo de melaza empleado en el medio. Esto demostró la capacidad de esta microalga de transformar los azúcares, incluso de la melaza, en un biogás con hidrógeno. Tras evidenciar una muerte prematura de las microalgas en los experimentos con el medio MP, se podría suponer que utilizar purines para la producción de hidrógeno es tóxico, posiblemente por la alta concentración de cloro que tenían debido al uso de este en la limpieza de los corrales, o por la transformación del amonio en amoniaco que no podía escapar de forma gaseosa y es altamente tóxico para las microalgas.

Índice general

1	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 Justificación.....	2
	1.2 Alcance del proyecto.....	5
	1.3 Objetivos del proyecto.....	6
	1.3.1 Objetivo general.....	6
	1.3.2 Objetivos específicos.....	6
2	MARCO TEÓRICO.....	7
	2.1 Microalgas.....	7
	2.2 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> cepa G120.....	9
	2.3 Rutas metabólicas presentes en la <i>Chlorella vulgaris</i> G120.....	9
	2.3.1 Vía fotosintética.....	9
	2.3.2 Respiración.....	10
	2.3.3 Vía mixotrófica.....	11
	2.4 Condiciones de cultivo para crecimiento de la <i>Chlorella vulgaris</i> cepa G120.....	11
	2.5 Papel de los nutrientes sobre el crecimiento de la <i>Chlorella vulgaris</i> cepa G120.....	12
	2.6 Condiciones de cultivo para producción de hidrógeno de la <i>Chlorella vulgaris</i> cepa G120	13
	2.7 Cadena energética intracelular en la producción de hidrógeno en microalgas mixotróficas	13
	2.8 Melaza: propiedades químicas y físicas.....	15
	2.9 Purines porcinos: propiedades químicas y físicas.....	16
3	METODOLOGÍA.....	18
	3.1 Obtención y escalamiento de la <i>Chlorella vulgaris</i> G120 para los experimentos.....	19
	3.1.1 Escalamiento del cultivo.....	19

3.1.2	Cálculo de concentración inicial de células de microalga para los diversos experimentos	19
3.2	Comparación de crecimiento entre las rutas nutritivas (autotrofia, heterotrofia o mixotrofia) de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 con medios tradicionales de laboratorio	20
3.2.1	Preparación de medios nutritivos tradicionales K3 y de fermento	20
3.2.2	Biorreactores para crecimiento del cultivo	22
3.2.3	Pruebas para medir crecimiento del cultivo	24
3.2.4	Análisis de azúcares y metabolitos residuales	25
3.2.5	Diseño experimental y análisis estadístico para crecimiento con medios nutritivos tradicionales de laboratorio	25
3.3	Evaluación purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de energía para producción de biomasa de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120	26
3.3.1	Melaza de caña y su caracterización	26
3.3.2	Efluente porcino y su caracterización	27
3.3.3	Preparación de los medios alternativos con melaza como glucosa y purines porcinos como nitrato de potasio	27
3.3.4	Análisis de azúcares, metabolitos y nitrógeno residual	29
3.3.5	Diseño experimental y análisis estadístico para crecimiento con medios alternativos.	29
3.4	Producción de hidrógeno	30
3.4.1	Aclimatación del cultivo y condiciones iniciales	30
3.4.2	Biorreactores para producción de hidrógeno	31
3.4.3	Medición volumétrica del biogás producido	32
3.4.4	Análisis de composición del biogás producido	32
3.4.5	Diseño experimental y análisis estadístico para producción de hidrógeno con diferentes medios	32
4	RESULTADOS	33

4.1	Crecimiento microalgal y concentración de clorofila en células bajo las rutas tróficas autotrofia, heterotrofia y mixotrofia con la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 cuando se usó medios nutritivos tradicionales de laboratorio.....	33
4.2	Crecimiento biomasico de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 con purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos y su efecto biorremediativo	37
4.2.1	Efecto de la luz sobre la mixotrofia con melaza.....	43
4.2.2	Reciclaje de los compuestos nitrogenados de los purines porcinos y de los azúcares de la melaza de caña durante el crecimiento microalgal como parámetro biorremediativo de tanto en mixotrofia y como en heterotrofia.....	46
4.3	Producción de hidrógeno por la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y los purines porcinos como medio de crecimiento. ...	47
4.3.1	Aclimatación del cultivo.....	48
4.3.2	Rendimientos de volumen de biogás producido.....	48
4.3.3	Concentración de hidrógeno detectado en el biogás producido	50
5	Discusión de resultados	52
5.1	Crecimiento de biomasa para las rutas nutritivas autotrofia, heterotrofia y mixotrofia con la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 cuando se usó medios tradicionales de laboratorio.....	52
5.2	Crecimiento biomasico de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 con purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos y su efecto biorremediativo	54
5.3	Cuantificación de la cantidad de hidrógeno producido por la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y los purines porcinos como medio de crecimiento.	58
5.3.1	Aclimatación del cultivo.....	58
5.3.2	Producción de hidrógeno con la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> G120.....	59
5.3.3	Volumen y concentración de hidrógeno del biogás producido	60
6	CONCLUSIONES.....	63

6.1 Determinar bajo cual ruta nutritiva (autotrofia, heterotrofia o mixotrofia) la microalga *Chlorella vulgaris* G120 tiene un mejor crecimiento cuando se usó medios nutritivos tradicionales de laboratorio 63

6.2 Evaluar agua de descarga de una chanchera, como fuente de nutrientes, y melaza de caña de azúcar, como fuente de carbohidratos, para producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 en mixotrofia y heterotrofia, y evaluar reducción compuestos nitrogenados y azúcares como parámetros biorremediativos..... 63

6.3 Cuantificar la cantidad de hidrógeno producido por la microalga *Chlorella vulgaris* G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y el agua porcina como medio de crecimiento. 64

7 RECOMEDACIONES 66

8 BIBLIOGRAFIA 68

9 ANEXOS**Error! Bookmark not defined.**

9.1 Desarrollo de la ecuación 6 y 7 para determinar cantidad de melaza y amonio a utilizar.

79

Índice de figuras

Figura 1 Cinética de crecimiento y reproducción de microalgas.....	8
Figura 2 Rutas energéticas hacia la hidrogenasa; dependiente e independiente de la luz	15
Figura 3 Biorreactores para medir crecimiento con los controladores de variables	23
Figura 4 Sistema de Biorreactores para producción y medición de biogás producido.	31
Figura 5 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia)	33
Figura 6 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia)	34
Figura 7 Porcentaje de clorofila en las células de microalgas con base en la biomasa seca.	35
Figura 8 Clorofila total y biomasa seca alcanzados al final de cada experimento para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia)	36
Figura 9 Biomasa seca y clorofila total alcanzados al final de cada experimento para heterotrofia y mixotrofia con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM) y alternativos de melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP).....	38
Figura 10 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos de mixotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP).....	40
Figura 11 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de mixotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)	41
Figura 12 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos de heterotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP).....	42
Figura 13 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de heterotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)	42

Figura 14 Absorbancia del medio con melaza y del medio con glucosa para el espectro visible aprovechable por las microalgas	43
Figura 15 Cambio en la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos de mixotrofia con melaza con minerales y luz a una cara del reactor (MM); y melaza con minerales y luz en las dos caras del reactor (MM 2luz)	44
Figura 16 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de mixotrofia con melaza con minerales y luz a una cara del reactor (MM); y melaza con minerales y luz en las dos caras del reactor (MM 2luz)	45
Figura 17 Cambio en el volumen de biogás producido por los tres biorreactores usando melaza como sustituto de la glucosa.	49
Figura 18 Cambio en el volumen de biogás producido en los tres biorreactores usando el medio tradicional de fermento.	50

Índice de tablas

Tabla 1 Propiedades físicas y composición química de la melaza.....	15
Tabla 2 Concentración por litro de diferentes compuestos del medio nutritivo mineral K3	21
Tabla 3 Concentración de diferentes compuestos del medio nutritivo de fermento	22
Tabla 4 Residuos analizados del medio tras las pruebas de mixotrofia y heterotrofia	36
Tabla 5 Porcentaje de biomasa microalgal seca y clorofila en el cultivo alcanzado con los tres medios alternativos (MM, MP, GP) respecto al alcanzado con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM, 100%) para cada ruta metabólica.	39
Tabla 6 Porcentaje de clorofila en las células respecto a la biomasa microalgal seca al final de cada experimento para mixotrofia y heterotrofia y los diferentes medios alternativos evaluados.....	39
Tabla 7 Porcentaje de clorofila en las células respecto a al peso seco durante cada experimento, con una y dos luces, de mixotrofia usando melaza y minerales tradicionales.....	45
Tabla 8 Cambio en la concentración de nitrato y amonio tras el crecimiento para medios de fermento y alternativos con purines en mixotrofia y heterotrofia	46
Tabla 9 Residuos analizados del medio tras las pruebas de mixotrofia y heterotrofia con medios alternativos	47
Tabla 10 Resumen de los resultados obtenidos de volumen de biogás producido y su concentración de hidrógeno.....	51

1 INTRODUCCIÓN

Una de las principales ramas novedosas de la ingeniería en biosistemas y de las ciencias biológicas es reducir el impacto que tienen las grandes industrias agropecuarias y las actividades humanas sobre la naturaleza, desarrollando y optimizando tecnologías bajo el enfoque de economía circular y bioeconomía. Esto para obtener un máximo provecho de los recursos naturales utilizados en la producción de los alimentos, principalmente revalorizando los subproductos.

Entre los principales recursos utilizados por los humanos están el agua y la energía. El agua se utiliza para el riego de cultivos, crianza de animales, lavados de espacios e higiene humana y por lo general, el subproducto de estas actividades es un efluente que puede contaminar cuerpos de agua naturales si no es tratado adecuadamente. En cuanto a consumo de energía, entre los principales demandantes también está implicada la industria alimentaria, pero principalmente los hidrocarburos utilizados para los medios de transporte de humanos, que como veremos más adelante es uno de los principales puntos a mejorar en nuestro país, incluyendo aquí también la maquinaria agrícola.

La presente investigación, con enfoque de revalorización de subproductos agrícolas, evalúa una forma novedosa de reducir la carga contaminante de efluentes agrícolas extrayendo energía en el proceso basándose en la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris*, cepa G120 de producir hidrógeno. Estos efluentes son los vertidos del lavado de un establo porquerizo, usado como fuente de nutrientes, y la melaza de caña de azúcar, usada como fuente de carbohidratos.

Lo novedoso de la *Chlorella vulgaris* G120 es que se ha evidenciado que tiene una relación respiración/fotosíntesis muy alta, lo que potencia no solo la producción de hidrógeno al poder obtener más energía del medio, sino que puede alcanzar la anaerobiosis rápidamente al consumir el oxígeno de la fotosíntesis para la oxidación de carbohidratos. Con cepas estudiadas anteriormente que no tiene esta capacidad existe el problema de que el oxígeno de fotosíntesis inhibe la producción de hidrógeno.

Para producir hidrógeno es necesario tener suficiente biomasa de *Chlorella vulgaris*. Por lo que esta investigación ofrece resultados de producción de biomasa de esta microalga bajo las diferentes rutas metabólicas: fotosíntesis, respiración o ambos simultáneamente (mixotrofia), cuando se usó tanto medios nutritivos minerales como los medios nutritivos alternativos con melaza y purines porcinos. También resultados de producción de hidrógeno con los medios nutritivos alternativos, y una metodología detallada de la aclimatación y puesta en marcha del cultivo para conseguir que produzca el hidrógeno.

1.1 Justificación

El incremento de la demanda energética para consumo humano también implica un aumento de la contaminación medioambiental. Costa Rica es reconocido mundialmente como país verde pues genera el 98% de la electricidad de fuentes renovables [1], pero cuando se considera toda su matriz energética incluyendo el transporte, un 72.9 % es alimentada de derivados de petróleo [2], demostrando así la importancia de descarbonizar el sector transporte. Los motores tradicionales alimentados con derivados del petróleo liberan cuantiosas cantidades biogases, principalmente dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), metano (CH_4), clorofluorocarbono (CFC), ozono (O_3) y hexafluoruro de azufre (SF_6), que se acumulan en la atmosfera promoviendo el Efecto Invernadero. Este fenómeno implica acontecimientos meteorológicos extremos [3] que comprometen recursos como el agua y que a su vez ponen en riesgo el desarrollo humano. A nivel mundial se estima que las emisiones de estos gases, solamente del sector energía, incrementen de 32.3 mil millones de toneladas en 2012 a 43.2 mil millones de toneladas en 2040 [4], incrementando el calentamiento global. Como se explica a continuación, el hidrógeno como combustible sustituto de los hidrocarburos ha mostrado potencial para descarbonizar el transporte siempre y cuando provenga de fuentes limpias.

Una ventaja del hidrógeno como portador de energía para descarbonizar el transporte es que tiene una alta eficiencia de conversión energética, su combustión produce sólo agua, es fácil de trasportar y se ha demostrado que muchos vehículos de combustión interna de hidrocarburos pueden ser alimentados con hidrógeno tras pocas modificaciones [5]. Además, los vehículos de hidrógeno ofrecen la ventaja de tener tiempos de recarga significativamente menores respecto a los eléctricos, en el transporte público tiempos de recarga menores significa a mayor productividad de los vehículos [6]. Por estos y otros motivos se espera que la demanda total de hidrógeno mundial incremente de 10 EJ en el 2020 a 78 EJ para el 2050, de los cuales 22 EJ van a ser demandados por el sector transporte y 16 EJ por la industria energética [7]. Actualmente el 96 % del hidrógeno producido proviene de derivados del petróleo [8], por lo que es necesario buscar una producción sostenible con métodos alternativos a los hidrocarburos, como los basados en métodos biológicos.

Las investigaciones de producción de hidrógeno basado en métodos biológicos con microalgas y cianobacterias han tenido buenos resultados [9] [10], pero se basan en principios que dificultan el escalamiento de la tecnología al intentar evitar que el oxígeno producto de la fotosíntesis inhiba enzima hidrogenasa la cual es la productora del hidrógeno [11]. La microalga verde *Chlorella vulgaris* G120 al tener una tasa de respiración notablemente más alta que otras especies [12] consume rápidamente el

oxígeno producido en la fotosíntesis en los procesos de oxidación de carbohidratos, logrando la anaerobiosis y así evitando que la hidrogenasa se inhiba y se pueda mantener una producción sostenida de hidrógeno [13]. Además, al tener esta capacidad de realizar respiración de carbono exógeno y fotosíntesis al mismo tiempo [13] tiene una mayor producción de biomasa y por lo tanto de metabolitos [14] como sería el hidrógeno.

Como se vio anteriormente, para que la microalga verde *Chlorella vulgaris* G120 pueda tener una alta tasa de respiración y por lo tanto pueda sostener la producción de hidrógeno, es necesario una fuente exógena de carbohidratos, además de los minerales tradicionales, principalmente fósforo y nitrógeno. El alto costo económico de estos insumos limita competitivamente esta tecnología respecto a formas tradicionales de producción de hidrógeno [12] [15] por lo que se vuelve necesario buscar fuentes de estos nutrientes de fuentes revalorizables como los efluentes agrícolas.

Con la intensificación de la agricultura en los últimos años para aumentar los rendimientos de producción de alimentos, hay consigo mayor consumo y contaminación del agua. Por ejemplo, la ganadería es la principal fuente de contaminación del agua del sector agrícola [16]. A nivel mundial, la cría de pollos, cerdos y vacas son responsables de entre el 74 % y el 88 % de los nutrientes que se vierten en ríos. En el 2010, el efluente sin tratamiento de estas actividades representó la liberación en ríos de 22 Tg y 1.8 Tg de nitrógeno y fósforo total disuelto, respectivamente [17]. En Costa Rica para el 2016, del total de extracción de agua para todas las actividades humanas, el 71% (610.14 hm³) corresponden a las actividades de agricultura, ganadería, pesca y silvicultura, de los cuales se generaron 200.22 hm³ de aguas residuales [18] principalmente de procesos postcosecha y ganadería. Una forma comúnmente utilizada de tratar las aguas de descarga ganaderas es utilizándolas como abonos líquidos, pero esto puede afectar las comunidades microbianas del suelo, cambiar la composición del forraje, acumular antibióticos [19], transmitir enfermedades a humanos y la posible eutrofización de fuentes de agua naturales [20].

Esta investigación integra los retos mencionados anteriormente, el de la necesidad de una fuente de hidrógeno sostenible y del saneamiento de aguas residuales agrícolas. Esto mediante una tecnología que utiliza el metabolismo de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 para que produzca hidrógeno como potencial combustible cuando se usó efluentes agrícolas como fuente de nutrientes reduciendo así su carga contaminante. En este caso se utilizan purines porcinos como fuente de nutrientes minerales y melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos. Además, la biomasa que se produjo en el proceso

tiene potencial como alimento en acuicultura, para extracción de pigmentos, como fertilizantes, entre otros.

Utilizar melaza como insumo tiene la ventaja de que su producción es relativamente centralizada y estable durante los años. Para el 2016 se produjeron 746 119 toneladas seca (50,0% CH) de melaza solamente en nuestro país [21], la cual se aprovecha para la producción de alcoholes y alimento para ganado [22]. Como lo que se necesita es un agua de descarga rica en carbohidratos, también se podría utilizar otras fuentes agrícolas como aguas miel de los beneficios o subproductos de procesado de frutas, pero estas no se evalúan en esta investigación.

La melaza y las aguas de descarga de chanchera, como medio de crecimiento, tienen cierta opacidad que disminuye el paso de luz a través de ellas reduciendo la tasa fotosintética de las microalgas que crecen en ellas. Pero debido a que la *Chlorella vulgaris* G120 también consume carbohidratos como fuente de energía, depende menos de la luz [11] y su crecimiento no se debería afectar significativamente por dicha opacidad, capacidad que se evaluará en esta investigación. Esto permitiría el diseño y escalamiento de fotobiorreactores que no necesitarían una relación de área de exposición a la luz respecto al volumen tan alta, lo que significa reducción de costos [23].

La información disponible sobre metodologías de aclimatación del cultivo de *Chlorella vulgaris* G120 en medios ricos en azúcares para estimularlo a la producción de hidrógeno es muy escasa. Por lo tanto, también se vuelve importante divulgar este tipo de información como se hace en la presente investigación. Más cuando se trata de una tecnología nunca evaluada en nuestro país y que además muestra tener tanto potencial para continuar con su estudio. Y desde los enfoques de la ingeniería en biosistemas de revalorización de subproductos agrícolas y reducción su carga contaminante, se justifica que esta investigación, incluso partiendo con la incertidumbre de poder incluso producir hidrógeno aún con los nutrientes puros de uso tradicional de laboratorio, lo intentara hacer con subproductos agrícolas sin ningún tipo de pretratamiento.

1.2 Alcance del proyecto

Este trabajo evalúa la capacidad la microalga *Chlorella vulgaris*, específicamente la cepa G120 de absorber nutrientes de dos tipos de aguas contaminadas por agroindustria para crecer y producir hidrógeno, a la vez reduce la carga contaminante de las mismas. Se evalúa la melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), y los purines porcinos como fuente de nitrógeno (amonio), esto como sustituto a la glucosa y nitrato de potasio respectivamente, insumos nutritivos utilizados hasta ahora en el cultivo de microalgas y que representan alto costo económico.

Para producir hidrógeno, primeramente, hay que tener suficiente biomasa microalgal. Se evalúa entonces bajo cual modo trófico la microalga tiene mayor producción de biomasa y de clorofila en las células, si en autotrofia, heterotrofia o mixotrofia. Esto cuando se usó medios nutritivos minerales. Dichos resultados a su vez nos permiten tener un punto de partida para evaluar los medios alternativos basados en melaza y purines porcinos.

Luego con los medios alternativos, igualmente se mide el crecimiento de biomasa de las microalgas y la concentración de clorofila en las células para mixotrofia y heterotrofia. Esto nos permite entender cuál es el impacto de utilizar la melaza o lo purines porcinos sobre el crecimiento de las microalgas.

Finalmente se evalúa la capacidad de la microalga para producir hidrógeno, en términos de volumen de biogás producido y la concentración de hidrógeno, con los medios nutritivos alternativos y se compara con el rendimiento obtenido usando el medio tradicional de glucosa y minerales. Un resultado importante obtenido en esta sección es que se describe la metodología de aclimatación de la microalga para producir hidrógeno.

1.3 Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 de crecer bajo diferentes rutas nutritivas, para la determinación del potencial de la melaza y aguas de descarga porcinas como medios alternativos revalorizados para la producción de biomasa e hidrógeno.

1.3.2 Objetivos específicos

- 1.3.2.1 Determinar bajo cual ruta nutritiva (autotrofia, heterotrofia o mixotrofia) la microalga *Chlorella vulgaris* G120 tiene un mejor crecimiento cuando se usó medios nutritivos tradicionales de laboratorio.
- 1.3.2.2 Evaluar purines porcinos, como fuente de nutrientes, y melaza de caña de azúcar, como fuente de carbohidratos, para producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 en mixotrofia y heterotrofia, y evaluar la reducción compuestos nitrogenados y azúcares como parámetros biorremediativos.
- 1.3.2.3 Cuantificar la cantidad de hidrógeno producido por la microalga *Chlorella vulgaris* G120 en mixotrofia comparando medios nutritivos tradicionales de laboratorio contra los medios nutritivos alternativos con la melaza y purines porcinos.

2 MARCO TEÓRICO

Para comprender la respuesta de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 ante los experimentos de crecimiento y producción de hidrógeno a los que se sometió en este estudio, es necesario conocer al menos sus conceptos teóricos básicos implicados en la investigación. Como se ha mencionado anteriormente el potencial de esta microalga es su alta tasa de respiración, por lo que se explica este y los otros mecanismos tróficos que esta puede llevar a cabo: la fotosíntesis, fermentación y mixotrofia, para entender como la energía que se produjo puede sostener el crecimiento y la eventual producción de hidrógeno de esta microalga.

Esta microalga como ser vivo ve afectado su crecimiento y la producción de hidrógeno debido a factores externos como aireación, nutrientes, pH, iluminación, agitación, temperatura, entre otros factores. También se explican el impacto que tienen los anteriores factores externos sobre el crecimiento de las microalgas, y en específico de la *Chlorella vulgaris* G120 la cual se estudia en esta investigación. Se hace especial mención en el papel de los nutrientes, pues esta investigación se basa en evaluar la sustitución de la glucosa y el nitrato de potasio por melaza de caña de azúcar y purines porcinos respectivamente. También se ofrece información sobre estos dos residuos agrícolas, y cuales podrían ser sus propiedades contraproducentes al utilizarlos como fuentes de nutrientes para microalgas.

2.1 Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas microscópicos (normalmente miden entre 2 μm –200 μm). El hábitat es principalmente el agua, ya sea dulce o salada. Las microalgas contienen cloroplastos que les permite fotosintetizar y utilizan la energía solar para producir ATP (energía) y NADPH₂ (poder reductor) que luego invierten en sintetizar las moléculas necesarias para su metabolismo [15]. Las microalgas también obtienen energía heterotróficamente respirando o fermentando carbohidratos, que almacenaron producto de la fotosíntesis, o carbohidratos exógenos, presentes en el medio en el que se encuentran, por lo que podrían dispensar de la luz [15]. Finalmente, las microalgas pueden estar en un modo trófico denominado mixotrofia, donde obtienen energía de la vía fotosintética y de la respiración o fermentación simultáneamente.

Es importante aclarar que cuando se habla de crecimiento microalgal, no se refiere a que las células aumenten de tamaño, sino a que la cantidad de células aumenten en un volumen definido, es decir, que aumente su densidad. La cinética de crecimiento y la reproducción de microalgas en un sistema discontinuo se describe en la **Figura 1** donde la gráfica muestra como en el tiempo (eje x), se va dando

un cambio en la densidad de biomasa microalgal (eje y), establecimiento las cinco fases de un cultivo en un sistema de este tipo. (1) Fase de aclimatación: las microalgas se adaptan a las condiciones ambientales nuevas a las que está expuesta, por ejemplo, cambiando al modo trófico más conveniente según los recursos energéticos disponibles. Explicado de otra manera; si un cultivo de microalgas creció en completa oscuridad realizando respiración de carbohidratos y de pronto pasa a condiciones diferentes con un medio completamente mineral sin carbohidratos y además con luz, para aprovechar los recursos de sus nuevas condiciones y sobrevivir como cultivo, debe pasar de realizar respiración a fotosíntesis, y este proceso requiere de tiempo de aclimatación por parte de las microalgas pues deben activar nuevos mecanismos tróficos intracelulares. (2) Fase exponencial o logarítmica: una vez la microalga se adapta entonces se presenta un rápido crecimiento de la población mediante fisión binaria de las células, donde una célula se divide en dos iguales. Aquí es importante puntualizar que cuando se habla de crecimiento de microalgas, no se refiere al aumento de tamaño individual de cada célula, sino a la multiplicación de estas y aumento de densidad de estas en un volumen donde se encuentran. (3) Disminución relativa del crecimiento: ocurre cuando está limitado algún elemento requerido para que suceda división celular, como nutrientes, luz, entre otros factores, que se explican más adelante. (4) Fase estacionaria: la división celular está detenida casi por completo por falta de recursos para el crecimiento. (5) Muerte: también llamado lisis, es la fase cuando las microalgas no pueden realizar sus procesos metabólicos básicos y su población decae [15].

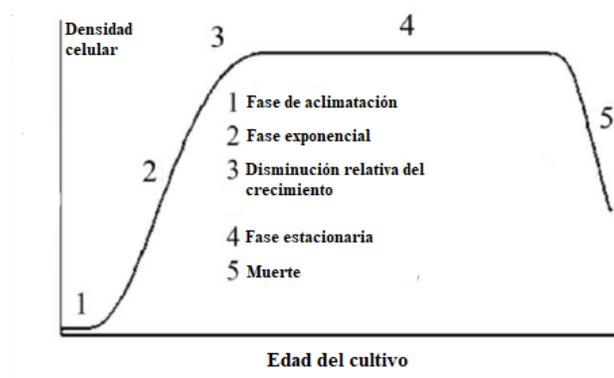


Figura 1 Cinética de crecimiento y reproducción de microalgas [15]

El ciclo de vida descrito anteriormente ocurre en la naturaleza a distintas tasas de crecimiento, dependiendo que se presenten o no las condiciones apropiadas para su desarrollo. Pero para su máximo aprovechamiento, las microalgas se pueden cultivar en Biorreactores de forma artificial donde se puede controlar los factores de crecimiento y sostener el cultivo en la fase 2 de crecimiento exponencial. Dichos

factores de crecimiento de microalgas que se deben controlar son: (1) Factores fisicoquímicos como pH, nutrientes y temperatura, (2) Factores de procesamiento como agitación e intensidad de luz y (3) Factores bióticos como especies invasoras o depredadoras.

2.2 Microalga *Chlorella vulgaris* cepa G120

La *Chlorella vulgaris* G120 es una microalga verde no transgénica de entre 3 y 5 μm registrada primeramente en 1996 en Republica Checa por el Instituto de Botánica de Třeboň, y con la capacidad de crecer de forma autotrófica, heterotrófica y mixotrófica.

Esta microalga en condiciones mixotróficas ha mostrado producir mayor concentración de biomasa que de manera autotrófica [24], debido a que en un cultivo mixotrófico las células también realizan respiración de carbohidratos permitiéndoles continuar su crecimiento durante los periodos oscuros, o en zonas donde la radiación es limitada [25]. Además, en mixotrofia aumenta la acumulación de lípidos y carbohidratos en la célula[26]. Se puede inferir que el rendimiento total para crecer de un cultivo mixotrófico es la suma de los rendimientos de biomasa que se produjo por la vía fotoautótrofa y heterótrofa [27]. Por otro lado, esta microalga tiene un gran potencial para la producción de hidrógeno por la vía mixotrófica, y los rendimientos obtenidos justifican una eventual producción industrial de biohidrógeno[28].

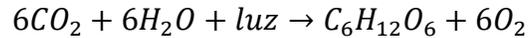
2.3 Rutas metabólicas presentes en la *Chlorella vulgaris* G120

Como se explicó anteriormente, la *Chlorella vulgaris* G120 puede realizar diferentes rutas tróficas dependiendo de las condiciones en las que se encuentre, las cuales activan diferentes procesos fisiológicos y de flujo de energía que definen su crecimiento y producción de hidrógeno. De forma general, para que la microalga crezca la energía que se produjo debe dirigirse hacia la ruta de fijación de carbono dada en el RuBisCo, pero para que se produzca hidrógeno, esta energía debe tomar otro camino hacia la hidrogenasa. La microalga siempre va a buscar fijar carbono para crecer, y no expulsar energía en forma de hidrógeno. Por este motivo es necesario atrofiar la ruta hacia el RuBisCo si lo que se quiere es producir hidrógeno, como se explica en esta sección.

2.3.1 Vía fotosintética

La fotosíntesis es la vía autótrofa de síntesis de sustancias orgánicas complejas necesarias para su crecimiento a partir de la energía de la luz y moléculas inorgánicas simples, es decir, es un proceso transformación y almacenamiento de energía lumínica en energía química. De forma general para producir

una molécula de glucosa ($C_6H_{12}O_6$), en el proceso de fotosíntesis se requieren seis moléculas de dióxido de carbono (CO_2) y doce moléculas de agua (H_2O); y se obtienen además seis moléculas de oxígeno (O_2) y seis más de agua [29], como se muestra en la siguiente ecuación:



Ecuación 1 Reacción química de la fotosíntesis

Los pigmentos fotosintéticos ubicados en los cloroplastos de las microalgas son los encargados de absorber los fotones para la fotólisis del agua y producir la energía requerida en los procesos de fijación de carbono mediante la síntesis de carbohidratos [30]. La clorofila a y la clorofila b absorben principalmente luz en longitudes de onda rojas (600 nm a 700 nm) y azules (400 nm a 500 nm) respectivamente, esta luz es la fotosintéticamente activa (PAR) y representa un 45% del total de luz solar disponible, y los carotenoides longitudes entre 300 nm y 600 nm [31].

2.3.2 *Respiración*

La respiración es la vía heterotrófica de degradación de sustancias orgánicas complejas en moléculas inorgánicas simples mediante la oxidación extrayendo energía en el proceso. La microalga *Chlorella vulgaris G120* tiene la capacidad de degradar fuentes de carbono almacenadas durante la fotosíntesis o exógenas para obtener energía. Esta adaptación evolutiva se dio para superar periodos o situaciones donde tenía poca luz disponible o estrés por nutrientes, pues en esas condiciones ya no era eficiente depender solamente de la vía fotosintética [32]. Algunas fuentes de carbono que se han utilizado en procesos heterotróficos con *Chlorella* son: glucosa, sacarosa, fructosa, xilosa, glicerol, acetato, etanol, lactosa, galactosa, succinato [33]. La *Chlorella vulgaris G120* puede realizar respiración o fermentación dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, un solo cultivo puede tener una parte realizando fermentación y la otra respiración, según cual esté mejor expuesta al oxígeno, y variar los metabolitos producidos [34].

Para la respiración celular aerobia de una molécula de glucosa se requieren seis moléculas de oxígeno, y da como resultado seis moléculas de dióxido de carbono, seis moléculas de agua y energía en forma de 38 moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Cuando la respiración parte de otras fuentes de carbono más complejas que la glucosa que deben ser degradadas primero al piruvato se requiere energía para hacerlo.

2.3.3 Vía mixotrófica

La microalga *Chlorella vulgaris* puede realizar tanto fotosíntesis como respiración. Cuando la microalga tiene disponible solamente minerales, luz y CO₂ realiza fotosíntesis para crecer y acumular carbohidratos, y en el caso que la fotosíntesis se limite, toma los carbohidratos acumulados para realizar la respiración para sobrevivir. Si la microalga se encuentra en condiciones donde la fotosíntesis no se puede realizar, pero hay carbono exógeno metabolizable se favorece la respiración o fermentación para sobrevivir. Pero si la microalga está en condiciones donde puede realizar fotosíntesis y además tiene una fuente de carbono exógena que puede metabolizar para producir energía, y por lo tanto realiza fotosíntesis y respiración simultáneamente, se dice que está en condiciones mixotróficas. En mixotrofia al tener más energía disponible, el crecimiento es teóricamente mayor al dado por fotosíntesis o respiración.

Durante la mixotrofia, el oxígeno producido durante la fotosíntesis es consumido en la respiración. Si este oxígeno no es suficiente entonces podría iniciar la fermentación láctica. Encontrar un equilibrio entre ambas rutas metabólicas es necesario para tener el máximo beneficio de cada una, y como se verá más adelante, esto es crucial durante la producción de hidrógeno.

2.4 Condiciones de cultivo para crecimiento de la *Chlorella vulgaris* cepa G120

El cultivo de la *Chlorella vulgaris* está condicionado principalmente por la dosis de luz y los nutrientes, sin embargo, también son cruciales otros factores como pH, temperatura, la concentración inicial de microalgas, agitación, entre otros [35].

Una dosis adecuada de luz es importante para promover una mejor tasa de crecimiento autótrofo y de esta manera regular la fijación máxima de CO₂ y evitar la fotoinhibición por exceso de luz, en el caso de mixotrofia una dosis de luz menor a la autotrófica promueve la respiración y por lo tanto un mayor crecimiento [36].

El tipo de carbono orgánico empleado para la respiración limita el crecimiento en un proceso mixotrófico, la glucosa es la fuente exógena más comúnmente utilizada en microalgas para promover la heterotrofia, aunque también se pueden utilizar otras fuentes como etanol, glicerol y acetato [35]. Se ha encontrado que un exceso de CO₂ y luz promueve un incremento de la autotrofia limitando la heterotrofia y afectando como tal el proceso mixotrófico, perjudicando las ventajas que esta ofrece [25].

La temperatura por debajo de la óptima de 32 °C puede provocar inhibición en el crecimiento pues reduce el transporte de electrones, y por consecuencia se reduce la tasa de fijación de CO₂ afectando

el fotosistema II pues se inhibe la síntesis de proteínas, al igual que aumentar la temperatura por encima del rango óptimo reduciendo el crecimiento de las microalgas [37].

El pH afecta la actividad enzimática de las microalgas especialmente en lo relacionado con el suministro de protones a la hidrogenasa para la producción de hidrógeno y otros parámetros fisiológicos [38]. Por ejemplo, en cultivo mixotrófico con *Chlorella vulgaris* ESPnd31 se obtuvo un mejor crecimiento en glucosa cuando no se controló el pH, pero al controlar el pH en 8.5 se produjo más biomasa microalgal en fructosa y acetato de sodio [39], evidenciando que el pH tiene efecto sobre la síntesis de carbohidratos exógenos.

2.5 Papel de los nutrientes sobre el crecimiento de la *Chlorella vulgaris* cepa G120

Para garantizar el óptimo crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 se han desarrollado dos medios de crecimiento que garantice cumplir todas sus demandas nutricionales. Estos medios son medio nutritivo mineral K3 y medio nutritivo de fermento con glucosa, utilizados para autotrofia o heterotrofia respectivamente. La composición y preparación de ambos se describe en el apartado **3.2.1**.

La composición química de las microalgas puede variar dentro de la misma especie, según las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes [40] y esto puede afectar seriamente cuando se desea producir biomasa con una composición química estandarizada, pero puede favorecer cuando se desea cambiar la composición hacia un contenido específico de compuestos deseados [41], como mayor concentración de lípidos o proteínas. Sin embargo, de forma general se dice que la materia seca de *Chlorella vulgaris* está compuesta por: 51 a 58 % de proteína, 12 a 17 % de carbohidratos y 14 a 22 % de lípidos [42].

Los iones metálicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} son otro factor de crecimiento, pues son necesarios en los procesos de algunas microalgas para mantener un buen contenido y proporción de pigmentos fotosintéticos y afectan en la acumulación de ácidos grasos [38]. Otros metales pesados como el Fe^{2+} puede disminuir el crecimiento, pero aumentar la producción de ácidos grasos [43].

El nitrógeno y fósforo tienen una mayor influencia en la composición de la *C. vulgaris* afectando significativamente en su crecimiento, absorción de otros nutrientes y contenido de clorofila [44]. Una deficiencia de nitrógeno y fósforo promueve la composición hacia los lípidos. El nitrógeno es

especialmente importante en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y pigmentos fotosintéticos, mientras que el fósforo en la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos de la membrana, ATP [45].

El estrés en las microalgas por limitación de nitrógeno disminuirá la concentración de clorofila a en las microalgas volviendo el cultivo amarillento, lo que a su vez las incrementará la fijación de dióxido de carbono y la acumulación hacia los carbonos en carbohidratos y lípidos [46] [47].

2.6 Condiciones de cultivo para producción de hidrógeno de la *Chlorella vulgaris* cepa G120

La producción de hidrógeno ha obtenido mejores resultados con cultivos mixotróficos respecto con cultivos autótrofos, porque la mayor la tasa crecimiento y de producción de energía que ofrece la mixotrofia representa un aumento en la tasa de producción de los metabolitos deseados[10], pero esta debe partir de un crecimiento heterotrófico como se verá más adelante.

En microalgas verdes, la producción de hidrógeno está catalizado por la enzima hidrogenasa en un proceso dependiente de la luz, pues esta se acopla a la cadena fotosintética de electrones por medio de una ferredoxina [48], sin embargo, este proceso se ve seriamente limitado por el mismo oxígeno que se produjo durante la fotosíntesis, que es un inhibidor irreversible de la actividad catalítica de la hidrogenasa [49] [50] [38].

La microalga *Chlorella vulgaris* G120 tiene una alta tasa de respiración respecto a otras microalgas lo que le permite consumir rápidamente el oxígeno producido por la fotosíntesis evitando la inhibición de la hidrogenasa. Esto le permite a esta microalga en particular entrar rápidamente en anaerobiosis en presencia de luz e iniciar la producción de hidrógeno de manera más anticipada respecto a otras microalgas estudiadas como la *Chlamydomona* y las cepas autotróficas de *Chlorella* [13] [51].

La presión parcial del hidrógeno en los fotobiorreactores también inhibe la hidrogenasa por retroalimentación, se ha encontrado que se puede aumentar la producción de hidrógeno si este se remueve contantemente del biorreactor [52].

2.7 Cadena energética intracelular en la producción de hidrógeno en microalgas mixotróficas

La microalga *Chlorella vulgaris* G120 produce hidrógeno en fotosíntesis, respiración o mixotrofia (fotosíntesis y respiración al mismo tiempo), pues lo único que necesita es que llegue energía en forma de electrones a la enzima hidrogenasa y que la misma no esté inhibida por el oxígeno. Varios experimentos preliminares han mostrado una mayor tasa de producción de hidrógeno por la vía fotosintética, pero se inhibe rápidamente la hidrogenasa por el oxígeno producido en el fotosistema II

[50]. Es entonces donde la respiración viene a ser una vía complementaria cuyo principal papel es consumir el oxígeno, pero que a su vez aporta energía para las células. Los flujos energéticos hacia la producción de hidrógeno se explican a continuación de manera general. Otra ruta que puede proveer de energía para la producción de hidrógeno es la fermentación oscura, pero esta no consume oxígeno.

El flujo energético dependiente de luz hacia la producción de hidrógeno inicia en el fotosistema II donde se utiliza la energía de los fotones para hidrolizar el agua y producir electrones y protones de hidrógeno. Estos inician su recorrido por la cadena de electrones pasando por la feofitina, plastoquinona, citocromo B6F, plastocianina hasta el fotosistema I donde se utiliza nuevamente la energía de los fotones para incrementar aún más el nivel energético de la cadena de electrones. Luego, normalmente, del fotosistema I los electrones son llevados hasta la enzima RuBisCO por medio de proteínas transportadoras donde inicia el proceso de síntesis de carbohidratos. Pero en la producción de hidrógeno es necesario que estos electrones no lleguen al RuBisCo, sino que a la enzima hidrogenasa, la cual toma dichos electrones para convertir protones de hidrógeno en moléculas de hidrógeno[50]. Para inhibir el RuBisCO y que los electrones lleguen a la hidrogenasa, antes de exponer las microalgas a la luz para producir hidrógeno se deben crecer en periodos de completa oscuridad para degradar esta enzima. Esta metodología es uno de los aportes de esta investigación. Otra forma de inhibir el RuBisCo no explorada en esta investigación es mediante la limitación de nutrientes como es azufre.

El flujo energético proveniente del glucolisis de carbohidratos hacia la producción de hidrógeno inicia con la inyección directa de los electrones producidos del glucolisis al nivel de la plastoquinona, misma de la cadena de transporte entre el fotosistema II y el fotosistema I, lo cual incrementa la cantidad de electrones que llega a la hidrogenasa y por lo tanto la producción de hidrógeno. Pero también el piruvato producido del glucolisis puede ofrecer los electrones que libera, al degradarse en acetil-COA, directamente a la hidrogenasa [50]. En la siguiente **Figura 2** se muestra en flujo energético hacia la hidrogenasa por la vía dependiente e independiente de la luz:

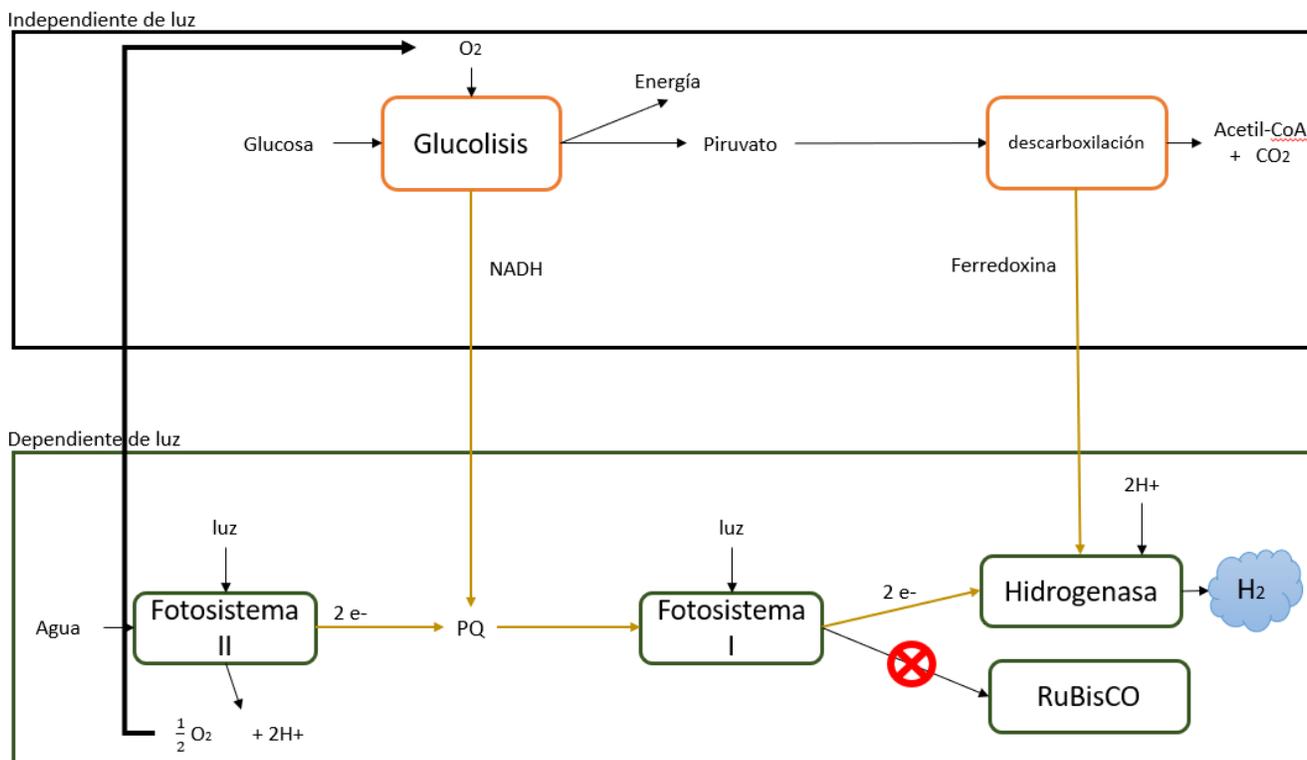


Figura 2 Rutas energéticas hacia la hidrogenasa; dependiente e independiente de la luz. Elaboración propia

2.8 Melaza: propiedades químicas y físicas

La melaza es un jarabe compuesto principalmente de sólidos solubles totales, azúcares, cenizas, calcio, sodio y potasio. Esta se obtiene después de la cristalización de azúcar a partir de jugo de caña. Hay varios grados de melaza según el nivel de extracción final, mientras mayor sea la extracción más oscura y viscosa será la melaza. Tradicionalmente se ha utilizado como alimento para animales y más recientemente para la síntesis de varias sustancias como etanol principalmente y otras como vinagre, glicerina, ácido láctico cuando se usó bioprocesos [53]. A continuación, se detallan las propiedades físicas y composición química de la melaza:

Tabla 1 Propiedades físicas y composición química de la melaza [53], [54], [55]

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Materia seca	76.8%	Ceniza	10.25 %
Sólidos totales	46%	Sacarosa	39.2 a 67.3 % MS
Sólidos volátiles	48.1%	Glucosa	4 a 9 % MS
DQO	70 – 100 g/L	Fructosa	5 a 12 % MS
DBO (5 d, 27 °C)	40 g/L	Al	0.54 µg/g
pH	5 a 5.5	As	0.24 µg/g
Nitrógeno total	< 0.2 % MS	Cu	8.7 µg/g
N – NH⁴	200 – 215 g/kg	Fe	0.35 µg/g

Fósforo	3 % MS	Mn	11.1 µg/g
Potasio	2.89 % MS	Zn	19.7 µg/g

El color oscuro de la melaza es debido a pigmentos de caramelo, pigmentos de Maillard y compuestos de polifenoles [56]. Para remover los pigmentos de la melaza se han explorado métodos físicos como la absorción con carbón activado o filtración por microporos porque estos tienen valor comercial [57].

La melaza evita que gran parte de la luz pase a través de ella debido a su absorbancia, parámetro físico afectado por la concentración de pigmentos. La absorbancia se define como la relación logarítmica entre la intensidad de luz que incide en una muestra y la intensidad transmitida a través de la muestra, es decir, indica cuanta luz queda “atrapada” por la muestra [58]. Dependiendo de los pigmentos presentes en la melaza, estos van a absorber más luz en ciertas longitudes de onda, o de lo contrario, dejar pasar más luz en ciertas otras longitudes de onda y esto podría afectar la disponibilidad de luz sobre las microalgas de ciertos rangos del espectro que son necesarios para activar los sistemas fotosintéticos afectando la clorofila a (600 nm a 700 nm) o la clorofila b (400 nm a 500 nm).

2.9 Purines porcinos: propiedades químicas y físicas

Las aguas residuales de las chancheras, o purines porcinos, son el producto del lavado de las porquerizas. Están compuestas por una mezcla de agua, excretas de los cerdos, restos de alimento y productos utilizados para la limpieza y desinfección de las porquerizas. La cantidad de residuos por cerdo de entre 57 kg a 97 kg varía entre 5.7 l y 7.6 l. El principal tratamiento de los purines porcinos es reducir la carga de materia orgánica mediante biodigestión anaerobia para producir metano, y luego la de nutrientes, principalmente nitrógeno, mediante la aplicación como fertilizante líquido [59]. La composición de los purines varía según la cantidad de agua empleada en el lavado de la porqueriza, la alimentación de los animales, tratamientos previos, la época del año, entre otros. Los purines pueden tener un máximo de 7.99 g/kg de nitrógeno amoniacal (N- NH₄⁺), un mínimo de 1.65 g/kg y una media de 4.54 g/kg. También pueden tener un máximo de 1.38 g/kg de fósforo, un mínimo de 0,09 g/kg y una media de 1.38 g/kg [60].

El amonio NH₄⁺ es un compuesto nitrogenado acuoso a presión y temperatura ambiente. El amonio puede transformarse en amoníaco según el pH del medio. Cuando el pH es inferior a 6.0 aumenta la proporción de amonio a partir de amoníaco. En pH mayor a 8.0 se empieza a convertir el amoníaco en

amonio, y a un pH mayor a 11 todo el amonio se transforma en amoniaco, el amoniaco es fácilmente evaporable porque su estado a presión y temperatura ambiente es gaseoso. En medios líquidos tanto el amoniaco como el amonio puede estar en forma acuosa como se muestra en la siguiente ecuación, y la proporción entre estos dos también se ve influenciada por el pH como se describió anteriormente.



Ecuación 2 Reacción de amonio a amoniaco

Las microalgas requieren nitrógeno para la producción de proteínas, y comúnmente se utiliza el nitrato como fuente de nitrógeno en su cultivo. El amonio es una fuente metabolizable de nitrógeno para las microalgas, y de hecho es más ventajosa que el nitrato pues requiere un menor costo energético para su absorción [61]. Sin embargo, se ha informado sobre el efecto inhibitorio que tiene el amonio sobre el crecimiento de las microalgas [62], razón por la cual se debe diluir las aguas ganaderas residuales entre 10 y 20 veces antes de emplearlas para el cultivo de microalgas [63]. Además, las aguas residuales ricas en amonio suelen tener amoniaco acuoso el cual es altamente tóxico y debe ser removido con procesos como extracción con aire que requieren energía y también remueve parte del amonio [64]. La *Chlorella vulgaris* tiene buena tolerancia al amonio, pero es necesario mantener el pH los valores neutros para que pueda metabolizar el amonio eficientemente [65]. Muchas microalgas empiezan a tener inhibición a partir de 184 mg/L de amonio provocando la producción de materia orgánica extracelular como forma de aclimatación [66].

Normalmente en el lavado de las porquerizas se emplea diluciones de cloro para destruir organismos patógenos y reducir las enfermedades en los cerdos. La cantidad de cloro aplicada depende de los hábitos de desinfección, siendo en muchos casos que se dé una aplicación más que la necesaria. La microalga *Chlorella vulgaris*, al igual que muchas otras son altamente sensibles al cloro pues provocan daños en su membrana y en los sistemas fotosintéticos, siendo letal específicamente para esa variedad concentraciones superiores a 0.25 mg/L de hipoclorito de sodio [67].

3 METODOLOGÍA

El diseño experimental de esta investigación consta de tres etapas experimentales dependientes entre sí, por lo que debían irse concluyendo en orden para pasar a la siguiente. La primera evaluó la capacidad de la *Chlorella vulgaris* G120 de crecer en autotrofia, mixotrofia y heterotrofia con los medios nutritivos tradicionales completamente minerales *Kolkwitz triplo* (de ahora en adelante K3) y de glucosa con minerales llamado de fermento (de ahora en adelante GM). Luego se evaluó la capacidad de esta misma microalga de crecer en mixotrofia y heterotrofia con los medios nutritivos alternativos con melaza y purines como alternativos de la glucosa y el nitrato de potasio respectivamente, además también se aprovecharon estos mismos experimentos para evaluar la biorremediación que las microalgas hacían sobre ambos medios. Finalmente, se evaluó la capacidad de producir hidrógeno en mixotrofia con los medios nutritivos alternativos comparándolos con el medio tradicional GM. A continuación, se muestra más detalladamente la metodología para llevar a cabo dichos experimentos.

Esta investigación implicó el diseño y puesta en marcha de experimentos preliminares para entender el comportamiento de aclimatación, crecimiento y supervivencia de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 en medios nutritivos alternativos con purines porcinos y melaza, las fuentes de nutrientes a evaluar. Principalmente porque esta microalga podía verse afectada por sustancias presentes en dichos efluentes como el cloro o amonio, por lo que hubo la necesidad de evaluar diferentes niveles de concentración de ambos efluentes para evitar eventuales inhibiciones. Adicionalmente se diseñaron y realizaron varios experimentos preliminares para encontrar las condiciones de aclimatación en las que la microalga iniciaría a producir hidrógeno. También se realizaron pruebas con varios Biorreactores para encontrar uno que se adecuara a las necesidades experimentales de producción de hidrógeno.

En esta metodología se explica la procedencia del inóculo inicial de *Chlorella vulgaris* G120 en **3.1**, como se reprodujo para aumentar la biomasa disponible necesaria para llevar a cabo los experimentos para los tres objetivos de esta investigación en **3.1.1** y como se determinó la concentración inicial de celular en cada uno de ellos en **3.1.2**. Luego se explica los procedimientos preparativos y experimentales realizados para cumplir los tres objetivos de esta presentación: en **3.2** se detalla cómo se determinó bajo cual ruta metabólica (mixotrofia, autotrofia o heterotrofia) esta microalga evaluada crece mejor cuando se usó medios tradicionales de laboratorio K3 y GM, luego en **3.3** se describe como se compararon los medios alternativos con melaza y purines porcinos (MM, GM, MP) a los medios tradicionales en

términos del crecimiento que presentaban los cultivos con ellos y finalmente en **3.4** se explica cómo fue la preparación y puesta en marcha de los experimentos para producción de hidrógeno, comparando el medio tradicional de fermento contra los alternativos basados en melaza y purines.

3.1 Obtención y escalamiento de la *Chlorella vulgaris* G120 para los experimentos

El inóculo de la microalga *Chlorella vulgaris* cepa G120 se obtuvo del cepario de colección de microalgas del Centro de Investigaciones en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR).

3.1.1 Escalamiento del cultivo

Del cepario se tomaba una pequeña cantidad de células de *Chlorella vulgaris* G120 y se inoculaba en Erlenmeyer de 200 mililitros de los medios nutritivos tradicionales K3 o de fermento según cual medio se iba a evaluar, la composición de estos se detalla en **3.2.1**. Normalmente luego de dos días, cuando se evidenciaba un crecimiento significativo, la biomasa de microalgas se separaba del medio nutritivo mediante centrifugado, y luego se suspendía en Erlenmeyer de 2 litros con medio nutritivo fresco para continuar el crecimiento hasta alcanzar suficiente biomasa para iniciar los experimentos.

Todos los procesos de inoculación, escalamiento y experimentación se realizaron con medios y cristalería (incluyendo los biorreactores) estériles y en una cámara de flujo laminar Clean Bench High Ten 4GH-24 para evitar contaminación bacteriana. Se autoclavó cristalería y medios a 120 °C y 1.4 kg/cm² por dos horas en la autoclave 657555/M220ndIB marca AC Lac.Equipment.

3.1.2 Cálculo de concentración inicial de células de microalga para los diversos experimentos

La concentración inicial de células de *Chlorella vulgaris* G120 elegida para cada experimento dependió de los resultados de los experimentos preliminares sobre aclimatación. La concentración inicial se estimó cuando se usó el siguiente método.

Al cultivo que se creció para usar en cada experimento, luego de centrifugarlo y resuspenderlo en medio fresco, se le midió la concentración de células por el método de clorofila total (ver **3.2.3.1**). La medición de clorofila total es una medida indirecta de concentración de microalgas, pero permitió ser consistente con la concentración inicial de estas entre experimentos. Luego se utilizó la siguiente ecuación para conocer cuánto de ese cultivo había que disolver en el volumen de medio que se quería preparar.

$$V_1 = \frac{V_2 * Cl_2}{Cl_1}$$

Donde:

- ~ V_1 (ml/L): es el volumen del cultivo inicial a disolver.
- ~ Cl_1 (mg/L): concentración de clorofila del cultivo inicial a disolver.
- ~ Cl_2 (mg/L): concentración de clorofila en el cultivo que se desea preparar.
- ~ V_2 (ml): volumen de cultivo que se desea preparar.
- ~ El medio se preparaba entonces disolviendo una cantidad V_1 en un volumen de medio V_2 menos V_1 .

3.2 Comparación de crecimiento entre las rutas nutritivas (autotrofia, heterotrofia o mixotrofia) de microalga *Chlorella vulgaris* G120 con medios tradicionales de laboratorio

Esta sección describe los procesos preparativos y experimentales que se realizaron para completar el objetivo 1. Se inicia describiendo en **3.2.1** como se preparó y cuál es la composición de los medios nutritivos tradicionales de laboratorio K3 y de fermento, ambos utilizados durante el escalamiento y los experimentos. Luego se describen los biorreactores utilizados y como se controló las diferentes variables que influyen en el crecimiento de las microalgas en **3.2.2**. Seguidamente en **3.2.3** se explica cómo se tomó las muestras de dichos biorreactores y los métodos que se utilizaron para analizarlas y determinar el crecimiento que se iba presentando, en términos de clorofila total y biomasa seca. Luego se explica en **3.3.4** como se analizó el medio nutritivo residual tras finalizar los experimentos para asociar su composición a la ruta nutritiva que se pretendía se estaba realizando, principalmente si se consumieron los carbohidratos en las pruebas con autotrofia. Finalmente, en la última subsección **3.2.5** se explica el diseño experimental y en análisis estadístico que se realizó.

3.2.1 Preparación de medios nutritivos tradicionales K3 y de fermento

Los medios K3 (minerales) y de fermento (glucosa y minerales) se hicieron con agua desionizada y se autoclavaron (ver **3.1.1**). La composición y preparación de estos medios se describe a continuación.

3.2.1.1 K3

Para este medio K3 se preparan 5 diluciones patrones en agua desionizada con las siguientes concentraciones de gramos de mineral por volumen de agua desionizada:

- 1) Nitrato de potasio (68.4 g/400 ml).
- 2) Fosfato de potasio (16.8 g/400 ml).
- 3) Sulfato de potasio (10.8 g/400 ml).
- 4) EDTA de sulfato de hierro (mezcla de 11.9 g/120 ml de EDTANa y 9.96 g/280 ml de sulfato de hierro disueltos por burbujeo y agitación por 24 horas).

- 5) Microelementos (mezcla de: 0.715 g de ácido bórico, 0.4525 g de sulfato de manganeso, 0.0555 g de sulfato de zinc, 0.0575 g de molibdato de sodio, 0.02 g de sulfuro de cobre y 0.00875 g de cloruro de cobalto; en 250ml).

Para preparar un litro de este medio, se toman 10 ml de la dilución patrón de nitrato de potasio, 10 ml de la de fosfato de potasio, 1 ml de la solución FeEDTA y 1 ml de micronutrientes y se afora a 600 ml con agua destilada en un Erlenmeyer. En otro Erlenmeyer aparte se toman 10 ml de sulfato de magnesio y se afora a 400 ml con agua destilada. Se autoclavan por aparte, y luego se mezclan fríos. En la siguiente **Tabla 2** se muestra la concentración de nutrientes minerales de 1 litro de medio K3 ya preparado y listo para utilizar:

Tabla 2 Concentración por litro de diferentes compuestos del medio nutritivo mineral K3

Molécula	Nomenclatura	Concentración
Macroelementos (g/L)		
Nitrato de potasio	KNO ₃	1.71
Fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	0.42
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.27
Sulfato de hierro EDTA	FeEDTA Fe(SO ₄) ₃ 7H ₂ O	24.9
Microelementos (mg/L)		
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	2860
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ 4H ₂ O	1810
Sulfato de cinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	222
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	230
Sulfato de cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	80
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ 5H ₂ O	35

3.2.1.2 Medio de fermento

El medio de fermento que se utilizó para los experimentos se preparó con un sexto de la concentración de nutrientes que tiene el medio tradicional original. Dicha preparación se hizo de la siguiente manera.

Primero se deben preparar 4 soluciones patrón de microelementos con agua desionizada diluyendo;

1. Cloruro de calcio (22 g/L).
2. Ácido bórico (1.24 g), sulfato de cobre (0.50 g), sulfato de zinc (0.57 g), sulfato de cobalto (0.56 g) y cloruro de manganeso (2.10 g); todo en un litro.
3. Molibdato de amonio (2 g/L).
4. Férrico de sodio EDTA (37 g/L).

Para preparar un litro de este medio se vierten en un Erlenmeyer 6 ml de la solución patrón de cloruro de calcio, 3 ml de las otras tres soluciones patrón de microelementos, 10 g de glucosa, 2 g de nitrato de potasio, 0.33 g de fosfato de potasio y 0.55 g de sulfato de magnesio. Se autoclavan y luego tras enfriar se ajusta el pH a 6.2 con una solución de hidróxido de sodio estéril. la siguiente **Tabla 3** se muestra la concentración de nutrientes orgánicos y minerales de 1 litro de medio de fermento ya preparado y listo para utilizar:

Tabla 3 Concentración de diferentes compuestos del medio nutritivo de fermento

Molécula	Nomenclatura	Concentración
Macroelementos (g/L)		
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	10
Nitrato de potasio	KNO ₃	0.2
Fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	0.33
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.55
Microelementos (mg/L)		
Sulfato de hierro EDTA	FeEDTA Fe(SO ₄) ₃ 7H ₂ O	111
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	18.54
Sulfato de cinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.58
Sulfato de cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	7.44
Sulfato de cobalto	CoSO ₄ 7H ₂ O	8.4
Cloruro de magnesio	MnCl ₂ 4H ₂ O	6.3
Molibdato de amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	6
Cloruro de calcio	CaCl ₂	132

3.2.2 Biorreactores para crecimiento del cultivo

Se utilizó 3 biorreactores como los que se muestran en la **Figura 3** para el crecimiento con control de variables como se describe a continuación:

- a. Los biorreactores son botellas de vidrio de 5 cm de espesor interno y de un litro de trabajo. Cuentan con cinco aberturas en la parte superior que se utilizan para intercambio gaseoso, extracción de muestras, agitación y control de pH.
- b. La mezcla del medio de cultivo en cada reactor se realizó con un juego de agitadores de 3 propelas tipo hélice marina de 4 aspas y un impulsor tipo barra al fondo del reactor que también funcionada como anclaje. El eje motriz fue impulsado por ser servomotor a 200 rpm.
- c. Al medio de cultivo se inyectó aire (98/2 v/v aire/CO₂) de manera constante para contribuir a la agitación y remoción del exceso de oxígeno producido evitando la anoxia de las células.

- d. Se controló el pH en un valor de 7 inyectando CO₂ dosificado por una electroválvula que se activa según las variaciones de pH registradas por un pHmetro que se encuentra inmerso en el cultivo. El pHmetro PHnd803 tiene una sensibilidad de 0.02 pH.
- e. La iluminación se realizó con luces fluorescentes blancas frías (Dulux L, 55 W / 840, Osram, Italia) sobre una de las caras de la botella, y se midió en la superficie de los cultivos con un sensor cuántico plano de coseno corregido (LInd250 A, LIndCOR). Los cultivos se iluminaron a $170 \mu\text{mol}_{\text{fotones}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$.
 - a. En el experimento de mixotrofia con melaza se pusieron estas luces a ambos lados del reactor para duplicar la cantidad de luz, pero siempre a $170 \mu\text{mol}_{\text{fotones}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$ en cada cara.
 - b. En los experimentos de oscuridad no se utilizaron las lámparas, y los biorreactores se forraron con papel aluminio para evitar contaminación con otras fuentes de luz.
- f. La temperatura se mantuvo constante a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ con a un “baño María” marca PolyScience SD15Rnd30ndA11B.

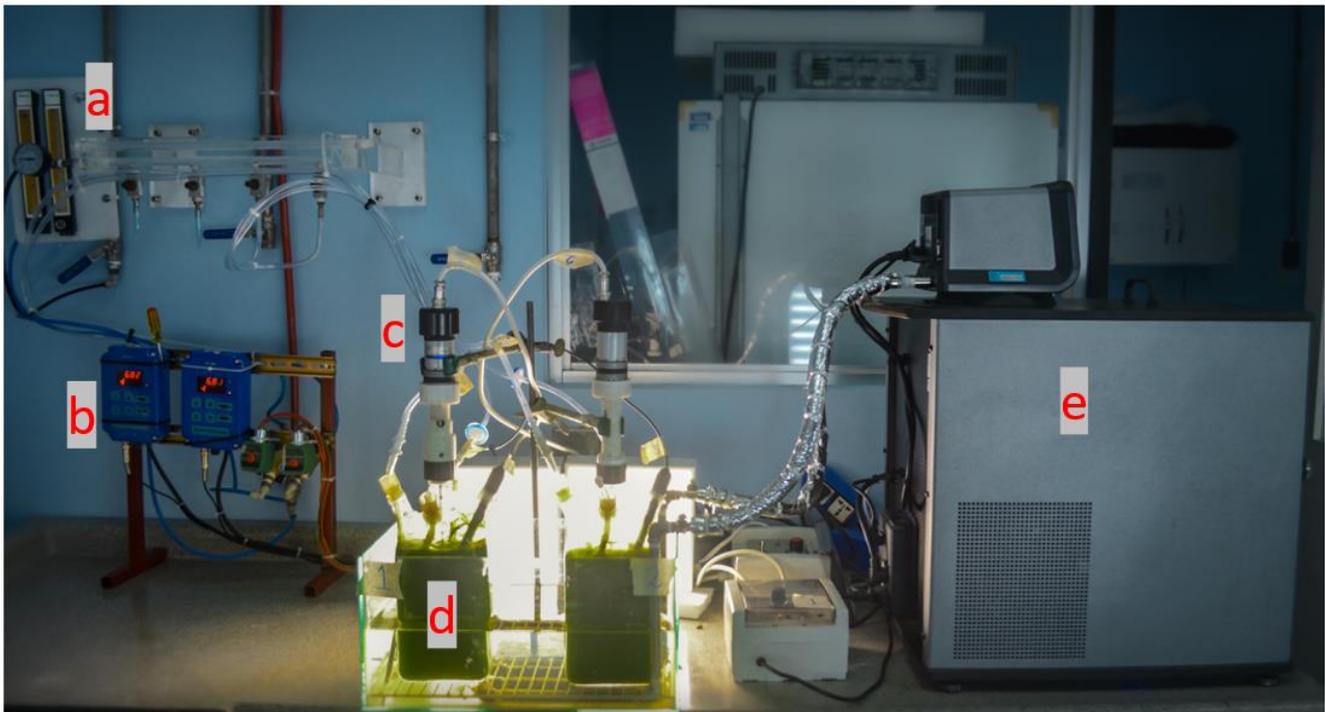


Figura 3 Biorreactores para medir crecimiento con los controladores de variables. a) dosificador de aire, b) pHmetro y electroválvula para CO₂ como controlador de pH, c) motores para agitación, d) botellas de vidrio, e) controlador de temperatura.

3.2.3 Pruebas para medir crecimiento del cultivo

Las pruebas se realizaron cada 24 horas, se extrae una muestra de cultivo del reactor y se divide para la prueba de clorofila total y de peso seco. Las mediciones se realizaron hasta el día que no hubo cambios significativos tanto en la clorofila como en el peso seco respecto con los resultados del día anterior.

3.2.3.1 Clorofila total en el cultivo

Se realiza por duplicado para cada botella. Las muestras con cultivo se centrifugaron a 6 000 rpm por 5 minutos para separar el medio de la biomasa. Se elimina el sobrenadante y a la biomasa se le agrega 1 ml de acetona al 90% y perlitas para extracción de clorofila y se pone en el agitador tipo “vortex” por 6 minutos para garantizar la ruptura de todas las células. Luego se agrega 2 ml más de la acetona a la muestra y se centrifugaba a 6 000 rpm por 8 minutos para separar las perlitas y las células rotas del líquido sobrenadante, que es una mezcla de acetona y clorofila, el cual se lleva al espectrofotómetro Evolution 201 marca Thermo Fisher Scientific y se medía la absorbancia a 430 nm, 450 nm, 630 nm, 645 nm, 663 nm, 665 nm y 750 nm, el valor de clorofila se calculó con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila total} &= \frac{V_{\text{acetona}}}{V_{\text{muestra}}} \\ &* \left((11.64 * \text{ABS}(\text{abs}_{630} - \text{abs}_{750}) - 2.16 * \text{ABS}(\text{abs}_{645} - \text{abs}_{750}) + 0.1 * \text{ABS}(\text{abs}_{360} - \text{abs}_{750})) \right. \\ &\left. + (20.97 * \text{ABS}(\text{abs}_{645} - \text{abs}_{750}) - 3.94 * \text{ABS}(\text{abs}_{663} - \text{abs}_{750}) - 3.66 * \text{ABS}(\text{abs}_{360} - \text{abs}_{750})) \right) \end{aligned}$$

Ecuación 4 Calculo de la clorofila a partir de absorbancias

Donde:

- ~ Clorofila total (mg/L): la clorofila a más la clorofila b de la muestra.
- ~ V_{acetona} (ml): volumen de acetona empleado, siempre 3 ml.
- ~ V_{muestra} (ml): volumen de cultivo a analizar, variaba de 10 a 2 ml según la concentración.
- ~ abs_n (nm abs): es la absorbancia para la longitud de onda n.

3.2.3.2 Peso seco

Se realiza por triplicado diariamente. Primero los filtros de 1.6 μm se pesaban secos antes del filtrado para tener sus pesos sin biomasa. Luego, cada muestra se pasaba por los filtros cuando se usó una bomba de vacío. Estos filtros ahora con la biomasa se colocaban en un horno de secado a 105 °C por dos horas. Finalmente se pesaban de nuevo para obtener la masa de cada filtro, pero ahora con la biomasa. Se utilizó la balanza analítica digital HR200 marca A&D con incertidumbre de 0.1 mg. El peso seco se calculaba con la siguiente ecuación:

$$PS = 1000 * \frac{PF_{despues} - PF_{antes}}{V_{muestra}}$$

Ecuación 5 Calculo del peso seco mediante diferencia de peso de filtros

Donde:

- ~ PS (g/L): es la biomasa de microalgas seca en un litro de cultivo.
- ~ PF (mg): peso del filtro con la biomasa luego de ser secado.
- ~ PF (mg): peso del filtro seco sin biomasa.
- ~ $V_{muestra}$ (ml): volumen de muestra que se pasó por el filtro.

3.2.3.3 *Concentración de clorofila en células*

La concentración de clorofila en las células se estima indirectamente a partir de los resultados de clorofila en el cultivo y biomasa en peso seco. Se calcula dividiendo la masa de clorofila en el cultivo entre la masa de microalgas en peso seco.

3.2.4 *Análisis de azúcares y metabolitos residuales*

Se analizó el medio de fermento resultante de cada experimento en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) para cuantificar la reducción de los azúcares, esto para los experimentos de mixotrofia y heterotrofia. Además, se analizó ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido butírico, ácido fórmico, ácido succínico, ácido propiónico) y alcoholes (etanol y metanol). El método empleado para los análisis de azúcares fue HPLCndDIR, PndSAndMQnd006 [68], para el análisis de ácidos orgánicos fue el método HPLCndPDA, Intercambio iónico, detección 210 nm, PndSAndMQnd051 [69] y para alcoholes el método por Cromatografía de gases (GCndMS), PndSAndMQnd052 [70].

3.2.5 *Diseño experimental y análisis estadístico para crecimiento con medios nutritivos tradicionales de laboratorio*

Se evaluó el efecto de una variable independiente, ruta metabólica inducida por tres regímenes de crecimiento diferentes: autotrofia, mixotrofia y heterotrofia, sobre unas variables dependientes, crecimiento, el cual se expresó en términos de clorofila que se produjo y biomasa en peso seco que se produjo. Por lo tanto, se realiza un modelo factorial de 3 x 1, por lo que se realiza tres configuraciones experimentales, con tres repeticiones cada uno:

- Autotrofia: inducida con medio nutritivo mineral K3 y luz.
- Mixotrofia: inducido con medio nutritivo de glucosa más minerales y luz.

- Heterotrofia: inducido con medio nutritivo de glucosa más minerales y oscuridad.

Se obtuvo nueve series de datos de clorofila y nueve series de datos de peso seco que se compararon entre sí con Análisis de Varianza Multifactorial con interacción y se interpretan los resultados con el método Tukey con un nivel de significancia $p < 0.05$. Se utilizó el software InfoStat Versión Estudiantil L 2020.

3.3 Evaluación purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía para producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* G120.

Esta sección describe los procesos preparativos y experimentales que se realizaron para completar el objetivo 2. Se inicia describiendo en **3.3.1** y en **3.3.2** el origen y la caracterización de parámetros importantes de la melaza y los purines porcinos respectivamente. Luego en **3.3.3** se detalla la preparación de los medios alternativos, que consisten en el medio de fermento, pero en un caso sustituyendo la glucosa por melaza (MM), en otro sustituyendo la glucosa por melaza y el nitrato de potasio por purines porcinos (MP) y el tercero sustituyendo solamente el nitrato de potasio por los purines (GP). En **3.3.4** se especifica como se determinó los residuos de amonio, nitratos y amoníaco de los medios con purines porcinos. Finalmente, en **3.3.5** se especifica el diseño experimental y análisis estadístico correspondiente a estos resultados.

Para este experimento se utilizaron los mismos biorreactores y controladores de variables mencionados en **3.2.2**. El análisis de reducción azúcares de la melaza se realizó en el CITA hasta el final de la prueba como en **3.2.4**. Se monitoreo el crecimiento como en **3.2.3**.

La concentración inicial, estimada como en el apartado anterior, dependió de los resultados preliminares de toxicidad y aclimatación a la melaza y los purines porcinos.

3.3.1 Melaza de caña y su caracterización

3.3.1.1 Abastecimiento de la melaza

Se obtuvo de la distribuidora de insumos ganaderos Aguilar y Solís en Vásquez de Coronado. Dicho producto fue almacenado en recipientes de 3 litros y transportados al Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) de la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica (UCR) donde se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.1.2 Análisis de nutrientes y perfil de azúcares

Se realizó un análisis de nutrientes en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR. Dicho análisis químico lo realizan para fertilizantes líquidos orgánicos e incluye los siguientes elementos (nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, potasio, azufre, hierro, cobre, zinc, manganeso y boro), donde usaron los siguientes métodos: nitrógeno por digestión húmeda con Ácido Sulfúrico y determinación Colorimétrica en el Analizador de Inyección de Flujo (FIA) y el resto por digestión con HNO₃ y determinación por Espectrofotometría de Emisión Atómica con Plasma [71–73].

El perfil de azúcares se realizó en el CITA con los métodos descritos en **3.2.4**. Dicho análisis mostró solamente el porcentaje de masa húmeda de la melaza correspondiente a fructosa, glucosa y sacarosa.

3.3.2 Efluente porcino y su caracterización

3.3.2.1 Origen del efluente

El efluente de purines porcinos se obtuvo el 3 de febrero del 2022 de una chanchera ubicada en Turrialba con 150 animales entre adultos y jóvenes, el mismo producto del lavado de la porqueriza. Al punto de recolección, el efluente pasó por dos sistemas sedimentadores. Se recolectaron 50 litros en dos pichingas, se llevaron de inmediato al CIMAR donde, una cantidad necesaria para las pruebas se centrifugó por duplicado para remover todas las partículas y se almacenó a -20 °C en botellas de 400 ml.

3.3.2.2 Análisis de nutrientes de los purines

En análisis de nutrientes se realizó con un cromatógrafo de iones y cationes en el laboratorio de Aguas, Suelos y Ambiente de la Escuela de Ingeniería en Biosistemas. Dicho análisis químico incluye los siguientes elementos (aniones: fluoruros, cloruros, nitritos, bromuros, nitratos, fosfatos y sulfatos; Cationes: sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio). El cromatógrafo es marca Metrohm modelo 883 Basic IC con un detector de conductividad. Para los análisis de aniones se utilizó la columna Metrosep A Supp 5nd150/4.0 con el eluente de carbonato de sodio a 3.2 mmol/L y bicarbonato de sodio a 1.0 mmol/L. Para los análisis de cationes se utilizó la columna Metrosep C 4nd150/4.0 con el eluente de ácido nítrico 1.7 mmol/L y ácido dipicolínico 0.7 mmol/L [74, 75].

3.3.3 Preparación de los medios alternativos con melaza como glucosa y purines porcinos como nitrato de potasio.

Los medios alternativos se preparan exactamente igual al medio de fermento (ver **3.2.1.2**), pero según corresponda, en vez de agregar glucosa se utiliza melaza y en vez de agregar nitrato de potasio se

agregan purines porcinos. Como en ambos casos el volumen de los alternativos es diferente al de los insumos tradicionales, el volumen final del medio se garantiza igual aforando con agua desionizada.

3.3.3.1 Cálculo de la cantidad de melaza y purines a utilizar en los medios alternativos.

Los resultados del CITA de perfil de azúcares para la melaza mostraron que esta tiene glucosa, fructosa y sacarosa. El medio de fermento tiene 10 g/L de glucosa, para obtener esta cantidad de azúcar equivalente con la glucosa, sacarosa y fructosa de la melaza se utilizó la siguiente ecuación:

$$m_m = \frac{10}{(C_s) + (C_g) + (C_f)}$$

Ecuación 6 Cantidad de melaza a utilizar por litro de medio a preparar

Donde:

- ~ 10: la concentración de glucosa en el fermento en g/L.
- ~ m_m (g/L): masa de melaza a utilizar por litro de medio a preparar.
- ~ C_s (g/g_m): concentración de sacarosa en la melaza.
- ~ C_g (g/g_m): concentración de glucosa en la melaza.
- ~ C_f (g/g_m): concentración de fructosa en la melaza.

Para sustituir los 10 g/L de glucosa que tiene el medio tradicional solamente considerando la glucosa de la melaza, se debía utilizar 72 g/L de melaza y el medio nutritivo quedaba muy oscuro y viscoso y pruebas preliminares mostraron la dificultad de las microalgas a aclimatarse a este. Por lo que se asumió que la microalga podía metabolizar la fructosa y sacarosa que también tiene la melaza como lo hizo con la glucosa, y esto permitió entonces utilizar menos cantidad de melaza, pues se calculó un equivalente a 10 g/L de glucosa, pero ahora considerando un equivalente de los tres azúcares que ofrece la melaza. Esta suposición se comprobaría con los análisis de residuos de azúcares.

Los resultados de nutrientes del cromatógrafo de iones/cationes de EIB mostraron que los purines son una fuente primordialmente de nitrógeno, mientras que el aporte de fósforo y otros micronutrientes es despreciables. Como el nitrógeno en los purines se encuentran en forma de amonio, se estimó la cantidad de purines a utilizar por litro de medio de la siguiente manera:

1. Se realizaron pruebas preliminares para determinar la cantidad de amonio que son capaces de tolerar las microalgas antes de que inicie a ser tóxico, esto basado en datos bibliográficos [66]. La cantidad máxima tolerada fue de 400 mg/L de amonio.
2. Se calculó si la cantidad amonio a emplear equipara la cantidad de nitrógeno que suple el nitrato de potasio en el medio de fermento con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\frac{m_{\text{nitrogeno}}}{m_{\text{amonio}}} * C_{\text{amonio}}}{\frac{m_{\text{nitrogeno}}}{m_{\text{nitratopotasio}}} * C_{\text{nitratopotasio}}}$$

Ecuación 7 Cantidad de nitrógeno que suple el amonio respecto al nitrato de potasio

Donde:

- ~ E: cantidad de veces que la cantidad de amonio utilizada por litro de medio equipara la de nitrato de potasio del fermento.
- ~ $m_{\text{nitrogeno}}$ (g/mol): masa molar del nitrógeno.
- ~ m_{amonio} (g/g_m): masa molar del amonio.
- ~ $m_{\text{nitratopotasio}}$ (g/g_m): masa molar del nitrato de potasio.
- ~ C_{amonio} (mg/L): concentración de amonio en los purines porcinos.
- ~ $C_{\text{nitratopotasio}}$ (mg/L): concentración de nitrato de potasio en el fermento.

3.3.4 *Análisis de azúcares, metabolitos y nitrógeno residual*

Las muestras se mantuvieron en congelación al finalizar el experimento hasta el momento del análisis. Los residuos de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos y alcoholes, igual que en 3.2.4 se realizaron en el CITA.

La prueba nitrato residual se realizó con el método de reducción con cadmio (8171 del manual de Análisis de Agua HACH 53) con rango de medición de 0.2 mg/L a 5.0 mg/L. La prueba y amonio residual se hizo con el método de silicato (8155 del manual de Análisis de Agua HACH 53) con rango de medición de 0.01 mg/L a 0.5 mg/L. Los resultados se midieron con colorímetro HACH DR900 [76]. No fue necesario diluir las muestras. Se utilizó la variante del método de ajuste de blanco para las muestras de melaza para que el color de esta no interfiriera en el resultado.

3.3.5 *Diseño experimental y análisis estadístico para crecimiento con medios alternativos.*

Se evaluó el efecto de tres variables independientes; mixotrofia y heterotrofia como ruta metabólica, glucosa y melaza como fuente de carbohidratos y purines y minerales como fuente de minerales, sobre crecimiento como única variable dependiente, el cual se expresó en términos de clorofila y biomasa en peso seco que se produjo. Por lo tanto, se realiza un modelo factorial de 2 x 2 x 2, por lo que se realiza 8 configuraciones experimentales, con tres repeticiones cada uno:

- Mixotrofia: con fuente de luz.
 - Con medio nutritivo de glucosa y minerales (GM) del apartado anterior.
 - Con medio nutritivo de melaza y minerales (MM).
 - Con medio nutritivo de melaza y purines (MP).

- Con medio nutritivo de glucosa y purines (GP).
- Heterotrofia: en oscuridad.
 - Con medio nutritivo de glucosa y minerales (GM) del apartado anterior.
 - Con medio nutritivo de melaza y minerales (MM).
 - Con medio nutritivo de melaza y purines (MP).
 - Con medio nutritivo de glucosa y purines (GP).

Se obtuvo 24 series de datos de clorofila y 24 series de datos de peso seco que se compararon entre sí con Análisis de Varianza Multifactorial con interacción y se interpretan los resultados con el método Tukey con un nivel de significancia $p < 0.05$. Se utiliza el software InfoStat Versión Estudiantil L 2020.

3.4 Producción de hidrógeno

Esta sección describe los procesos preparativos y experimentales que se realizaron para completar el objetivo 3. Se inicia en **3.4.1** explicando detalladamente el proceso de aclimatación del cultivo para la producción de hidrógeno. Luego en **3.4.2** se detalla el diseño y condiciones de los biorreactores utilizados en los experimentos de producción de hidrógeno, luego **3.4.3** el sistema de medición del biogás producido. En **3.4.4** se menciona sobre el análisis de composición del biogás por cromatografía. Finalmente, en **3.4.5** sobre el diseño experimental y tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en esta sección.

3.4.1 Aclimatación del cultivo y condiciones iniciales

Se realizaron dos tipos de experimentos preliminares para entender las condiciones y variables requeridas para estimular la producción de hidrógeno. El primer experimento consistió en poner en botellas de 200 ml herméticas el cultivo a $100 \mu\text{mol}_{\text{fotones}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$ y luego analizarlas con el cromatógrafo de gases marca Agilent con una columna GSndBiogásPro de la misma marca para medir si habían producido hidrógeno. Este experimento sirvió para entender cuál es la mejor forma de aclimatar las microalgas para la producción de hidrógeno y cual debería ser la concentración inicial del cultivo.

Luego se escaló al segundo tipo de experimento preliminar donde se utilizaron los biorreactores descritos en **3.2.2**, pero con agitación electromagnética y completamente herméticos con una única salida a una columna de desplazamiento de líquido (agua) que servía para medir el biogás producido. Esta configuración permitió entender la relación entre fotosíntesis y respiración que se presenta en las microalgas y como esta es afectada por la luz incidente, esto cuando se usó el equipo de monitoreo de

oxígeno oxylab+ marca Hansatech. Una vez entendido estas variables se pasó a realizar el experimento descrito a continuación:

3.4.2 Biorreactores para producción de hidrógeno

Se usaron nueve botellas cuadradas de 500 ml plásticas de 3 cm de espesor interno mostradas en la **Figura 4**, las mismas se modificaron para poner una salida para gases en la parte superior y una para toma de muestras en la parte inferior. En la boca de la botella se puso un tapón de hule para sellarla herméticamente.

Las nueve botellas se acomodaron y fijaron sobre una estructura de madera, la cual estaba sujeta a un agitador orbital que se movía a 90 rpm y permitía la agitación de los cultivos en las botellas. Se utilizó dos lámparas de luz fría y se dosificaron los cultivos con $120 \mu\text{mol}_{\text{fotones}} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$ sobre cada cara de la botella. Como los cultivos con melaza requerían más luz, se colocó otra lámpara que diera a la otra cara de los biorreactores, para evitar el doble de exposición de los cultivos que no lo requería, se forró una de las caras con aluminio como se muestra en **Figura 4**.

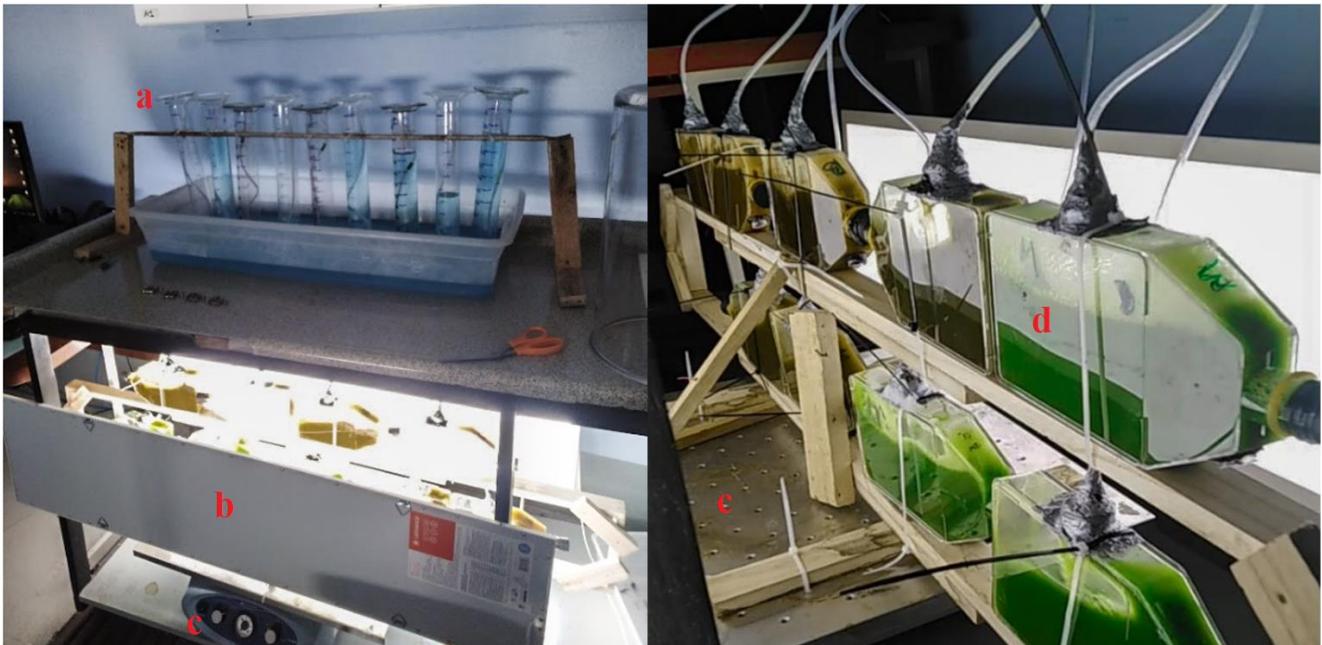


Figura 4 Sistema de Biorreactores para producción y medición de biogás producido. a) probetas para medir volumen de gas por el método de volumen líquido desplazado, b) lámparas planas para iluminación c) sistema de agitación, d) biorreactores.

3.4.3 Medición volumétrica del biogás producido

La salida superior de biogás del biorreactor se conectó a probetas invertidas llenas de agua para medir el volumen de biogás producido mediante el método de desplazamiento. Las 9 probetas se monitorearon mediante fotografías cada hora para ver la tasa de producción de biogás.

3.4.4 Análisis de composición del biogás producido

El biogás producido se analizó hasta el final de la prueba. Se cerró la salida superior de hacia la columna y se llevó el biorreactor al Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de donde se extrajo la muestra de biogás del volumen gaseoso del reactor.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases, que usa argón como biogás portador. Se utilizó un detector TCD de 20.0 ml/min a 205 °C. Se permitió medir hidrógeno, nitrógeno/oxígeno, monóxido de carbono, metano y dióxido de carbono.

3.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico para producción de hidrógeno con diferentes medios.

Se evaluó el efecto de dos variables independientes: fuente de carbohidratos con glucosa y melaza como niveles y fuente de minerales con purines y minerales como niveles; sobre una variable dependiente que corresponde a la producción de hidrógeno, el cual se expresó en términos de volumen producido y concentración de hidrógeno en el biogás. Por lo tanto, se realizó un modelo factorial de 3 x 3, pero se realizaron solamente 3 configuraciones experimentales, con tres repeticiones cada uno, esto porque no consideramos importante evaluar la mezcla de fermento con purines. Entonces se analizaron:

- Medio de glucosa con nitrato (GM), el medio tradicional.
- Medio de melaza con purines (MP), como medio sustituto.
- Medio de melaza con nitrato (MM), como medio sustituto.

Se obtuvo 9 series de datos de tasa de producción de biogás y 9 datos de concentración de hidrógeno en el biogás producido, se compararon entre sí con Análisis de Varianza Multifactorial con interacción y se interpretan los resultados con el método Tukey con un nivel de significancia $p < 0.05$. Se utiliza el software InfoStat Versión Estudiantil L 2020.

4 RESULTADOS

4.1 Crecimiento microalgal y concentración de clorofila en células bajo las rutas tróficas autotrofia, heterotrofia y mixotrofia con la microalga *Chlorella vulgaris* G120 cuando se usó medios nutritivos tradicionales de laboratorio

En este apartado se muestra como varía el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 entre autotrofia, cuando se usó el medio nutritivo mineral K3, y mixotrofia y heterotrofia, cuando se usó el medio nutritivo de glucosa con minerales (GM) (ver 3.2.1).

Como se muestra en las siguientes gráficas de aumento concentración de clorofila en el cultivo y biomasa, la microalga tiene la capacidad de crecer realizando fotosíntesis, respiración o ambos simultáneamente. En el caso de los experimentos en heterotrofia, la concentración inicial de microalgas debió ser mayor porque, basado en experimentos preliminares, esto fue necesario para tuvieran ventaja adaptativa.

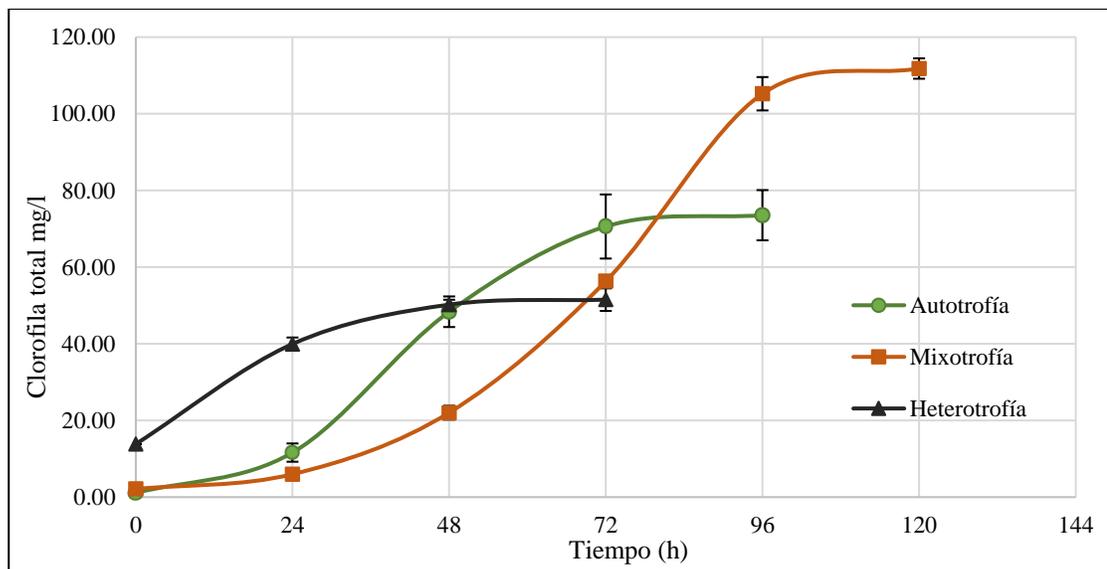


Figura 5 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia)

De la anterior **Figura 5** se distinguen las fases de aclimatación, crecimiento exponencial, disminución relativa de crecimiento y la fase estacionaria en términos de clorofila en el cultivo. Hubo una reducción en la tasa de producción de clorofila en el cultivo entre las 48 h, 72 h y 96 h para heterotrofia, autotrofia y mixotrofia respectivamente. En autotrofia y mixotrofia se muestra una clara

fase de aclimatación de las microalgas mientras que en heterotrofia no. La producción de clorofila en el cultivo según las rutas metabólicas inducidas es significativamente diferente entre sí (ver apéndice 9.2).

Con base en el crecimiento microalgal mostrado en **Figura 6** se puede identificar principalmente la fase exponencial, la cual finalizó alrededor de las 48 horas en autotrofia y heterotrofia, y alrededor de las 72 horas en mixotrofia. La producción de biomasa microalgal bajo las tres rutas tróficas son significativamente diferentes entre sí (ver apéndice 9.2).

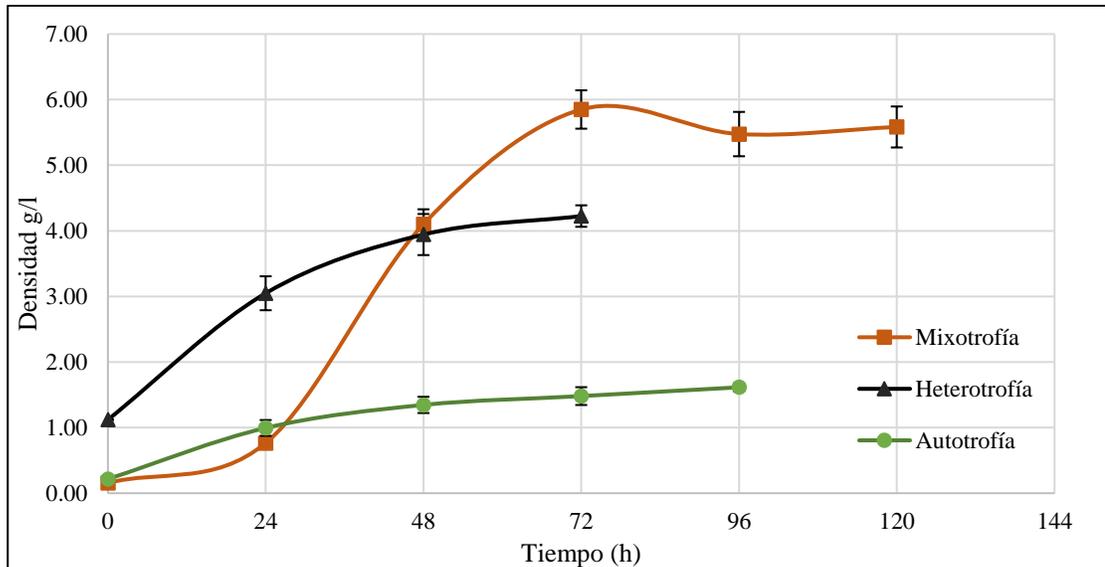


Figura 6 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia)

Comparando la información de la **Figura 5** y **Figura 6** para cada tipo de ruta trófica, el incremento de clorofila en el cultivo no necesariamente obedece un incremento de la biomasa microalgal. Este fenómeno se vuelve más notorio entre las 72 h y 96 h en mixotrofia, donde la densidad de biomasa no aumentó a diferencia de la clorofila en el cultivo, que continuaba teniendo un crecimiento exponencial. Es por ello que lo que aumentó fue la concentración de clorofila en las células, y este parámetro para cada ruta metabólica tuvo comportamientos significativamente diferentes entre sí (ver apéndice 9.3), como se muestra en la **Figura 7**:

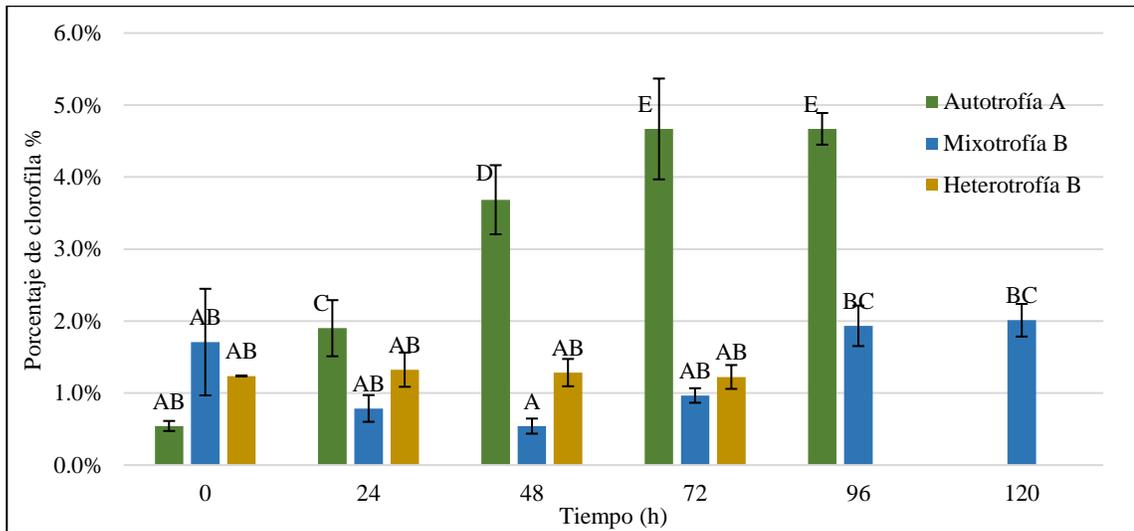


Figura 7 Porcentaje de clorofila en las células de microalgas con base en la biomasa seca; Medidas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

La clorofila en las células aumentó significativamente de un $0.51 \pm 0.16\%$ a $4.56 \pm 1.36\%$ 96 horas en autotrofia, y se mantuvo sin diferencias significativas de $1.24 \pm 0.0\%$ a $1.22 \pm 0.17\%$ durante 72 horas en heterotrofia. En mixotrofia varió significativamente entre $1.71 \pm 1.2\%$ a $2.01 \pm 0.23\%$ en 120 horas, primero hubo una disminución hasta las 48 horas donde se alcanzó la mínima concentración de $0.54 \pm 0.10\%$ y luego aumentó hasta las 96 horas donde se estabilizó. En autotrofia, la concentración de clorofila en las células es significativamente mayor que en mixotrofia y heterotrofia. La concentración de clorofila en las células en mixotrofia y heterotrofia no son significativamente diferentes entre sí (ver apéndice 9.4).

En la siguiente **Figura 8** se muestran los valores finales de clorofila en el cultivo y biomasa microalgal seca alcanzados para los tres experimentos. En mixotrofia se produjo significativamente más biomasa microalgal que en heterotrofia y autotrofia, y en heterotrofia se obtuvo significativamente más biomasa microalgal que en autotrofia. En cuanto a la clorofila en el cultivo, en mixotrofia también produjo significativamente más que en autotrofia y heterotrofia, y en autotrofia se obtuvo significativamente más clorofila en el cultivo que en heterotrofia (ver apéndice 9.4).

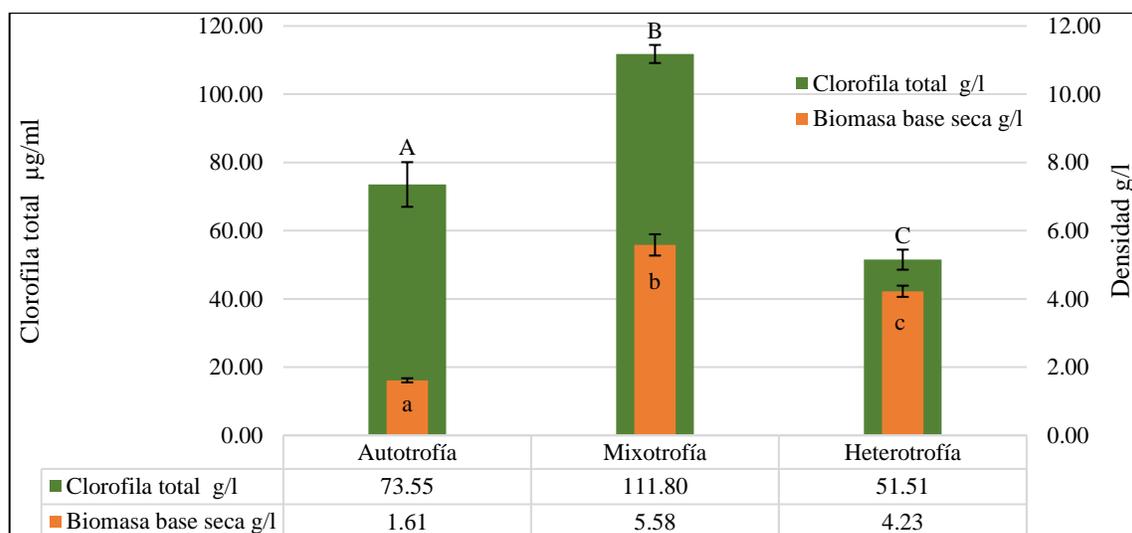


Figura 8 Clorofila total y biomasa seca alcanzados al final de cada experimento para las tres rutas metabólicas evaluadas (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia); Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En la siguiente **Tabla 4** se muestran los resultados de los análisis de azúcares residuales, ácidos volátiles y etanol de los medios de fermento resultantes de las pruebas en mixotrofia y heterotrofia. No hubo residuos de glucosa en las pruebas en mixotrofia y heterotrofia, por lo que se consumió completamente. Hubo presencia de ácido acético en mixotrofia, pero no de los demás ácidos volátiles ni etanol.

Tabla 4 Residuos analizados del medio tras las pruebas de mixotrofia y heterotrofia

	Mixotrofia	Heterotrofia
Glucosa, fructosa, sacarosa (g/100g)	-	-
Ácido acético (mg/100g)	6.3 ± 1.6	-
Demás ácidos volátiles (mg/100g)	-	-
Etanol (ml/100ml)	-	-

Nota: No detectable (-). Azúcares no detectables bajo (<0.032 g/100 g); Etanol no detectable bajo (<0.0019 mL/100 g), los ácidos analizados fueron (ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido butírico, ácido fórmico, ácido succínico, ácido propiónico) y son no detectables bajo (<0.020 mg/L).

4.2 Crecimiento biomasico de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 con purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos y su efecto biorremediativo

En este apartado se expone bajo cual ruta metabólica (heterotrofia o mixotrofia) la microalga *Chlorella vulgaris* G120 logra un mejor crecimiento cuando se usa melaza y purines porcinos como alternativas de la glucosa y nitrato de potasio respectivamente, esto como parte del objetivo específico 2. Se evaluaron tres posibles medios nutritivos alternativos. Es importante recordar que estos medios son casi lo mismo que el medio de fermento (GM) utilizado en el objetivo 1 pero realizando las sustituciones mencionadas anteriormente.

1. **MM:** Melaza con los minerales del medio tradicional.
2. **MP:** Melaza con minerales del medio tradicional, pero sustituyendo el nitrato de potasio con purines porcino.
3. **GP:** Glucosa con minerales del medio tradicional, pero sustituyendo el nitrato de potasio con purines porcino.

La concentración de melaza utilizada para sustituir los 10 g de glucosa en los medios MM y MP calculada con la **Ecuación 6** es de 24 g/L. Los 400 mg/L de amonio que se usó se alcanzó diluyendo 109.0 ml de purines por litro de medio a preparar, y según la **Ecuación 7** abastece 1.1 veces la cantidad de nitrógeno que hay en el medio tradicional GM que tiene nitrato de potasio.

Como se muestra en la siguiente **Figura 9**, cuando se usó el medio nutritivo tradicional de glucosa con minerales (GM) se produjo significativamente más biomasa microalgal y clorofila en el cultivo, tanto en heterotrofia como en mixotrofia, respecto a lo producido cuando se usó los medios nutritivos alternativos.

Comparando la biomasa microalgal seca que se produce usando los diferentes medios alternativos en ambas rutas tróficas; cuando se emplea la melaza con los minerales (MM) se genera significativamente más biomasa microalgal que cuando se usa melaza con purines (MP) pero no que cuando se utiliza la glucosa con purines (GP). No hubo diferencia significativa entre la biomasa microalgal seca que se produjo cuando se usa glucosa con purines (GP) y cuando se utiliza melaza con purines (MP). Ahora comparando los rendimientos de biomasa microalgal seca obtenidos cuando se usó cada medio alternativo en ambas rutas, con los tres medios; melaza con minerales (MM), glucosa con purines (GP)

y melaza con purines (MP) se genera significativamente más biomasa microalgal en mixotrofia que en heterotrofia, resultados acordes a los obtenidos en el apartado anterior.

Comparando la clorofila en el cultivo que se produce cuando se utiliza los tres medios alternativos entre ambas rutas tróficas, cuando se emplea melaza con los minerales (MM) se generó significativamente más clorofila en el cultivo que con la melaza con purines (MP) y que con la glucosa con purines (GP); no hubo diferencia significativa entre la clorofila en el cultivo cuando se utiliza la glucosa con purines (GP) y melaza con purines (MP). Ahora comparando los rendimientos de clorofila en el cultivo para cada medio alternativo entre ambas rutas tróficas; cuando se usa la melaza con minerales (MM) y la melaza con purines (MP) se produce significativamente más clorofila en el cultivo en mixotrofia que en heterotrofia. La clorofila en el cultivo producida al emplear glucosa y purines (GP) no es significativamente diferente entre mixotrofia y heterotrofia (ver apéndice 9.5).

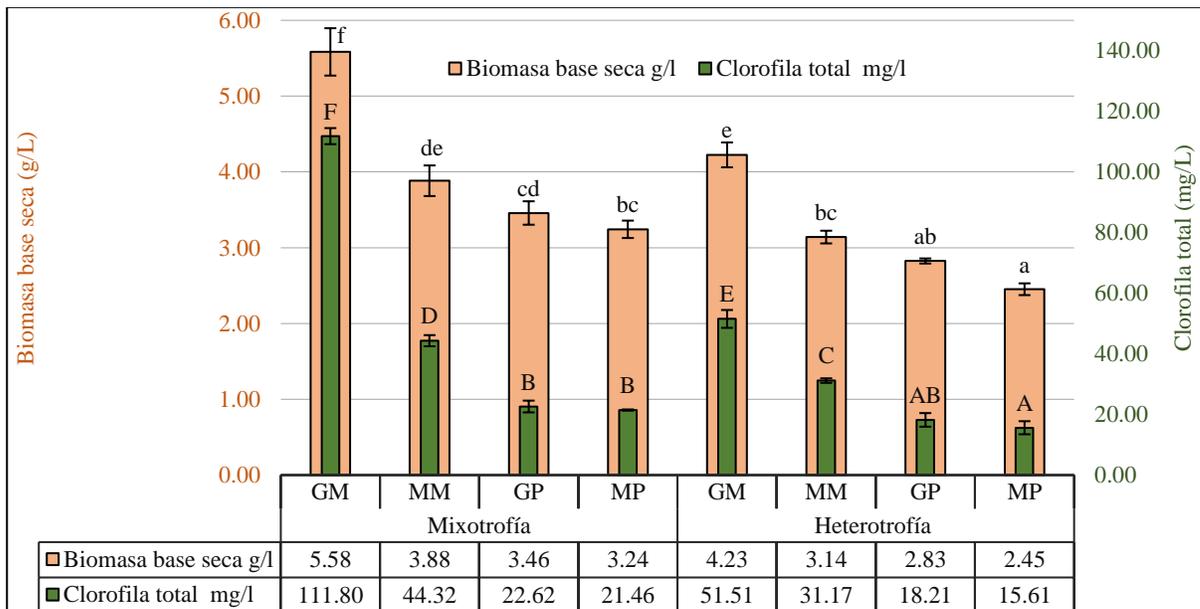


Figura 9 Biomasa seca y clorofila total alcanzados al final de cada experimento para heterotrofia y mixotrofia con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM) y alternativos de melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP); Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Para complementar la información mostrada en figura anterior, en la siguiente **Tabla 5** se muestra cual porcentaje de clorofila en el cultivo y biomasa microalgal seca se produjo cuando se utilizó los tres medios alternativos evaluados (MM, GP, MP) respecto a los producido cuando se usó el medio tradicional de glucosa y minerales (GM), esto tanto en mixotrofia como en heterotrofia.

Tabla 5 Porcentaje de biomasa microalgal seca y clorofila en el cultivo alcanzado con los tres medios alternativos (MM, MP, GP) respecto al alcanzado con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM, 100%) para cada ruta metabólica.

	Biomasa seca (%)		Clorofila en el cultivo (%)	
	Mixotrofia	Heterotrofia	Mixotrofia	Heterotrofia
MM	70.0 ± 10.7 ^{de}	74.5 ± 6.9 ^{bc}	39.7 ± 3.7 ^D	60.8 ± 7.0 ^C
GP	62.3 ± 8.8 ^{dc}	67.0 ± 4.8 ^{ab}	20.3 ± 3.1 ^B	35.7 ± 9.0 ^{AB}
MP	58.4 ± 7.5 ^{bc}	58.2 ± 5.8 ^a	19.2 ± 0.9 ^B	30.6 ± 8.4 ^A

Nota: Medio de melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la **Tabla 6** se muestra como cuando se utilizaron los medios con minerales se obtuvieron significativamente mayores porcentajes de clorofila en el cultivo que cuando se utilizaron los medios alternativos con purines, tanto en mixotrofia como en heterotrofia. Es interesante ver como la concentración de clorofila en el cultivo no es significativamente diferente en mixotrofia y heterotrofia usando el medio alternativo de melaza con minerales (MM) (ver apéndice 9.6).

Tabla 6 Porcentaje de clorofila en las células respecto a la biomasa microalgal seca al final de cada experimento para mixotrofia y heterotrofia y los diferentes medios alternativos evaluados

	Medio	Porcentaje (%)
Mixotrofia	GM	2.01 ± 0.14 ^D
	MM	1.14 ± 0.09 ^{BC}
	GP	0.66 ± 0.07 ^A
	MP	0.66 ± 0.03 ^A
Heterotrofia	GM	1.22 ± 0.10 ^C
	MM	0.98 ± 0.04 ^B
	GP	0.64 ± 0.09 ^A
	MP	0.64 ± 0.10 ^A

Nota: Medio glucosa y minerales (GM), melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En las siguientes gráficas **Figura 10** y **Figura 11** se muestra las curvas de producción de biomasa microalgal obtenida cuando se usó los medios alternativos y la acumulación de clorofila en el cultivo

para la ruta metabólica de mixotrofia. Se iniciaron los experimentos usando los medios alternativos con la concentración inicial de clorofila cerca de 4.5 veces mayor a la utilizada con el medio tradicional de fermento, pues se requería mayor densidad microalgal inicial para superar la fase de aclimatación. Esto se concluyó luego de varios experimentos preliminares donde se evidenciaba que las microalgas no lograban sobrevivir el segundo día, incluso para cultivos ya adaptados al medio. Las diferencias iniciales en peso seco se deben a que no necesariamente hay una relación que siempre se cumple entre densidad de biomasa y densidad de clorofila, y la prueba de clorofila fue la que utiliza al para estimar la densidad inicial de forma indirecta de cada experimento por ser la forma más rápida de hacerlo, esto para evitar estrés sobre el cultivo al sembrarlo en el experimento.

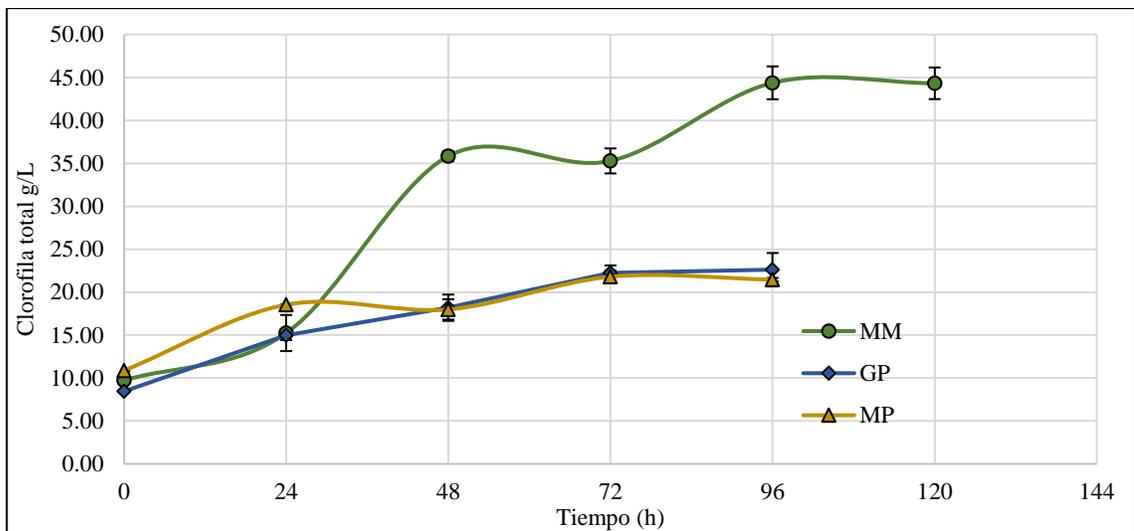


Figura 10 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos de mixotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

En **Figura 10** se observa como cuando se usó el medio de melaza con minerales (MM) la producción de clorofila fue significativamente mayor que cuando se utilizó glucosa con purines (GP) y melaza con purines (MP), y con estos últimos dos no hubo diferencias significativas entre sí (ver apéndice 9.6).

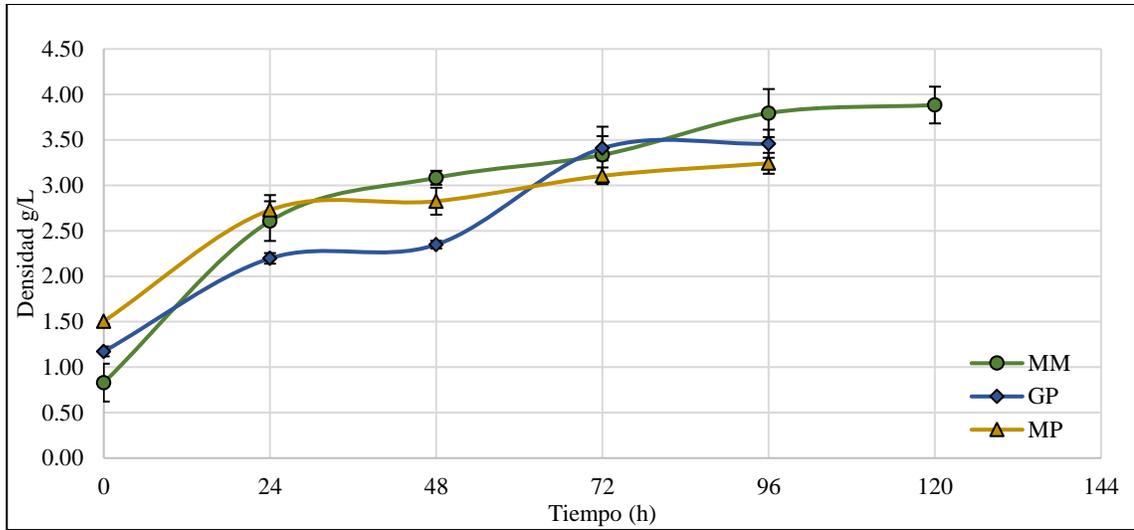


Figura 11 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de mixotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

En la gráfica anterior **Figura 11** se muestra que, en el caso de aumento de densidad microalgal, también cuando se usó la melaza con minerales (MM) se obtuvo una significativamente mayor producción de biomasa que cuando se usó los otros dos medios de glucosa y melaza con purines (GP y MP), e igualmente entre ellos no hubo diferencias significativas (ver apéndice 9.6).

En las siguientes gráficas **Figura 12** y **Figura 13** se muestran las curvas de acumulación de clorofila y biomasa seca obtenidas con los medios alternativos bajo la ruta metabólica de heterotrofia. En estos casos la concentración inicial de clorofila en el cultivo y densidad microalgal fue prácticamente la misma para todos los experimentos.

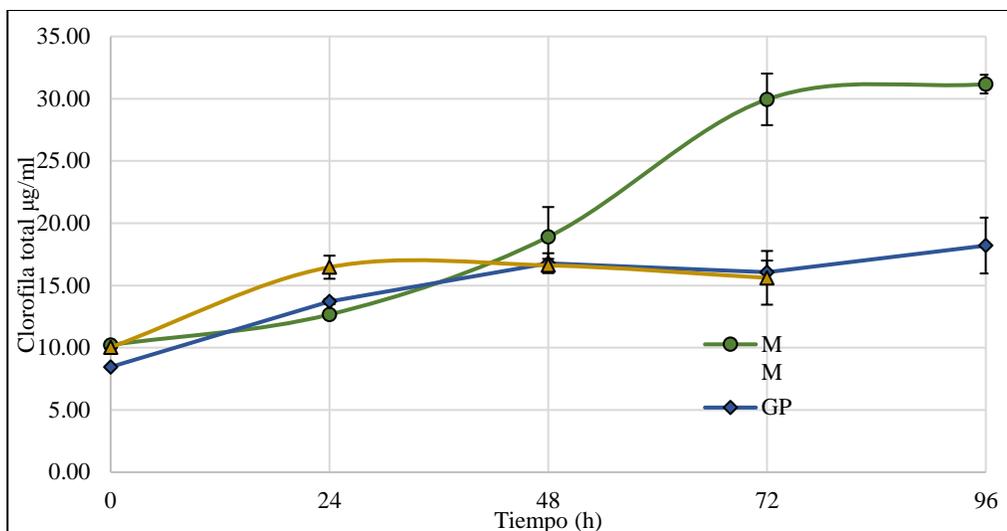


Figura 12 Cambio de la concentración de clorofila total en el reactor durante los experimentos de heterotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

En la figura anterior se observa cómo, similarmente a lo ocurrido en mixotrofia, con el medio de melaza con minerales (MM) se produjo significativamente más clorofila que con los otros dos medios alternativos con purines; glucosa con purines (GP) y melaza con purines (MP).

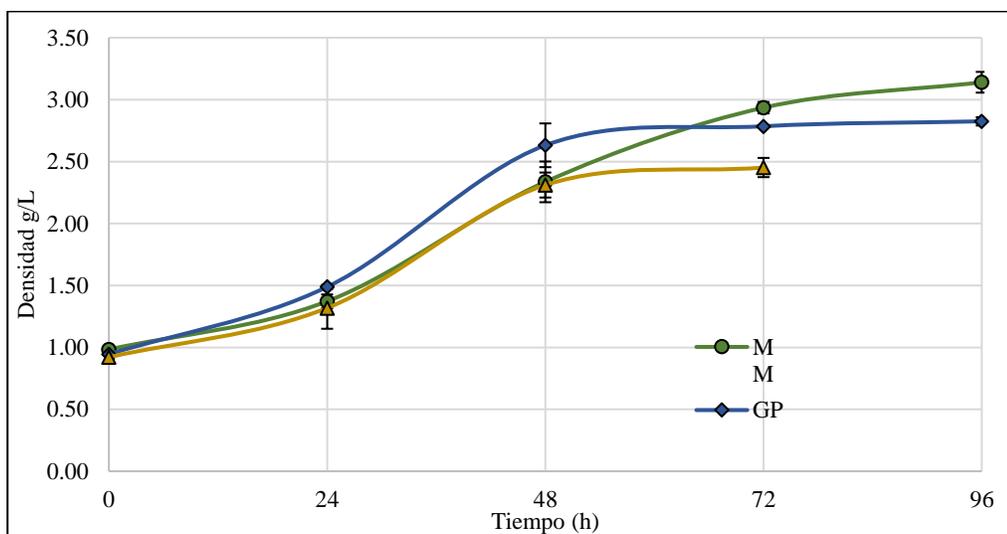


Figura 13 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de heterotrofia para los tres medios alternativos evaluados: melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

En cuanto a la biomasa seca no hubo diferencias significativas cuando se usó los tres medios alternativos en heterotrofia (ver apéndice 9.7).

4.2.1 Efecto de la luz sobre la mixotrofia con melaza

Debido al color opaco que da la melaza a los medios nutritivos alternativos donde se utilizó, esta tuvo un efecto negativo en la disponibilidad de luz que tuvieron las microalgas y por lo tanto en su capacidad fotosintética. Como se muestra en la siguiente **Figura 14** resultado de medir la absorbancia del medio nutritivo con melaza contra el medio tradicional con glucosa GM. Se puede ver que esta interfiere principalmente las longitudes de onda entre los 400 nm y los 550 nm. Además, comparando el medio de melaza con minerales (MM) contra el medio con glucosa con minerales (GM) que prácticamente no tiene absorbancia en todo el espectro fotosintético, se puede ver que las microalgas que crecieron en un medio con melaza produjeron significativamente menos clorofila, tanto en el cultivo como en términos de densidad de clorofila en las células, respecto a las que crecieron con el medio tradicional.

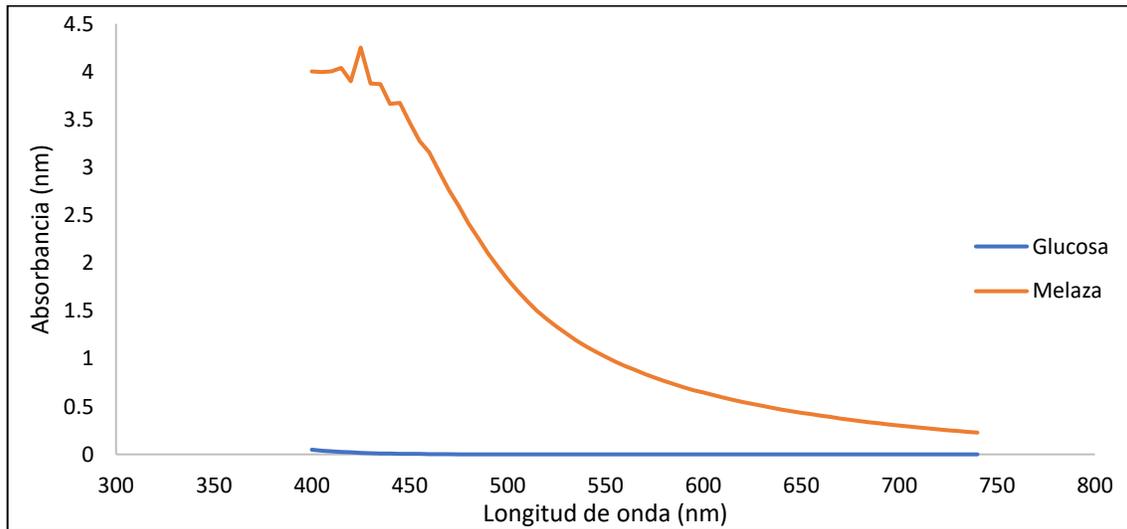


Figura 14 Absorbancia del medio con melaza y del medio con glucosa para el espectro visible aprovechable por las microalgas

Por este motivo al duplicar la cantidad de la luz que da al reactor, manteniendo el mismo medio de melaza con minerales (MM), se pudo ver el efecto de la opacidad de la melaza sobre la clorofila en las células. Se obtuvieron los resultados mostrados en las siguientes gráficas **Figura 15** y **Figura 16** de clorofila en el cultivo y biomasa microalgal para el medio de melaza con minerales (MM) con una y dos fuentes de luz:

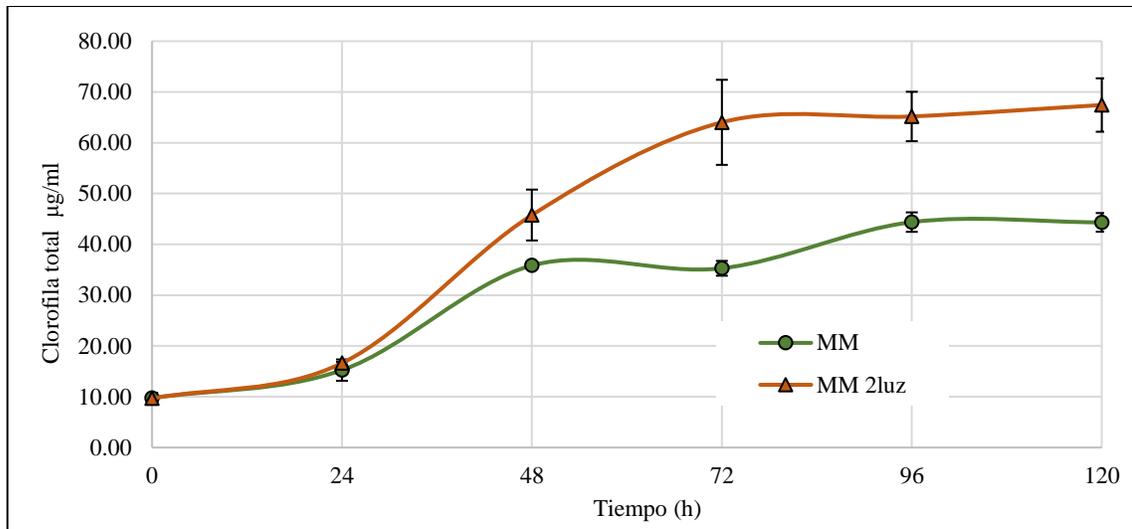


Figura 15; y melaza con minerales y luz en las dos caras del reactor (MM 2luz)

Según la **Figura 15**, la cantidad de clorofila en el cultivo que se produce durante el experimento con luz a ambas caras del reactor (MM 2luz) es significativamente mayor la que se obtiene en el experimento normal con luz solamente en una de las caras (MM) a partir del tercer día, llegando a generar al final del experimento 67.43 ± 5.26 mg/L y 44.32 ± 1.82 mg/L respectivamente. En cuanto al comportamiento, con el doble de luz se observa una fase de crecimiento más marcada entre las 24 h y 72 h, mientras que con una única luz se podría decir que hay dos de estas fases, la primera entre las 24 h y 48 h, y la segunda entre las 72 h y 96 h, pues entre las 48 h y 72 h no hubo incremento (ver apéndice 9.8).

El comportamiento de producción de biomasa seca, como se muestra en **Figura 16**, es diferente al de clorofila pues no hubo diferencias significativas entre ambos experimentos (ver apéndice 9.8)., incluso en el último día del experimento donde se genera 3.88 ± 0.20 g/L y 4.13 ± 0.14 g/L de biomasa seca para el experimento con una y dos fuentes de luz respectivamente. En cuanto al comportamiento, se observa como el cultivo del experimento de una única luz (MM) incremento la biomasa principalmente durante las primeras 24 h, mientras que, cuando se emplea dos luces, entre las 24 h y 48 h.

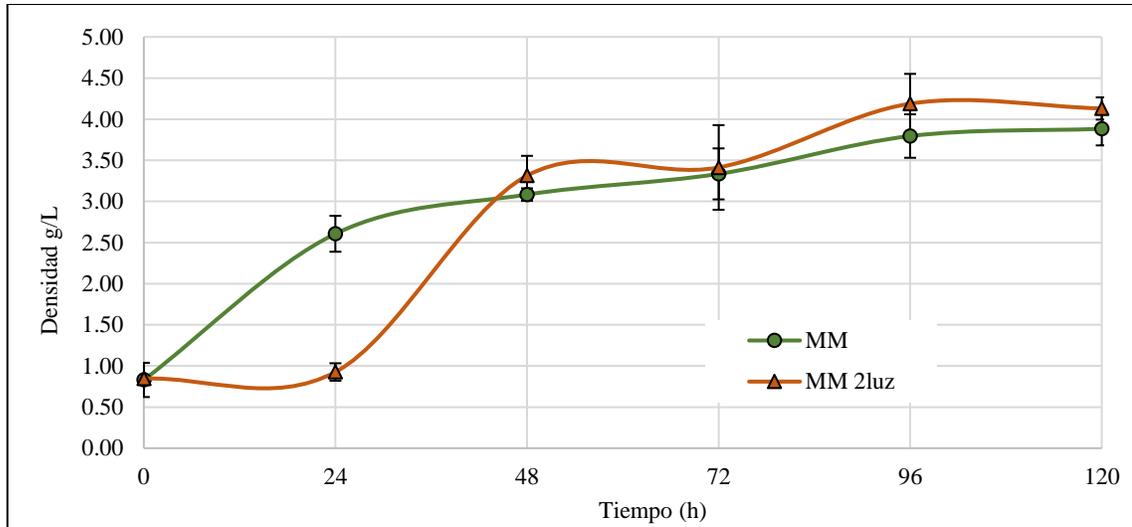


Figura 16 Producción de biomasa microalgal seca durante los experimentos de mixotrofia con melaza con minerales y luz a una cara del reactor (MM); y melaza con minerales y luz en las dos caras del reactor (MM 2luz)

Comparando ambos gráficos, hay un comportamiento entre las 24 h y 48 h que llama la atención en ambos experimentos. En el caso del experimento cuando se usó solamente una luz, durante este periodo, no hubo aumento de clorofila en el cultivo, pero sí de peso seco, mientras que cuando se usó dos luces sucede lo contrario, incrementa la clorofila, pero no el peso seco. En la siguiente **Tabla** se muestra como varió la concentración de clorofila en las células durante ambos experimentos que son significativamente diferentes entre sí, y mayor en el experimento con dos fuentes de luz.

Tabla 7 Porcentaje de clorofila en las células respecto a al peso seco durante cada experimento, con una y dos luces, de mixotrofia usando melaza y minerales tradicionales

	Mixotrofia con 1 luz	Mixotrofia con 2 luces
Tiempo (h)	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
0	1.29 ± 0.63 ^{ABC}	1.15 ± 0.25 ^{AB}
24	0.60 ± 0.18 ^A	1.69 ± 0.15 ^{CD}
48	1.16 ± 0.07 ^{ABC}	1.26 ± 0.17 ^{BCD}
72	1.07 ± 0.20 ^{AB}	1.65 ± 0.32 ^D
96	1.18 ± 0.19 ^{ABC}	1.44 ± 0.16 ^{BCD}
120	1.15 ± 0.15 ^{AB}	1.55 ± 0.12 ^{BCD}

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.2.2 *Reciclaje de los compuestos nitrogenados de los purines porcinos y de los azúcares de la melaza de caña durante el crecimiento microalgal como parámetro biorremediativo de tanto en mixotrofia y como en heterotrofia*

Como se ve en la **Tabla 8**, tras medir los residuos de amonio de los medios alternativos con purines al final de los experimentos, los medios pasaron de tener 400 mg/L, que fue la concentración inicial, a menos de 1 mg/L en todos los casos. No se detectó amonio residual en el medio tradicional GM porque que no tienen purines, como se esperaba. El nitrato de los medios con purines pasó de 20.34 mg/L a un máximo de 3.8 mg/L, y en los medios tradicionales de fermento con nitrato de potasio pasó de 2000 mg/L a un máximo de 1.3 mg/L. Entonces se podía decir que, tanto en los medios con purines como en los medios tradicionales, el amonio y el nitrato de potasio se consumieron casi por completo.

Tabla 8 *Cambio en la concentración de nitrato y amonio tras el crecimiento para medios de fermento y alternativos con purines en mixotrofia y heterotrofia*

		Nitrato (mg/L)		Amonio (mg/L)	
		Concentración inicial	Concentración final	Concentración inicial	Concentración final
Mixotrofia	GP	20.34	3.65 ± 0.21	400	0.375 ± 0.46
	MP	20.34	0.95 ± 0.07	400	0.445 ± 0.04
Heterotrofia	GP	20.34	2.8 ± 0.28	400	0.46 ± 0.03
	MP	20.34	0.9 ± 0.14	400	0.07 ± 0.1
	MM	2000	1.05 ± 0.35	0	-
	GM	2000	1.3 ± 0.14	0	-

Nota: No detecta (-). Amonio no detectable a concentraciones menores a (<0.001 mg/L). Medio glucosa y minerales (GM), melaza y minerales (MM), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP)

En la siguiente **Tabla 7** se muestran los resultados de los análisis de azúcares residuales, ácidos volátiles y etanol de los medios resultantes de las pruebas de mixotrofia y heterotrofia. No hubo residuos de glucosa ni sacarosa, las cuales se consumieron completamente. En cuanto a la fructosa hubo residuos en varios de los experimentos: en mixotrofia con melaza y minerales con una y dos luces (MM y MM 2 luz), también en melaza con purines; y en heterotrofia en melaza con purines (MP). En cuanto a los ácidos volátiles, destaca el ácido láctico el cual se produce en todos los experimentos con melaza. En heterotrofia de melaza con minerales (MM) fue donde se genera más variedad de ácidos volátiles, pues se detecta presencia de ácido láctico, butírico, fórmico y acético y propiónico. Se produce ácido succínico en heterotrofia con melaza y purines (MP), de ácido málico en mixotrofia de melaza con dos fuentes de

luz (MM 2 luz), ácido maleico en mixotrofia de melaza con minerales (MM) y ácido propiónico en mixotrofia con glucosa y purines (GP). No hubo presencia de etanol en ningún caso.

Tabla 7 Residuos analizados del medio tras las pruebas de mixotrofia y heterotrofia con medios alternativos

	Mixotrofia				Heterotrofia		
	MM	MM 2 luz	MP	GP	MM	MP	GP
Fructosa (g/100g)	0.56 ± 0.12	0.46 ± 0.1	0.249 ± 0.035	-	-	0.322 ± 0.045	-
Glucosa (g/100g)	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa (g/100g)	-	-	-	-	-	-	-
Ácido láctico (mg/L)	21.8 ± 5.2	116 ± 28	156 ± 37	-	176 ± 42	295 ± 71	-
Ácido butírico (mg/L)	-	-	-	-	700 ± 168	-	-
Ácido fórmico (mg/L)	-	-	-	-	11.5 ± 2.7	-	-
Ácido acético (mg/L)	-	-	-	-	168 ± 40	-	-
Ácido succínico (mg/L)	-	-	-	-	-	10.8 ± 2.6	-
Ácido málico (mg/L)	-	58.5 ± 18	-	-	-	-	-
Ácido maleico (mg/L)	124 ± 3.0	-	-	-	-	-	-
Ácido propiónico (mg/L)	-	-	-	1.7 ± 0.42	6.2 ± 1.5	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-

Nota: No detectable (-). Los medios son melaza y minerales (MM), melaza y minerales con dos fuentes de luz (MM 2 luz), glucosa y purines (GP) y melaza con purines (MP). Azúcares no detectables bajo (<0.032 g/100g); Etanol no detectable bajo (<0.072 g/100g). Los ácidos analizados fueron (ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido butírico, ácido fórmico, ácido succínico, ácido propiónico) y son no detectables bajo (<0.020 mg/L).

4.3 Producción de hidrógeno por la microalga *Chlorella vulgaris* G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y los purines porcinos como medio de crecimiento.

Primeramente, se expone la metodología de aclimatación del cultivo que se desarrolló tras múltiples experimentos para lograr que las microalgas produjeran hidrógeno. Seguidamente se exponen los resultados de producción de hidrógeno obtenidos con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM), y con los medios alternativos melaza con minerales (MM) y melaza con purines (MP).

4.3.1 *Aclimatación del cultivo.*

Los experimentos sin éxito, realizados para intentar conseguir que la microalga produjese hidrógeno, ofrecieron información importante para desarrollar la metodología de aclimatación que finalmente funcionó. El primer intento fue tomar el inóculo de un cultivo crecido en autotrofia con K3 y pasarlo inmediatamente a producir hidrógeno en medio nutritivo de glucosa con minerales (GM). Luego, pensando en que el cultivo debía estar mejor aclimatado a la respiración, se pasó a tomar el inóculo de condiciones mixotróficas medio nutritivo GM, pero sin conseguir aún resultados positivos. Tras múltiples experimentos donde se descartó que se trataba de la intensidad de luz o la agitación lo que estaba limitado la producción de hidrógeno, se probó aclimatar el inóculo en condiciones heterotróficas antes de ponerlo a producir hidrógeno, obteniendo un resultado positivo.

Entonces, la metodología de aclimatación encontrada que mejor resultados muestra en la producción de hidrógeno fue: al inóculo antes de iniciar el experimento debía ser crecido en oscuridad al menos por tres días, con suficiente oxígeno disuelto para evitar la fermentación y por el contrario promover la respiración y el crecimiento. Y al pasarlo a producir hidrógeno en medio mixotrófico fresco, la intensidad de la luz al que se exponía el cultivo debía compensar la tasa de respiración que había desarrollado durante su crecimiento heterotrófico, para que se consumiera el oxígeno de la fotosíntesis por la respiración. Además, se comprobó que iniciar con una concentración de 2 g/L de biomasa seca permitía que hubiera suficiente crecimiento como para agotar el oxígeno rápidamente e iniciar la anaerobiosis requerida en la producción de hidrógeno.

4.3.2 *Rendimientos de volumen de biogás producido*

En esta sección se expone los rendimientos de biogás producido y en términos de volumen acumulado en el tiempo, y su concentración final de hidrógeno. Es importante indicar que con la mezcla de purines con melaza (MP), el cultivo no logró sobrevivir a las condiciones de producción de hidrógeno, muriendo la mayoría de las células de microalgas y produciendo un volumen de biogás despreciable. El experimento tarda 91 horas, y se detiene cuando ya no hubo cambio en el volumen de biogás producido en todos los biorreactores.

Cuando se utilizó medio tradicional de glucosa con minerales (GM) se produjo $966.7 \text{ mL} \pm 38 \text{ mL}$ de biogás con cada biorreactor de 400 mililitros durante todo el experimento, mientras que cuando se usó el medio sustituto de melaza y minerales (MM) se produjo $450.0 \text{ mL} \pm 23.0 \text{ mL}$ con cada biorreactor de 400 mililitros. Como se dijo anteriormente con el medio nutritivo de melaza con purines

(MP) no se produjo biogás. En las siguientes graficas **Figura 17** y **Figura 18** se muestra el volumen de biogás producido con el medio de melaza con minerales (MM), se observa como los biorreactores tienen por cerca de 10 horas de diferencia entre ellos para iniciar con la producción de biogás, pues el reactor tres (R3) inicio la producción a las 30 horas de iniciado el experimento, el reactor uno (R1) a las 37 horas y el reactor dos (R2) a las 40 horas. El R1 y R2 produjeron la mayoría del biogás en 10 horas, mientras que R3 tarda cerca de 30 horas. Igualmente, cerca de las 60 horas en los tres biorreactores se detuvo la producción del biogás.

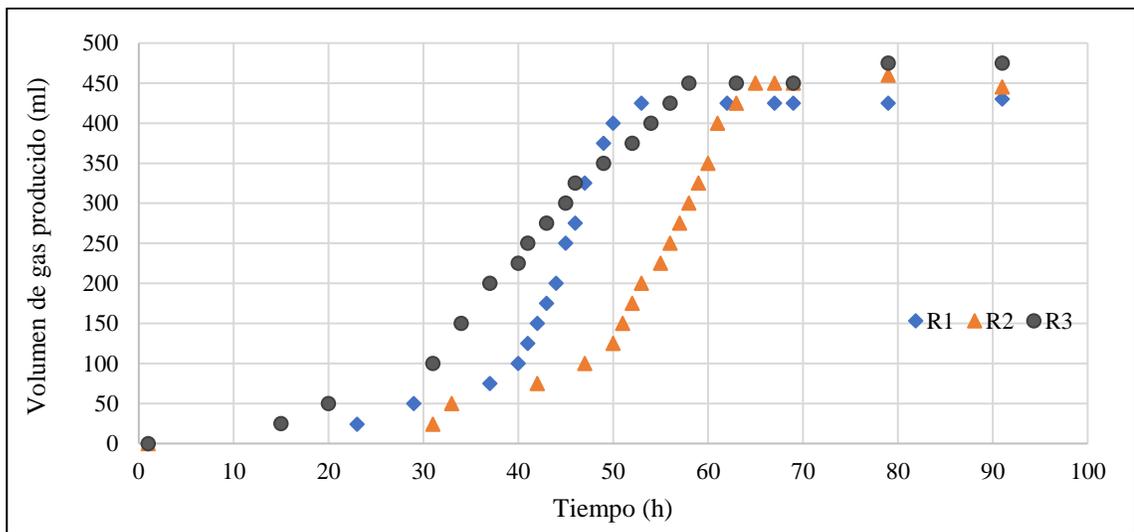


Figura 17 Cambio en el volumen de biogás producido por los tres biorreactores usando melaza como sustituto de la glucosa.

En la siguiente grafica **Figura 18** se muestra el volumen de biogás producido con el medio nutritivo alternativo de melaza con minerales (MM). Se observa como en los Biorreactores dos (R2) y tres (R3) las microalgas iniciaron la producción de biogás cerca de las 30 horas de iniciado el experimento, y tardaron cerca de 20 horas produciendo la mayoría del biogás. Mientras que el reactor 1 (R1) las microalgas iniciaron la producción en la hora 20 y tardó cerca de 50 horas en producir la mayoría del biogás. Es decir, los biorreactores dos y tres tuvieron una producción más intensiva que el reactor uno.

Cambio en el volumen de biogás producido en los tres biorreactores usando el medio tradicional de fermento.

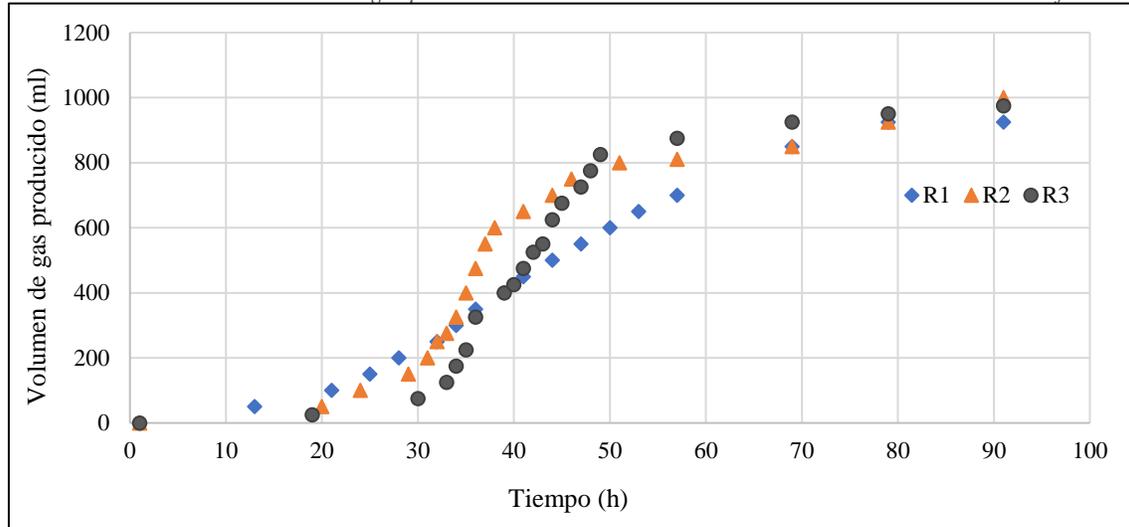


Figura 18

Es importante recordar que todos los biorreactores iniciaron con 100 mL de aire y 400 mL de cultivo. Estos 100 mL gaseosos contienen oxígeno y se debe consumir al inicio para alcanzar la anaerobiosis.

4.3.3 Concentración de hidrógeno detectado en el biogás producido

Se analizó el biogás producido por las microalgas de los biorreactores con melaza y minerales (MM) y glucosa y minerales (GM). De las botellas con melaza y purines (MP) solamente se analizó una para comprobar que, como se sospechaba debido a la muerte del cultivo, no había hidrógeno en el volumen gaseoso de reactor.

Se detectó presencia de hidrógeno en el biogás producido en los tres biorreactores con medio tradicional de glucosa y minerales (GM) y los tres biorreactores con el medio sustituto de melaza con minerales (MM). La concentración de hidrógeno, en litros de hidrógeno por litros de biogás producido, encontrado en los biorreactores con medio de fermento (GM) fue de $0.19 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{muestra}} \pm 0.013 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{muestra}}$, es decir, del total de biogás producido por las microalgas, cerca de un 20% era hidrógeno. La concentración de hidrógeno, en litros de hidrógeno por litros de biogás producido, medido de los biorreactores melaza y minerales (MM) fue de $0.05 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{muestra}} \pm 0.003 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{muestra}}$, es decir, del total de biogás producido, cerca de un 5% era hidrógeno.

Entonces con esos valores de concentración expuestos anteriormente, y la cantidad total de volumen de biogás producido por cada botella, se puede afirmar que con los 4 g de glucosa de cada

botella de los experimentos con medio tradicional de fermento (GM) un volumen total de $0.18 \text{ L} \pm 0.010 \text{ L}$ de hidrógeno, es decir, se produjo 45 mililitros de hidrógeno por gramo de glucosa. Y se genera con los 9.6 gramos de melaza de cada botella de los experimentos con el medio sustituto de melaza con minerales (MM) $0.023 \text{ L} \pm 0.002 \text{ L}$ de hidrógeno, es decir, se produce 2.40 mililitros de hidrógeno por gramo de melaza.

Suponiendo el biogás producido como un gas ideal a temperatura estándar (273.15 K), presión atmosférica estándar (101.32 kPa) y la masa atómica del hidrógeno como 1 u (2 mol/g), se produjeron $1.07 \text{ mg} \pm 0.07 \text{ mg}$ de hidrógeno por gramo de glucosa y $0.12 \text{ mg} \pm 0.007 \text{ mg}$ de hidrógeno por gramo de melaza. En la siguiente **Tabla 8** se resumen los resultados directos e indirectos descritos anteriormente.

Tabla 8 Resumen de los resultados obtenidos de volumen de biogás producido y su concentración de hidrógeno

	Volumen total de biogás	Proporción de hidrógeno	Volumen de hidrógeno por gramo de insumo	Masa de hidrógeno por gramo de insumo
	L	L_H/L_m	ml _H /g	mg _H /mg
Glucosa	966.7 ± 38	0.19 ± 0.013	45 ± 2.5	1.07 ± 0.07
Melaza	450 ± 23	0.05 ± 0.003	2.4 ± 0.2	0.12 ± 0.007

5 Discusión de resultados

5.1 Crecimiento de biomasa para las rutas nutritivas autotrofia, heterotrofia y mixotrofia con la microalga *Chlorella vulgaris* G120 cuando se usó medios tradicionales de laboratorio

Como se vio en Error! Reference source not found.1 la microalga *Chlorella vulgaris* G120 puede absorber minerales del medio K3 y crecer en autotrofia, también absorber minerales más glucosa del medio de fermento y crecer en heterotrofia y mixotrofia. Un estudio enfocado en las expresiones genómicas en *Chlorella vulgaris* [77] confirmó la alta flexibilidad que tiene esta microalga para alternar entre estas rutas tróficas según la disponibilidad de luz y el tipo de fuente de carbono exógeno disponible activando enzimas como el citocromo c-peroxidasa mitocondrial, ferredoxina NADP⁺ reductasa, etanolamina quinasa y formiato deshidrogenasa principalmente las cuales impactan en los diferentes flujos metabólicos hacia la producción de biomasa. A continuación, se discute porque se cree que las microalgas sí cambiaron en los tres diferentes modos tróficos para crecer según las condiciones en las que se encontraba.

La concentración de pigmentos fotosintéticos en las células al finalizar cada experimento (concentración de clorofila en las células) es un buen indicador para comprender qué modo trófico se expresó en cada prueba, porque en la medida que más dependían de la luz para llevar a cabo fotosíntesis, más de estos pigmentos se iban a expresar en las células. Y como se esperaba en autotrofia hubo más concentración de clorofila en las células ($4.56\% \pm 1.36\%$), pues las células dependían únicamente de la energía luminosa para crecer.

En mixotrofia y heterotrofia hubo concentraciones de clorofila en las células significativamente menores que en autotrofia al final del experimento ($2.01\% \pm 0.23\%$ y $1.22\% \pm 0.17\%$ respectivamente), lo que indica que no dependían completamente de la energía de la luz como en la autotrofia, sino que también realizaban respiración para obtener energía y crecer. Estudios recientes en *Chlorella* demuestran que en mixotrofia las células tienen menor clorofila comparación con las células bajo crecimiento autotrófico [78][79], y lo explican como mecanismo de supervivencia al activar la vía de respiración y depender menos de la fotosintética. Además, las concentraciones de clorofila en las células alcanzadas en mixotrofia y heterotrofia no fueron significativamente diferentes entre sí, y como en heterotrofia las células realizaron solamente respiración, entonces esto puede significar que en mixotrofia también la respiración fue predominante sobre la fotosíntesis porque las células no debieron aumentar tanto la clorofila como en autotrofia. Pero si evaluamos la **Figura 7**, podemos ver un comportamiento interesante

en la concentración de clorofila en las células en mixotrofia, pues disminuyó hasta las 48 horas de experimento y luego de ahí incremento hasta el final de este a las 120 horas. Esta disminución inicial de la concentración de clorofila en células ya ha sido confirmada por investigadores que exponen que la presencia de glucosa en el medio de crecimiento induce a una degradación del aparato fotosistema II [80] porque se reduce la cantidad de proteínas en las membranas de los tilacoides [81] debido a la predominancia de la respiración. Y tras el agotamiento de los carbohidratos, las células recuperaron capacidad fotosintética hasta que de nuevo se agotaron los minerales como también ya se ha registrado [82][79].

Otro aspecto que puede explicar la baja concentración de clorofila en las células en mixotrofia es que la alta densidad celular alcanzada provocara que entrara menos luz al cultivo y hubiese zonas oscuras, fenómeno que ya ha sido verificado [83], y que probablemente por este motivo empezaron a dispensar de la luz y promover más la respiración. Pero lejos de ser un problema, es una de las ventajas que ofrece la mixotrofia y que se ha discutido [84] pues permite diseñar biorreactores de mayor volumen que requieran menor superficie respuesta a la luz, lo que se traduce en mayores rendimientos económicos y de uso de suelo[85].

Sin embargo, bajo ruta metabólica con mejor rendimiento en términos de concentración de clorofila en el cultivo fue en mixotrofia (111.8 ± 2.66 mg/L), luego en autotrofia (73.55 ± 6.55 g/L) y de ultima en heterotrofia (51.51 ± 2.94 g/L). Este mismo comportamiento se obtuvo en [86] con *Chlorella vulgaris* al evaluar un sistema mejorado de fijación de CO₂. Que en mixotrofia se tenga más clorofila en el cultivo, pero menos concentración en las células se debe simplemente a que produjo significativamente más biomasa que en autotrofia. Como era de esperar, en heterotrofia al dispensar de la luz habría menos clorofila en el cultivo.

Bajo la ruta metabólica donde se obtuvo mejor rendimiento en términos de biomasa fue en mixotrofia (5.58 ± 0.31 g/L), luego en heterotrofia (4.23 ± 0.12 g/L) y de ultimo en autotrofia (1.05 ± 0.05 g/L), mismo comportamiento que ya ha sido demostrado por otros estudios con *Chlorella vulgaris* [87]. Se explica la baja productividad de biomasa en autotrofia debido al fenómeno de autosombreado que se hacen las células entre sí y que ya ha sido demostrado como limitante de crecimiento [88], pues hay un momento donde la densidad celular alcanzada no permite que llegue luz adecuadamente a todo el cultivo, y este al depender únicamente de la luz detiene su crecimiento. En mixotrofia, y como ya se explicó en 2.3, la célula puede obtener energía también de carbohidratos exógenos, por lo que el

fenómeno de autosombreado que limita a la autotrofia es menos perjudicial, porque en zonas oscuras puede seguir obteniendo energía de la respiración para crecer y esto ya ha sido demostrado [89].

En mixotrofia se consumió toda la glucosa, no hubo presencia de etanol ni ácidos volátiles excepto por el ácido láctico del cual solamente se detectó $63 \text{ mg/L} \pm 16 \text{ mg/L}$. Se ha encontrado producción de hasta 160 g/L de ácido acético por *Chlorella vulgaris* en mixotrofia y se asocia a la fermentación de glucosa [90]. Que haya habido fermentación en el experimento de crecimiento con mixotrofia se puede deber a que no hubo suficiente oxígeno disponible para que se diera la respiración completa, pero no se puede descartar tampoco la presencia de bacterias acéticas. En heterotrofia no se detectaron residuos de azúcares, tampoco de ácidos volátiles ni de etanol. Que se consumiera toda la glucosa reafirma el hecho de que las células de microalgas la consumieron para obtener energía.

5.2 Crecimiento biomásico de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 con purines porcinos como fuente de nutrientes y melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos y su efecto biorremediativo

Para los medios de melaza con minerales (MM) y melaza con purines (MP) se utilizó 24.0 g/L de melaza para reemplazar los 10 g/L de glucosa del medio tradicional de fermento. Esa cantidad de melaza ofrecía 2.11 g/L de fructosa, 1.21 g/L de glucosa y 6.91 g/L de sacarosa. Con base en la investigación bibliográfica realizada no se ha intentado sembrar microalgas en concentraciones tan altas de melaza, lo más alto encontrado en la literatura fueron 5 g/L de melaza, pero se complementó con sacarosa [91], igualmente el nivel de extracción de azúcares al que se somete la melaza puede influir en su disponibilidad de estos y por lo tanto en la concentración empleada. Es importante recordar esta concentración de melaza también se determinó con base en experimentos preliminares donde se evaluaron diferentes concentraciones para conocer el límite donde las microalgas podrían crecer sin mucha dificultad, y a partir de 24 g/L se nota un importante decaimiento en el crecimiento.

Como se muestra en la **Figura 14** Absorbancia del medio con melaza y del medio con glucosa para el espectro visible aprovechable por las microalgas **Figura 15**, el principal inconveniente de una concentración tan alta de melaza en el medio es que la absorbancia de esta va a repercutir negativamente en los aparatos fotosintéticos de las células, pues llegará menos luz a sus cloroplastos, como se ha demostrado en recientes estudios donde los pigmentos y la turbidez de las aguas de descarga afectan la fotosíntesis de las microalgas [92][93]. Por este motivo se esperaba que las microalgas aprovecharan los azúcares de la melaza para compensar la deficiencia fotosintética, y así sucedió.

Para los tres medios alternativos evaluados, no hubo residuos de glucosa ni sacarosa, lo que indica que se consumieron completamente. Se ha demostrado que la *Chlorella* tiene la capacidad de metabolizar sacarosa tanto en mixotrofia como en heterotrofia [94], sin embargo, también se ha comprobado que la *Chlorella* asimila mejor los monosacáridos [95][96] que los disacáridos pues pasan más fácilmente a través de la plasmalema hacia el glucolisis [97]. Por lo tanto, es curioso que hubiera residuos de fructosa en varios de los experimentos: en mixotrofia con melaza y minerales con una y dos luces (MM y MM 2 luz), también en mixotrofia con melaza con purines (MP); y en heterotrofia en melaza con purines (MP).

En cuanto a los ácidos volátiles, destaca el ácido láctico del cual hay presencia en todos los experimentos con melaza, y ya se ha registrado que esta microalga en específico produce ácido láctico por fermentación tanto en luz como oscuridad [90]. En heterotrofia de melaza con minerales (MM) fue donde se genera más variedad de ácidos volátiles, pues se detectó presencia de ácido láctico, butírico, fórmico y acético y propiónico. Se ha registrado la síntesis de ácido fórmico por esta microalga en oscuridad [90], pero respecto a los otros ácidos presentes no se logró encontrar información que asocie su producción a la microalga, por lo que no se puede descartar presencia de bacterias en los experimentos. Nuevamente, y como se explicó en 2.3, si la microalga no tiene oxígeno disponible va a aprovechar los carbohidratos por la vía fermentativa produciendo ácidos volátiles. Probablemente la carencia de oxígeno se deba a que el burbujeo de aire dentro del reactor pudo ser deficiente, y, además, hubo poco oxígeno fotosintético debido a la baja tasa de esta vía trófica que se dio en estos experimentos.

En los medios de melaza con purines (MP) y glucosa con purines (GP) se utilizó 109.0 ml/L de purines para intentar remplazar el nitrógeno que da los 2 g/L de nitrato de potasio del medio tradicional de fermento, alcanzando una concentración de 400 mg/L de amonio y satisfaciendo 1.1 veces el nitrógeno del medio tradicional de fermento con nitrato de potasio. El amonio en estos medios (GP, MP) se consumió completamente en mixotrofia y heterotrofia. Ya se ha comprobado la capacidad de *Chlorella vulgaris* removiendo hasta 71.4 mg/L/día de amonio con un cultivo domesticado y tolerando hasta 678 mg/L de amonio [98] superando los 184 mg/L donde la mayoría de las microalgas empiezan a tener inhibición [66]. Aunque también se ha evidenciado que altas tasas de amonio se evapora en cultivos de *Chlorella*, y que este se transforma en amoniaco libre, que significó ser el principal factor de estrés afectando negativamente el crecimiento de microalgas y su fotosíntesis [99], efecto que pudo ser intensificado por el burbujeo empleado en los experimentos.

Entonces, queda claro que durante estos experimentos las microalgas lograron aprovechar los azúcares de la melaza y el amonio de los purines como nutrientes para crecer, reduciendo la carga contaminante de ambos subproductos y teniendo un efecto biorremediativo sobre ellos. Esto ya ha sido comprobado en otras investigaciones donde microalgas *Chlorella* redujeron en cerca de un 60% la demanda química de oxígeno, y compuestos amoniacales de medios nutritivos con melaza [100]. Pero ahora queda contestar que tan adecuados son estos dos nutrientes para sustituir la glucosa y el nitrato de potasio utilizado en los medios tradicionales en términos de crecimiento y acumulación de clorofila en las células y el cultivo, pues ambos además de ser buena fuente de nutrientes también tienen desventajas. La opacidad de la melaza afecta la fotosíntesis, y el amonio de los purines puede convertirse fácilmente en amoníaco y ser tóxico para las microalgas, además de que en este caso particular se detectaron altas concentraciones de cloro que afecta negativamente las microalgas (ver **2.9**).

Con el experimento de duplicar la cantidad de luz sobre un cultivo con melaza y minerales (MM) se puede entender cuál es el efecto de la opacidad de la melaza sobre la clorofila en las células. Al duplicar la cantidad de luz se logró incrementar la producción de clorofila de 44.32 ± 1.82 mg/L a 67.43 ± 5.26 mg/L, pero no la de biomasa que al final se mantuvo igual entre ambos experimentos: 3.88 ± 0.20 g/L con una luz y 4.13 ± 0.14 g/L con dos luces (ver **4.2.1**). Por consiguiente, lo único que se logró fue aumentar la clorofila en las células de $1.15\% \pm 0.15$ a 1.55 ± 0.12 . Cuando se usó el medio de melaza con minerales (MM) en mixotrofia con una luz se obtuvo una concentración menor de clorofila en células a la alcanzada en heterotrofia con el mismo medio. Esto significa que la opacidad de la melaza afecta tanto la fotosíntesis como lo hizo tener el cultivo en oscuridad, y que al duplicar la cantidad de luz para superar esto sigue sin ser suficiente para igualar el rendimiento obtenido en mixotrofia con el medio nutritivo con glucosa y minerales (GM) el cual tiene una opacidad significativamente menor. Esto también explica porque no hubo diferencia en la concentración de clorofila en las células entre mixotrofia y heterotrofia con el medio de melaza con minerales (MM), además de que tampoco las hubo entre mixotrofia y heterotrofia cuando se usó el medio de glucosa con minerales (GM), el cual tiene mucho menos opacidad. Es decir, en mixotrofia, el nivel de autosombreo generado por las microalgas utilizando un medio relativamente transparente (GM) puede llegar a ser tan alto que repercute, en términos de clorofila en las células, igual que utilizar un medio con melaza (MM) el cual tiene una opacidad significativamente mayor.

El nitrógeno amoniacal de los purines pareciera ser menos adecuado que el nitrato de potasio del medio de fermento, pues repercutió en la concentración de clorofila en las células, lo cual es contrario a

la teoría que dice que el amonio es más fácilmente metabolizable por las microalgas que el nitrato (ver **2.9**). Es decir, en nitrógeno del nitrato de potasio estuvo más disponible para sintetizar pigmentos fotosintéticos (ver **2.5**) que el amonio de los purines. Pues al utilizar el medio de melaza con purines (MP) como en el de glucosa con purines (GP) las células tuvieron menor concentración de clorofila que las crecidas en medio de melaza con minerales (MM) tanto en mixotrofia y heterotrofia. Contrario a lo que se esperaba inicialmente, que en el medio con glucosa y purines (GP), al eliminar la opacidad de la melaza, hubiera más concentración de clorofila que en melaza con minerales (MM), pero al no suceder así, es muy probable entonces que los purines tuvieran mayor implicación sobre la clorofila que la melaza.

A este punto sabemos que las microalgas son capaces de absorber principalmente la glucosa y sacarosa de la melaza, y que el amonio de los purines se removió por completo de los medios, probablemente por absorción del cultivo y por evaporación en forma de amoniaco. también sabemos que la melaza y los purines traen consigo una reducción de la capacidad fotosintética de las microalgas. Pero desde una perspectiva de producción de biomasa y clorofila en el medio, a continuación, se discute sobre los rendimientos alcanzados con estos medios alternativos. Pero primero, es importante recordar que, al sustituir la glucosa con melaza, y el nitrato con el amonio de los purines, no se estaba buscando incrementar la tasa de crecimiento de la microalga, sino reducir los costos empleando y revalorizando subproductos agrícolas a la vez que se les reduce su carga contaminante.

Como se vio en la **figura 9**, en términos de biomasa y clorofila que se genera, bajo mixotrofia se tiene mejor rendimiento que en heterotrofia para cada uno de los medios alternativos (MM, MP, GP). Este es el mismo comportamiento observado con el medio tradicional de glucosa (GM). Además, como era de esperar, utilizando el medio tradicional de glucosa con minerales (GM) se genera más biomasa y clorofila que con los tres medios alternativos evaluados (ver **Tabla 5**). En esta **Tabla 7** se puede ver y comparar los porcentajes de biomasa seca y clorofila alcanzados al utilizar los tres medios alternativos con melaza y purines respecto al alcanzado cuando se utilizó el medio tradicional de glucosa y minerales (GM) bajo cada ruta metabólica. De los tres medios, con el que se obtuvo mejor rendimiento fue con el de melaza con minerales tanto en mixotrofia como heterotrofia, alcanzando un $70.0\% \pm 10.7\%$ y $74.5\% \pm 6.9\%$ respectivamente de la biomasa alcanzada cuando se utilizó el medio de fermento. A pesar de que se obtuvo la misma producción de biomasa que cuando se utilizó el medio de glucosa con purines, se dice que logró un mejor rendimiento porque alcanzó mayor cantidad de clorofila en el cultivo respecto a lo alcanzado con los otros dos medios. Cuando se utilizó el melaza con minerales (MM) en mixotrofia

se obtuvo un menor rendimiento de biomasa microalgal al final del experimento, y esto puede deberse nuevamente al impacto de la opacidad de la melaza sobre la fotosintética en las microalgas, pues con este medio se alcanzó solamente un $39.7\% \pm 3.7\%$ de la clorofila alcanzada cuando se utilizó el medio tradicional de glucosa con minerales (GM) también en mixotrofia, lo que se traduce en menor capacidad de producir energía por la vía fotosintética.

En la **Figura 9** y en la **Tabla 5** Porcentaje de biomasa microalgal seca y clorofila en el cultivo alcanzado con los tres medios alternativos (MM, MP, GP) respecto al alcanzado con el medio tradicional de glucosa y minerales (GM, 100%) para cada ruta metabólica. Se puede observar el comportamiento que se ha explicado anteriormente; ninguno de los medios alternativos ofreció un rendimiento tan bueno como los alcanzados con el medio tradicional de fermento para ambas rutas tróficas evaluadas, pero funcionaron principalmente para incrementar la biomasa como se muestra en las gráficas de crecimiento **Figura 13** y **Figura 13**. Es decir, si los carbohidratos de la melaza o el amonio de los purines no hubieran sido metabolizables, no hubiera sucedido el crecimiento que ahí se comprobó. Evaluar el crecimiento con estos medios tiene como fin ver cuál es la mejor forma para producir biomasa para una eventual producción de hidrógeno, y como se verá más adelante, es necesario que esta crezca en oscuridad para que se puedan activar los mecanismos de la hidrogenasa, enzima productora de hidrógeno. Lo que se necesita es crecer cultivo en oscuridad, pero alcanzando la mayor concentración de clorofila en las células, por lo que el mejor medio sustituto para hacerlo es el de melaza con minerales como ya se vio anteriormente. Los purines, aunque fueron fuente de nitrógeno para sostener un crecimiento, incluso con glucosa se produjo menos clorofila, y además que como se verá más adelante, tienen un carácter tóxico en la producción de hidrógeno.

5.3 Cuantificación de la cantidad de hidrógeno producido por la microalga *Chlorella vulgaris* G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y los purines porcinos como medio de crecimiento.

5.3.1 Aclimatación del cultivo

Como se explicó en **2.7** para que la microalga *Chlorella vulgaris* G120 produzca hidrógeno se deben cumplir dos condiciones simultáneamente. La primera es que la hidrogenasa no se inhiba por el oxígeno producido en la fotosíntesis, por lo que es necesario condiciones anaeróbicas, y la segunda que el flujo de electrones del aparato fotosistema I no sea hacia el RuBisCo, como normalmente sucede para la fijación de CO₂, sino que hacia la hidrogenasa para que esta pueda ionizar protones de hidrógeno y

producir H₂. El método de aclimatación encontrado para promover estas condiciones fue crecer el cultivo utilizar heterotróficamente, ya sea con fermento o melaza, por al menos 3 días antes de iniciar la producción de hidrógeno. En ocasiones los cultivos crecidos de esta manera llegaban a producir un olor comúnmente asociado a la fermentación, por lo que se debía aumentar el oxígeno disuelto con agitación o burbujeo para promover la respiración en vez de la fermentación. Una vez que se tiene suficiente biomasa de microalgas aclimatada a la respiración, se inicia la producción de hidrógeno exponiendo dicho cultivo a una intensidad de luz que promueva la fotosíntesis a una tasa que compense la de respiración, buscando así un máximo rendimiento de producción de hidrógeno y un consumo total por parte del mismo cultivo del oxígeno producido por la fotosíntesis.

A pesar de que no se realizó un análisis genético de expresiones enzimáticas, que es la única forma certera de asegurar que el proceso de aclimatación encontrado promovió los metabolismos en las células de la microalga para que alcanzara esas dos condiciones deseadas, a continuación, se explica porque muy probablemente si influyó para que así sucediera.

Crece el cultivo heterotróficamente obliga a las microalgas a obtener energía únicamente por glucolisis, lo que posiblemente las prepara para tener una tasa de respiración suficientemente alta como para consumir el oxígeno que se genera por la fotosíntesis al iniciar la producción de hidrógeno, logrando la anaerobiosis necesaria. Las veces que se tomaba un cultivo mixotrófico o autotrófico para iniciar la producción de hidrógeno, posiblemente este no tenía una tasa de respiración tan alta como para alcanzar la anaerobiosis.

Respecto al RuBisCo, al someter el cultivo al crecimiento heterotrófico no hay fijación de CO₂ porque no hay fotosíntesis, por lo que creemos que esta enzima pierde funcionalidad o se degrada, evitando que haya flujo de electrones hacia los aparatos fotosintéticos cuando el cultivo se expone a la luz para la producción de hidrógeno. Pero el CO₂ que el RuBisCo deja de fijar para iniciar el ciclo de Calvin y posterior síntesis de glucosa se ve sustituido por el carbono orgánico de los carbohidratos exógenos que las microalgas pueden metabolizar, y que también aprovechan para obtener energía.

5.3.2 Producción de hidrógeno con la microalga *Chlorella vulgaris* G120

Vale la pena iniciar el análisis de los resultados obtenidos de producción de hidrógeno discutiendo el impacto negativo que significó emplear purines como fuente de nitrógeno en estos experimentos. Como ya se vio anteriormente, el cultivo puede crecer en un medio con purines, y producir biomasa. Contrario a lo que sucedió en los experimentos con hidrógeno, donde luego de múltiples pruebas, se

comprobó que, bajo ninguna de las concentraciones de purines empleada en el medio, las microalgas lograron sobrevivir las primeras 24 horas. Es decir, los purines podrían funcionar para la fase de producción de biomasa, pero no para la reproducción de hidrógeno, y la única diferencia entre ambos experimentos era que, en los experimentos de crecimiento, los gases producidos podían escapar a la atmosfera, mientras que en los experimentos de producción de hidrógeno no. No se realizó ningún experimento o prueba que demostrara contundentemente el porqué de este comportamiento, pero se pueden realizar las siguientes suposiciones fundamentadas en información bibliográfica.

Se sospecha de dos componentes presentes en los purines como causa de la muerte de las microalgas en estos experimentos, primero el amoniaco que se pudo producir a partir del amonio y del cloro. Como ya se vio en **2.9** el amoniaco es tóxico para las microalgas, al igual que el cloro a concentraciones mayores a 0.25 mg/L de hipoclorito. Al finalizar los experimentos, el pH en todas las botellas era mayor a 10 debido al CO₂ por lo que probablemente el amonio se había convertido en amoniaco acuoso. Por otro lado, al revisar los análisis de aniones que se les hizo a los purines, se detectó 2.6 g/L de ion cloruro, lo que indica que había una cantidad de hipoclorito muchísimo mayor a la que estas microalgas son capaces de soportar. Una posible explicación de porque estos factores mortales para las microalgas no tuvieron tanto peso en los experimentos de crecimiento, es que en estos se realizaba burbujeo en el medio, y esto pudo favorecer el escape en forma de biogás cloro y amoniaco gaseoso estos dos componentes tóxicos permitiendo la supervivencia. Este burbujeo no se realizó en los experimentos de hidrógeno porque se busca alcanzar condiciones anaeróbicas, además de tener un volumen de gas controlado y completamente destinado a almacenar el biogás producido.

5.3.3 *Volumen y concentración de hidrógeno del biogás producido*

Con el medio de melaza con purines (MP) no se produjo biogás ni hidrógeno como se explicó anteriormente en **5.3.2**. Con el medio tradicional de fermento (GM) se produjo cerca del doble de biogás que con el medio sustituto de melaza con minerales (MM), y además con mucha mayor concentración de hidrógeno. Con el fermento (GM) se produjo 966.7 mL ± 38 mL de biogás, del cual 190 mL ± 13 mL eran de hidrógeno (19.6% de pureza), obteniendo un rendimiento de 1.07 mg ± 0.07 mg de hidrógeno por gramo de glucosa empleado en el medio. Con el medio sustituto de melaza (MM) se produjo 450.0 mL ± 23.0 mL de biogás, del cual 50.0 mL ± 3.0 mL eran de hidrógeno (11.1% de pureza), obteniendo un rendimiento de 0.12 mg ± 0.007 mg de hidrógeno por gramo de melaza empleado en el medio.

Como se esperaba, el medio nutritivo de fermento (GM) tuvo mejor rendimiento que el de melaza (MM), a pesar de que tenían la misma concentración de azúcares. No se realizaron pruebas que determinaran contundentemente a que se debió esta diferencia, pero con base a los análisis de resultados que se han realizado, hay supuestos que pueden explicar este fenómeno. El primero es la opacidad de la melaza que reduce la capacidad fotosintética de las microalgas, como se explicó en 4.2.1, y el otro factor puede ser la calidad de la sacarosa y fructosa respecto a la glucosa como fuente de carbohidratos. Tener mayor capacidad fotosintética permite a las microalgas inyectar más electrones desde los fotosistemas hacia la hidrogenasa.

Tras varios experimentos realizados con *Chlorella vulgaris* se ha encontrado que un factor clave en la producción de hidrógeno es controlar el pH en 8 [101], y este fue un factor que pudo repercutir negativamente en la producción de hidrógeno en esta investigación tanto cuando se utilizó el medio tradicional de glucosa con minerales (GM) como el medio alternativo de melaza con minerales (MM). Al inicio de los experimentos se fijó el pH de ambos medios en 6.2, pero al final de las pruebas tras medir el pH de las seis botellas se encontró que este era mayor a 10. Debido a lo complejo que hubiera sido la evaluación y control del pH en el sistema experimental que se generó para estas pruebas, este factor se no fue controlado durante las corridas, y el pH tuvo ese incremento muy probablemente debido al CO₂ y moléculas orgánicas producidas por las microalgas.

Otro factor que pudo repercutir en la producción de hidrógeno fue la inhibición de la hidrogenasa por el oxígeno presente en el medio producto de la fotosíntesis de las mismas microalgas. El cultivo muy probablemente realizó respiración y consumió gran parte del oxígeno producto de la fotosíntesis, pero no hubo forma de medir su concentración durante las pruebas ni de instalar otro mecanismo para consumirlo. En otras investigaciones se han alcanzado mejores rendimientos de hidrógeno producido por *Chlorella vulgaris* cepa CCALA256 en autotrofia pura (1 246 ml H₂/L) durante seis días [102], que los obtenidos en esta investigación durante el mismo periodo en mixotrofia, pero utilizando un cocultivo de bacterias junto a las microalgas para que estas consuman el oxígeno disuelto. Aunque ni las condiciones de cultivo, ni los medios nutritivos son comparables, es importante ser crítico de la motivación de esta investigación de evaluar la mixotrofia como mecanismo de remoción de oxígeno para sostener la producción de hidrógeno evitando la inhibición de la hidrogenasa. En el caso de utilizar un cocultivo en autotrofia pura, como se hizo en esa investigación, se está ahorrando insumos de carbohidratos, pero vuelve el sistema más dependiente de la luz, limitándolo al punto de inhibición por el autosombreo como se vio en la primera sección de esta investigación.

Igualmente, en otra investigación se alcanzaron, tras 8 días, mejores rendimientos de hidrógeno producido en autotrofia (896 ml H₂) y heterotrofia (405 ml H₂) [90] utilizando la misma cepa G-120 de *Chlorella vulgaris* usada en esta investigación. Aunque, igualmente las condiciones de medio nutritivo y experimentales a nivel de reactores no son comparables con las de esta investigación, ellos concluyen que con esta cepa se podrían obtener buenos resultados mixotrofia [103], pero esto no se pudo comprobar en esta investigación. Esto permite reevaluar los resultados de rendimiento de hidrógeno generado en esta investigación, donde teóricamente se esperaba una producción mayor a la alcanzada. Una causa de esto pudo ser las condiciones experimentales en términos de biorreactores y mecanismos de traslado y análisis del biogás, donde se pudo perder pureza del biogás subestimándola en las mediciones.

Un aporte de esta investigación que podría ser innovador para la producción de hidrógeno es el mecanismo de agitación utilizado. Este al ser horizontal por la acción del agitador tipo orbital, generaba una especie de “oleaje” sobre el medio de cultivo de cada biorreactor, y al “romper” estas “olas” se incrementaba el intercambio gaseoso entre la fase líquida y la fase gaseosa fomentando la remoción de hidrógeno, factor necesario para incrementar la producción de este metabolito. Esto podría servir de inspiración para el diseño de agitadores que no necesariamente sean horizontales, sino también verticales pero que busquen romper la tensión superficial de la fase líquida para obtener este beneficio.

Aunque los rendimientos de hidrógeno obtenidos estuvieron por debajo de lo esperado, es importante rescatar que por esta investigación se logró por primera vez en Costa Rica producir hidrógeno por medio de microalgas. Y todo eso utilizando biorreactores no especializados de construcción propia, y, además, evaluando la melaza de caña de azúcar como fuente de carbohidratos. De esta investigación surgen muchas recomendaciones para favorecer los rendimientos y promover la continuidad de la exploración de esta tecnología.

6 CONCLUSIONES

Esta investigación demuestra cómo, con enfoques de economía circular propios de la ingeniería en biosistemas, se pudo integrar la revalorización y saneamiento de subproductos agrícolas desde el inicio del desarrollo de nuevas tecnologías bioenergéticas.

6.1 Determinar bajo cual ruta nutritiva (autotrofia, heterotrofia o mixotrofia) la microalga *Chlorella vulgaris* G120 tiene un mejor crecimiento utilizando medios nutritivos tradicionales de laboratorio

La microalga *Chlorella vulgaris* G120 logró una mayor concentración de clorofila en las células en autotrofia. Pero en mixotrofia se produjo más biomasa microalgal y clorofila en el cultivo. En heterotrofia la biomasa alcanzada no estuvo tan lejos de alcanzar la obtenida en mixotrofia, pero sí fue mucho mayor a la obtenida en autotrofia.

El bajo rendimiento de biomasa en autotrofia se pudo deber al fenómeno de autosombreo, donde la densidad de células de microalgas que se alcanzó limitó el adecuado ingreso de luz al cultivo. En autotrofia, la luz es la única fuente energética para el crecimiento, como esta se limitó, lo hizo entonces también la producción de biomasa microalgal.

La mixotrofia permitió reducir significativamente el efecto negativo del autosombreo, permitiendo que se produjera más biomasa microalgal incluso sobre el nivel de densidad en la que se detuvo el crecimiento en autotrofia. Esto porque las microalgas empezaron a utilizar la glucosa como fuente energética alterna cuando estuvieron en zonas de iluminación limitada, lo que permitió una producción más sostenida de biomasa. Esto permite evaluar los biorreactores de crecimiento biomásico microalgal, donde evitar zonas oscuras puede ser sustituido por agregar carbohidratos como fuente alterna de energía.

En heterotrofia, utilizar la glucosa como fuente energética para el crecimiento causó un mayor rendimiento biomásico que utilizar solamente la luz como fuente energética en el cultivo autotrófico. Esto permitió seguir a la siguiente fase, donde la opacidad de la melaza por evaluar podía representar una seria limitante al crecimiento al evitar el ingreso de luz al cultivo.

La microalga *Chlorella vulgaris* G120 puede aclimatarse fácilmente entre autotrofia, heterotrofia y mixotrofia. Eso quedó reflejado en los cambios de concentración de clorofila en las células de las pruebas en mixotrofia.

6.2 Evaluar agua de descarga de una chanchera, como fuente de nutrientes, y melaza de caña de azúcar, como fuente de carbohidratos, para producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* G120 en mixotrofia y heterotrofia, y evaluar reducción compuestos nitrogenados y azúcares como parámetros biorremediativos.

La melaza de caña es una opción aceptable como alternativa a la glucosa, pues sus azúcares fueron aprovechados como fuente energética por las microalgas para crecer. Pero no se alcanzaron los mismos rendimientos que los obtenidos cuando se utilizó medio tradicional con glucosa, tanto en mixotrofia como heterotrofia. El color de la melaza provoca que la luz no llegue adecuadamente a las células, impactando sobre la acumulación de clorofila en estas. Se puede decir que el aporte energético de la fotosíntesis en el crecimiento del cultivo cuando se usó un medio con melaza es muy reducido.

Los purines porcinos evaluados no fueron un buen sustituto del nitrato de potasio comercial, incluso al ofrecer una buena cantidad de nitrógeno metabolizable. Se cree que esto pudo ser principalmente por la alta concentración de cloro que tenían y afectaba directamente la supervivencia de las microalgas, aunque también pudo ser por la formación de amoníaco que es igualmente tóxico. Se vio una relación entre el uso de estos purines y bajos niveles de clorofila en las células.

Los compuestos nitrogenados de los purines se removieron completamente tras los experimentos, igualmente los azúcares de la melaza, a excepción de la fructosa en algunas ocasiones. Esto significa que el crecimiento de esta microalga sobre estos subproductos agrícolas reduce su carga contaminante y tienen un efecto biorremediativo sobre ellos.

El medio alternativo que mejor rendimiento tuvo fue el de melaza, pero con los minerales tradicionales, pues produjo más clorofila que los otros dos medios con purines, y más biomasa que el medio de melaza con purines. Como se debe crecer las microalgas en oscuridad para la producción de hidrógeno, este es un buen candidato para hacerlo.

6.3 Cuantificar la cantidad de hidrógeno producido por la microalga *Chlorella vulgaris* G120 comparando medios tradicionales de laboratorio contra la melaza y el agua porcina como medio de crecimiento.

Se logró producir hidrógeno aprovechando el metabolismo de la *Chlorella vulgaris* G120, utilizando tanto la glucosa comercial como la melaza de caña. Los purines afectaron negativamente la producción de hidrógeno, posiblemente por la alta concentración de cloro que tenían y por la transformación de amonio en amoníaco que no pudo escapar del reactor.

Se produjo más volumen de biogás y con mayor pureza de hidrógeno cuando se usó el medio tradicional de glucosa con minerales que con el medio alternativo de melaza con minerales, muy posiblemente debido a la opacidad de la melaza, la cual reduce la tasa fotosintética de las microalgas y por lo tanto el flujo de electrones desde los fotosistemas hacia la hidrogenasa.

Lograr producir hidrógeno a base de los azúcares residuales de la melaza significa que se pueden aprovechar y transformar su energía química en un biocombustible gaseoso utilizando los procesos metabólicos de la microalga *Chlorella vulgaris* G120.

A pesar de que se esperaban mejores rendimientos de pureza de hidrógeno, haber logrado producir hidrógeno por primera vez en Costa Rica aprovechando el metabolismo de microalgas, y demás creciendo en subproductos agrícolas utilizando biorreactores no especializados construidos a mano fue un importante primer paso en el desarrollo de esta emergente tecnología.

7 RECOMEDACIONES

Estudiar la sinergia que la *Chlorella vulgaris* puede tener con bacterias y hongos para aprovechar aún más los nutrientes disponibles en aguas residuales agrícolas ricas en azúcares como la melaza de caña [104], y como estos otros microorganismos pueden ayudar a consumir más rápidamente el oxígeno evitando la inhibición de la hidrogenasa [105].

Evaluar otros subproductos agrícolas como fuente de fósforo como alternativa al fosfato de potasio. Igualmente, evaluar otros subproductos ricos en azúcares pero que tengan menos opacidad, para que no se vea afectada la fotosíntesis de las microalgas. Utilizar purines como fuente de nitrógeno, pero tomados directamente a la salida de un biodigestor y de un sistema productivo donde la carga de cloro sea menor, pues este afecta tanto el crecimiento como la producción de hidrógeno.

Evaluar la capacidad de la microalga de producir hidrógeno en heterotrofia con el mismo medio de melaza con minerales, para evaluar a mayor profundidad el impacto de la opacidad de la melaza sobre la fotosíntesis del cultivo.

Evaluar la biomasa resultante de los procesos de crecimiento microalgal y de producción de biogás como biofertilizante o biomasa para otro tipo de tecnología bioenergética.

Replicar los experimentos de producción de hidrógeno, pero con temperatura y pH controlados, para promover el crecimiento y evitar que el amonio de los purines se convierta rápidamente en amoniaco respectivamente, buscando un mayor rendimiento de producción de biogás.

Evaluar sistemas de escalamiento de la tecnología hacia el nivel industrial y evaluar la rentabilidad técnica y financiera. Todo esto considerando los usos en los que ya se utiliza la melaza de caña y los purines porcinos.

Realizar un balance energético entre la energía requerida en agitación, iluminación y control de otras variables para el crecimiento y producción de hidrógeno y la energía liberada en forma de biohidrógeno, tanto a escala de laboratorio como a una eventual escala industrial.

Realizar un análisis de ácidos volátiles y otros compuestos químicos a la melaza antes de los experimentos para descartar o identificar posibles interferencias con los resultados de metabolitos resultantes luego de las pruebas.

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Presidencia de la Republica de Costa Rica, “Costa Rica supera 98% de generación eléctrica renovable por cuarto año consecutivo”, 2018.
- [2] J. Herrera, “Humano Sostenible Informe final ‘Situación energética de Costa Rica, 2015.
- [3] B. Roca Villanueva, M. Beltrán Salvador, y R. Gómez Huelgas, “Change climate and health”, *Rev Clin Esp*, vol. 219, núm. 5, pp. 260–265, 2019, doi: 10.1016/j.rce.2019.01.004.
- [4] A. Kibria, S. B. Akhundjanov, y R. Oladi, “Fossil fuel share in the energy mix and economic growth”, *International Review of Economics and Finance*, vol. 59, núm. July 2018, pp. 253–264, 2019, doi: 10.1016/j.iref.2018.09.002.
- [5] J. Ochoa Robles, S. De-León Almaraz, y C. Azzaro-Pantel, *Hydrogen as a Pillar of the Energy Transition*. 2018. doi: 10.1016/b978-0-12-811197-0.00001-4.
- [6] S. Artavia y N. Cambronero, “Franklin Chang: El nicho importante del hidrógeno es el transporte masivo”, *La Nación*, San Jose, Costa Rica, 2018.
- [7] P. E. V. de Miranda, *Hydrogen Energy: Sustainable and Perennial*. 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-814251-6.00001-0.
- [8] A. Pastowski y T. Grube, “Scope and perspectives of industrial hydrogen production and infrastructure for fuel cell vehicles in North Rhine-Westphalia”, *Energy Policy*, vol. 38, núm. 10, pp. 5382–5387, 2010, doi: 10.1016/j.enpol.2009.11.058.
- [9] O. Konur, “The scientometric analysis of the research on the algal bioenergy and biofuels”, en *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine*, Elsevier, 2020, pp. 319–341. doi: 10.1016/B978-0-12-818305-2.00020-6.
- [10] S. Fouchard *et al.*, “Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, núm. 10, pp. 6199–6205, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.10.6199.
- [11] E. Eroglu y A. Melis, “Microalgal hydrogen production research”, *Int J Hydrogen Energy*, vol. 41, núm. 30, pp. 12772–12798, 2016, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.05.115.

- [12] F. Javed *et al.*, “Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: A pathway towards sustainable biorefinery”, *Fuel*, vol. 255, núm. June, p. 115826, 2019, doi: 10.1016/j.fuel.2019.115826.
- [13] G. Torzillo y M. Seibert, “Comprehensive series in photochemistry and photobiology”, 2018, pp. P001–P006. doi: 10.1039/9781849737128-FP001.
- [14] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, R. Ruan, y B. Hu, “Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials”, *Biomass Bioenergy*, vol. 35, núm. 5, pp. 2245–2253, 2011, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.036.
- [15] A. Yousuf, *Fundamentals of Microalgae Cultivation*. Elsevier Inc., 2020. doi: 10.1016/b978-0-12-817536-1.00001-1.
- [16] Q.-Q. Zhang, C. Xing, Y.-Y. Cai, X.-T. Yan, y G.-G. Ying, “How much do human and livestock actually contribute to steroids emission and surface water pollution from past to the future: A global research”, *Science of The Total Environment*, vol. 772, p. 145558, jun. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145558.
- [17] Y. Li *et al.*, “Multi-pollutant assessment of river pollution from livestock production worldwide”, *Water Res*, vol. 209, p. 117906, feb. 2022, doi: 10.1016/j.watres.2021.117906.
- [18] Banco Central de Costa Rica, “Cuenta de Agua”, 2019.
- [19] N. Udikovic-Kolic, F. Wichmann, N. A. Broderick, y J. Handelsman, “Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, núm. 42, pp. 15202–15207, oct. 2014, doi: 10.1073/pnas.1409836111.
- [20] G. Rasschaert *et al.*, “Antibiotic Residues and Antibiotic-Resistant Bacteria in Pig Slurry Used to Fertilize Agricultural Fields”, *Antibiotics*, vol. 9, núm. 1, p. 34, ene. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9010034.
- [21] O. Coto, “‘‘Uso de los Residuos Agrícolas Orgánicos como Fuente de Energía: Aprovechamiento de Recursos y Reducción de Gases de Efecto Invernadero en Costa Rica’’”, p. 62, 2013.
- [22] O. Coto, “Usos Actuales de Tratamiento y Disposición de los Residuos Agrícolas Orgánicos en Costa Rica”, p. 69, 2013.

- [23] A. Prokop, R. K. Bajpai, y M. E. Zappi, *Algal biorefineries: Volume 2: Products and refinery design*, núm. January 2016. 2015. doi: 10.1007/978-3-319-20200-6.
- [24] X. Miao y Q. Wu, “Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil”, *Bioresour Technol*, vol. 97, núm. 6, pp. 841–846, 2006, doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.008.
- [25] E. Sforza, R. Cipriani, T. Morosinotto, A. Bertucco, y G. M. Giacometti, “Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*”, *Bioresour Technol*, vol. 104, pp. 523–529, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.025.
- [26] A. D. S. Vidotti, D. M. Riaño-Pachón, L. Mattiello, L. A. Giraldi, F. V. Winck, y T. T. Franco, “Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches”, *Algal Res*, vol. 51, p. 102060, oct. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.102060.
- [27] J. M. Girard *et al.*, “Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production”, *Algal Res*, vol. 5, núm. 1, pp. 241–248, 2014, doi: 10.1016/j.algal.2014.03.002.
- [28] H. Liu *et al.*, “Optimization of hydrogen production performance of *Chlorella vulgaris* under different hydrolase and inoculation amount”, *J Clean Prod*, vol. 310, p. 127293, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127293.
- [29] “La energía solar en fotosíntesis”, *Solar Energy*, vol. 11, núm. 3–4, p. 190, jul. 1967, doi: 10.1016/0038-092X(67)90042-4.
- [30] S. Ma *et al.*, “Revealing the synergistic effects of cells, pigments, and light spectra on light transfer during microalgae growth: A comprehensive light attenuation model”, *Bioresour Technol*, vol. 348, p. 126777, mar. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.126777.
- [31] H. Begum, F. MD. Yusoff, S. Banerjee, H. Khatoon, y M. Shariff, “Availability and Utilization of Pigments from Microalgae”, *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 56, núm. 13, pp. 2209–2222, oct. 2016, doi: 10.1080/10408398.2013.764841.
- [32] S. H. Oh *et al.*, “Long-term outdoor cultivation by perfusing spent medium for biodiesel production from *Chlorella minutissima*”, *J Biosci Bioeng*, vol. 110, núm. 2, pp. 194–200, ago. 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.02.009.

- [33] G. Dragone, “Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 160, p. 112284, may 2022, doi: 10.1016/j.rser.2022.112284.
- [34] Y.-H. Chen y T. H. Walker, “Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids”, *Bioresour Technol*, vol. 114, pp. 512–517, jun. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.026.
- [35] A. K. Patel, Y. Y. Choi, y S. J. Sim, “Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels”, *Bioresour Technol*, vol. 300, núm. January, p. 122741, 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122741.
- [36] A. K. Patel, J. M. Joun, M. E. Hong, y S. J. Sim, “Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae”, *Bioresour Technol*, vol. 282, núm. January, pp. 245–253, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.024.
- [37] A. Juneja, R. M. Ceballos, y G. S. Murthy, “Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review”, *Energies (Basel)*, vol. 6, núm. 9, pp. 4607–4638, 2013, doi: 10.3390/en6094607.
- [38] J. Zhan, J. Rong, y Q. Wang, “Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect”, *Int J Hydrogen Energy*, vol. 42, núm. 12, pp. 8505–8517, 2017, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.12.021.
- [39] K. L. Yeh, C. Y. Chen, y J. S. Chang, “PH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source”, *Biochem Eng J*, vol. 64, pp. 1–7, 2012, doi: 10.1016/j.bej.2012.02.006.
- [40] K. J. Wild, H. Steingaß, y M. Rodehutschord, “Variability in nutrient composition and in vitro crude protein digestibility of 16 microalgae products”, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, vol. 102, núm. 5, pp. 1306–1319, oct. 2018, doi: 10.1111/jpn.12953.
- [41] K. I. Reitan, J. R. Rainuzzo, y Y. Olsen, “Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae”, *J Phycol*, vol. 30, núm. 6, pp. 972–979, dic. 1994, doi: 10.1111/j.0022-3646.1994.00972. x.

- [42] E. W. Becker, “Micro-algae as a source of protein”, *Biotechnol Adv*, vol. 25, núm. 2, pp. 207–210, mar. 2007, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- [43] Y. Wang, Z. Liu, y S. Qin, “Effects of iron on fatty acid and astaxanthin accumulation in mixotrophic *Chromochloris zofingiensis*”, *Biotechnol Lett*, vol. 35, núm. 3, pp. 351–357, 2013, doi: 10.1007/s10529-012-1096-z.
- [44] B. Gao, J. Liu, C. Zhang, y D. B. Van de Waal, “Biological stoichiometry of oleaginous microalgal lipid synthesis: The role of N:P supply ratios and growth rate on microalgal elemental and biochemical composition”, *Algal Res*, vol. 32, pp. 353–361, jun. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.04.019.
- [45] G. Procházková, I. Brányiková, V. Zachleder, y T. Brányik, “Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae”, *J Appl Phycol*, vol. 26, núm. 3, pp. 1359–1377, jun. 2014, doi: 10.1007/s10811-013-0154-9.
- [46] M. A. Chia, A. T. Lombardi, y M. da G. Gama Melão, “Calorific values of *Chlorella vulgaris* (Trebouxioophyceae) as a function of different phosphorus concentrations”, *Phycological Res*, vol. 61, núm. 4, pp. 286–291, oct. 2013, doi: 10.1111/pre.12026.
- [47] J. D. Tibochoa-Bonilla, M. Kumar, A. Richelle, R. D. Godoy-Silva, K. Zengler, y C. Zuñiga, “Dynamic resource allocation drives growth under nitrogen starvation in eukaryotes”, *NPJ Syst Biol Appl*, vol. 6, núm. 1, p. 14, dic. 2020, doi: 10.1038/s41540-020-0135-y.
- [48] A. Bahadar y M. Bilal Khan, “Progress in energy from microalgae: A review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 27, pp. 128–148, nov. 2013, doi: 10.1016/j.rser.2013.06.029.
- [49] M. L. Ghirardi *et al.*, “Microalgae: A green source of renewable H₂”, *Trends Biotechnol*, vol. 18, núm. 12, pp. 506–511, 2000, doi: 10.1016/S0167-7799(00)01511-0.
- [50] D. Nagarajan, D. J. Lee, A. Kondo, y J. S. Chang, “Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation”, *Bioresour Technol*, vol. 227, núm. 1, pp. 373–387, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.104.
- [51] J. M. Fernández-Sevilla, F. G. A. Fernández, y E. M. Grima, “CHAPTER 16. Development of Photobioreactors for H₂ Production from Algae”, 2018, pp. 385–418. doi: 10.1039/9781849737128-00385.

- [52] S. N. Kosourov, K. A. Batyrova, E. P. Petushkova, A. A. Tsygankov, M. L. Ghirardi, y M. Seibert, “Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H₂ partial pressure”, *Int J Hydrogen Energy*, vol. 37, núm. 10, pp. 8850–8858, 2012, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.082.
- [53] R. Katakowala, A. Naresh Kumar, D. Chakraborty, y S. V. Mohan, *Valorization of sugarcane waste: Prospects of a biorefinery*. Elsevier Inc., 2019. doi: 10.1016/b978-0-12-815907-1.00003-9.
- [54] A. Palmonari *et al.*, “Short communication: Characterization of molasses chemical composition”, *J Dairy Sci*, vol. 103, núm. 7, pp. 6244–6249, jul. 2020, doi: 10.3168/jds.2019-17644.
- [55] D. Teclu, G. Tivchev, M. Laing, y M. Wallis, “Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria”, *J Hazard Mater*, vol. 161, núm. 2–3, pp. 1157–1165, 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.04.120.
- [56] J. Li, L. Liang, J. Cheng, Y. Huang, M. Zhu, y S. Liang, “Extraction of pigment from sugarcane juice alcohol wastewater and evaluation of its antioxidant and free radical scavenging activities”, *Food Sci Biotechnol*, vol. 21, núm. 5, pp. 1489–1496, oct. 2012, doi: 10.1007/s10068-012-0197-8.
- [57] X. Qiang *et al.*, “A novel process for molasses utilization by membrane filtration and resin adsorption”, *J Clean Prod*, vol. 207, pp. 432–443, ene. 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.10.005.
- [58] J. Lee, S. Roux, E. Le Roux, S. Keller, B. Rega, y C. Bonazzi, “Unravelling caramelization and Maillard reactions in glucose and glucose + leucine model cakes: Formation and degradation kinetics of precursors, α -dicarbonyl intermediates and furanic compounds during baking”, *Food Chem*, vol. 376, p. 131917, may 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131917.
- [59] G. L. Zabet, M. V. Tres, P. A. A. Ferreira, A. Dal Molin, y M. A. Mazutti, “Power the future with bioenergy from organic wastes”, en *Recent Developments in Bioenergy Research*, Elsevier, 2020, pp. 85–114. doi: 10.1016/B978-0-12-819597-0.00004-0.
- [60] L. Blanco Redondo, “Análisis y caracterización de purines para la obtención de estruvita y de biogás”, Universitat Politècnica de València, 2015.

- [61] J. A. Raven, B. Wollenweber, y L. L. Handley, “A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs”, *New Phytologist*, vol. 121, núm. 1, pp. 19–32, may 1992, doi: 10.1111/j.1469-8137.1992.tb01088.x.
- [62] R. J. Livingston, A. K. Prasad, X. Niu, y S. E. McGlynn, “Effects of ammonia in pulp mill effluents on estuarine phytoplankton assemblages: field descriptive and experimental results”, *Aquat Bot*, vol. 74, núm. 4, pp. 343–367, dic. 2002, doi: 10.1016/S0304-3770(02)00150-X.
- [63] A. Paskuliakova, S. Tonry, y N. Touzet, “Phycoremediation of landfill leachate with chlorophytes: Phosphate a limiting factor on ammonia nitrogen removal.”, *Water Res*, vol. 99, pp. 180–187, ago. 2016, doi: 10.1016/j.watres.2016.04.029.
- [64] A. T. Nair, J. Senthilnathan, y S. M. S. Nagendra, “Application of the phycoremediation process for tertiary treatment of landfill leachate and carbon dioxide mitigation”, *Journal of Water Process Engineering*, vol. 28, pp. 322–330, abr. 2019, doi: 10.1016/j.jwpe.2019.02.017.
- [65] Y. Collos y P. J. Harrison, “Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae”, *Mar Pollut Bull*, vol. 80, núm. 1–2, pp. 8–23, mar. 2014, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.006.
- [66] R. Jiang, L. Qin, S. Feng, D. Huang, Z. Wang, y S. Zhu, “The joint effect of ammonium and pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and ammonium removal in artificial liquid digestate”, *Bioresour Technol*, vol. 325, p. 124690, abr. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.124690.
- [67] S. Zargar y T. K. Ghosh, “Thermal and Biocidal (Chlorine) Effects on Select Freshwater Plankton”, *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 53, núm. 2, pp. 191–197, ago. 2007, doi: 10.1007/s00244-006-0108-1.
- [68] D. M. Sullivan y D. E. Carpenter, *Methods of analysis for nutrition labeling*. AOAC International, 1993.
- [69] N. Gokturk Baydar, *Organic acid, tocopherol and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars.*, 2a ed., vol. 42. Chemistry of Natural Compounds, 2006.
- [70] “Official Method 983.13. Alcohol in Wines. Gas Chromatographic Method.” AOAC International.
- [71] H. Chapman, *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*. México, 1973.

- [72] D. L. Sparks, *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. 1996.
- [73] W. Horwitz, “Plants”, en *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17a ed., vol. 1, AOAC International, 2003.
- [74] Norma ISO-14911:2019 Método para la determinación de cationes alcalinos y alcalinotérreos; y amonios disueltos en agua y aguas residuales por cromatografía iónica”, vol. b, ASTM International, 2017.
- [75] “ASTM D-4327-17: Standard Test Method for Anions in Water by Suppressed Ion Chromatography”, en *Book of Standards*, vol. 11.01, ASTM International (ASTM), p. 13.
- [76] HACH Company, *Manual de análisis de agua*. Consultado: oct. 24, 2022. [En línea]. Disponible: <https://www.hach.com/>
- [77] C. Zuñiga *et al.*, “Genome-Scale Metabolic Model for the Green Alga *Chlorella vulgaris* UTEX 395 Accurately Predicts Phenotypes under Autotrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Growth Conditions”, *Plant Physiol*, vol. 172, núm. 1, pp. 589–602, sep. 2016, doi: 10.1104/pp.16.00593.
- [78] S. N. A. Azaman, N. Nagao, F. M. Yusoff, S. W. Tan, y S. K. Yeap, “A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions”, *PeerJ*, vol. 5, p. e3473, sep. 2017, doi: 10.7717/peerj.3473.
- [79] A. D. S. Vidotti, D. M. Riaño-Pachón, L. Mattiello, L. A. Giraldi, F. V. Winck, y T. T. Franco, “Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches”, *Algal Res*, vol. 51, p. 102060, oct. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.102060.
- [80] T. Xiang *et al.*, “Glucose-Induced Trophic Shift in an Endosymbiont Dinoflagellate with Physiological and Molecular Consequences”, *Plant Physiol*, vol. 176, núm. 2, pp. 1793–1807, feb. 2018, doi: 10.1104/pp.17.01572.
- [81] M. S. Roth *et al.*, “Regulation of Oxygenic Photosynthesis during Trophic Transitions in the Green Alga *Chromochloris zofingiensis*”, *Plant Cell*, vol. 31, núm. 3, pp. 579–601, mar. 2019, doi: 10.1105/tpc.18.00742.

- [82] A. K. Patel, R. R. Singhanian, S. J. Sim, y C. Di Dong, “Recent advancements in mixotrophic bioprocessing for production of high value microalgal products”, *Bioresour Technol*, vol. 320, p. 124421, ene. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2020.124421.
- [83] L. Brennan y P. Owende, “Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, núm. 2, pp. 557–577, feb. 2010, doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009.
- [84] A. K. Patel, J. M. Joun, M. E. Hong, y S. J. Sim, “Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae”, *Bioresour Technol*, vol. 282, pp. 245–253, jun. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.024.
- [85] G. Subramanian, G. Yadav, y R. Sen, “Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: a techno-economic perspective”, *RSC Adv*, vol. 6, núm. 77, pp. 72897–72904, 2016, doi: 10.1039/C6RA14611B.
- [86] Q. Yu, H. Wang, X. Li, Y. Yin, S. Qin, y B. Ge, “Enhanced biomass and CO₂ sequestration of *Chlorella vulgaris* using a new mixotrophic cultivation method”, *Process Biochemistry*, vol. 90, pp. 168–176, mar. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2019.11.022.
- [87] T. Li, Y. Zheng, L. Yu, y S. Chen, “Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production”, *Biomass Bioenergy*, vol. 66, pp. 204–213, jul. 2014, doi: 10.1016/j.biombioe.2014.04.010.
- [88] K. H. Ryu, B. Kim, y J. H. Lee, “A model-based optimization of microalgal cultivation strategies for lipid production under photoautotrophic condition”, *Comput Chem Eng*, vol. 121, pp. 57–66, feb. 2019, doi: 10.1016/j.compchemeng.2018.10.004.
- [89] O. Perez-Garcia y Y. Bashan, “Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics”, en *Algal Biorefineries*, Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 61–131. doi: 10.1007/978-3-319-20200-6_3.
- [90] E. Touloupakis, C. Faraloni, A. M. Silva Benavides, J. Masojídek, y G. Torzillo, “Sustained photobiological hydrogen production by *Chlorella vulgaris* without nutrient starvation”, *Int J Hydrogen Energy*, vol. 46, núm. 5, pp. 3684–3694, ene. 2021, doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.10.257.

- [91] G. Dragone, “Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 160, p. 112284, may 2022, doi: 10.1016/j.rser.2022.112284.
- [92] J. Al-Mallahi y K. Ishii, “Attempts to alleviate inhibitory factors of anaerobic digestate for enhanced microalgae cultivation and nutrients removal: A review”, *J Environ Manage*, vol. 304, p. 114266, feb. 2022, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114266.
- [93] X. Liu y Y. Hong, “Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: a Brief Review”, *Curr Pollut Rep*, vol. 7, núm. 2, pp. 227–245, jun. 2021, doi: 10.1007/s40726-021-00184-6.
- [94] T.-S. Lin y J.-Y. Wu, “Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition”, *Bioresour Technol*, vol. 184, pp. 100–107, may 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.005.
- [95] G. Dragone, “Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 160, p. 112284, may 2022, doi: 10.1016/j.rser.2022.112284.
- [96] G. H. Gim *et al.*, “Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions”, *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 37, núm. 2, pp. 99–106, feb. 2014, doi: 10.1007/s00449-013-0920-8.
- [97] N. Sun, Y. Wang, Y.-T. Li, J.-C. Huang, y F. Chen, “Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)”, *Process Biochemistry*, vol. 43, núm. 11, pp. 1288–1292, nov. 2008, doi: 10.1016/j.procbio.2008.07.014.
- [98] J. Wang *et al.*, “Domesticating *Chlorella vulgaris* with gradually increased the concentration of digested piggery wastewater to bio-remove ammonia nitrogen”, *Algal Res*, vol. 60, p. 102526, dic. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102526.
- [99] Y. Shen, S. Qiu, Z. Chen, Y. Zhang, J. Trent, y S. Ge, “Free ammonia is the primary stress factor rather than total ammonium to *Chlorella sorokiniana* in simulated sludge fermentation liquor”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 397, p. 125490, oct. 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.125490.

- [100] G. Y. Yew *et al.*, “A novel lipids recovery strategy for biofuels generation on microalgae *Chlorella* cultivation with waste molasses”, *Journal of Water Process Engineering*, vol. 38, p. 101665, dic. 2020, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101665.
- [101] R. Sirohi *et al.*, “Design and applications of photobioreactors- a review”, *Bioresour Technol*, vol. 349, p. 126858, abr. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.126858.
- [102] M. A. Javed, A. M. Zafar, y A. Aly Hassan, “Regulate oxygen concentration using a co-culture of activated sludge bacteria and *Chlorella vulgaris* to maximize biophotolytic hydrogen production”, *Algal Res*, vol. 63, p. 102649, abr. 2022, doi: 10.1016/j.algal.2022.102649.
- [103] N. Rashid, K. Lee, y Q. Mahmood, “Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods”, *Bioresour Technol*, vol. 102, núm. 2, pp. 2101–2104, ene. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.032.
- [104] L. Yang, H. Li, y Q. Wang, “A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater”, *Bioresour Technol*, vol. 275, pp. 35–43, mar. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.036.
- [105] M. A. Javed, A. M. Zafar, y A. Aly Hassan, “Regulate oxygen concentration using a co-culture of activated sludge bacteria and *Chlorella vulgaris* to maximize biophotolytic hydrogen production”, *Algal Res*, vol. 63, p. 102649, abr. 2022, doi: 10.1016/j.algal.2022.102649.

9 APENDICE

9.1 Desarrollo de la ecuación 6 y 7 para determinar cantidad de melaza y amonio a utilizar en los medios alternativos de melaza con purines (MP) y glucosa con purines (GP).

Se consideran los siguientes valores de concentración para la fructosa, glucosa y sacarosa que serían 8.8 g, 5.07 g y 28.8 g por cada 100 g de melaza respectivamente, valores obtenidos de los análisis de azúcares del CIA. Sustituyendo en la ecuación 6 se obtiene que se requieren 23.4 g de melaza por litro de medio preparar para tener los 10 g de glucosa equivalente que tiene el medio tradicional, como se muestra a continuación:

$$m_m = \frac{10 \frac{g_{glucosa}}{l}}{\left(0.228 \frac{g_{sacarosa}}{g_{melaza}}\right) + \left(0.0507 \frac{g_{glucosa}}{g_{melaza}}\right) + \left(0.088 \frac{g_{fructosa}}{g_{melaza}}\right)} = 23.4 \frac{g_{melaza}}{l}$$

A continuación, se muestra los resultados de aniones realizado en el laboratorio de EIB para conocer el valor de amonio presente en los purines porcinos:

Esta muestra se diluyó en un factor de 20 para que los compuestos medidos estuvieran dentro del rango de la curva de calibración, por lo que el resultado de 184.634 ppm representa los 3692.7 mg/L de amonio en los purines. Como se consideró utilizar el límite tóxico de 400 mg/L de amonio, eso se logra diluyendo 108 ml de purines por litro de medio, como se muestra:

$$108 \frac{ml_{purines}}{l_{agua}} = \frac{1000 * 400 \frac{mg_{amonio}}{l}}{3692.68 \frac{mg_{amonio}}{l}}$$

Con esa cantidad de purines, la ecuación 7 queda de la siguiente manera, donde se puede ver que se satisface 1.1 veces la cantidad de nitrógeno con 108 ml de purines por litro de agua que ofrecen los 2000 mg de nitrato por litro de agua que ofrece el medio tradicional:

$$1.1 = \frac{108 \frac{ml_{purines}}{l_{agua}} * \left(\frac{14 \frac{g}{mol}}{18.04 \frac{g}{mol}} * 108 \frac{ml_{purines}}{l} \right)}{1000 \frac{ml}{l}}$$

$$\frac{14 \frac{g}{mol}}{101.10 \frac{g}{mol}} * 2000 \frac{mg_{nitrato}}{l}$$

9.2 Resultados del ANOVA con InfoStat. Clorofila para crecimiento con medios tradicionales.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila total (mg/l)	54	0.99	0.99	7.81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	55615.07	17	3271.47	245.86	<0.0001
RutaMetabolica	506.13	2	253.06	19.02	<0.0001
Tiempo (h)	41288.32	5	8257.66	620.59	<0.0001
RutaMetabolica*Tiempo (h)	13820.62	10	1382.06	103.87	<0.0001
Error	479.02	36	13.31		
Total	56094.09	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.97207

Error: 13.3061 gl: 36

RutaMetabolica	Medias	n	E.E.	
Heterotrofia	43.09	18	0.86	A
Autotrofia	46.46	18	0.86	B
Mixotrofia	50.58	18	0.86	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.17346

Error: 13.3061 gl: 36

Tiempo (h)	Medias	n	E.E.	
0	5.70	9	1.22	A
24	19.19	9	1.22	B
48	40.21	9	1.22	C
72	59.48	9	1.22	D
96	76.76	9	1.22	E
120	78.95	9	1.22	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=11.16998

Error: 13.3061 gl: 36

RutaMetabolica	Tiempo (h)	Medias	n	E.E.	
Autotrofia	0	1.10	3	2.11	A
Mixotrofia	0	2.13	3	2.11	A
Mixotrofia	24	5.99	3	2.11	A B
Autotrofia	24	11.63	3	2.11	A B C
Heterotrofia	0	13.86	3	2.11	B C
Mixotrofia	48	22.03	3	2.11	C
Heterotrofia	24	39.95	3	2.11	D
Autotrofia	48	48.37	3	2.11	D E
Heterotrofia	48	50.22	3	2.11	D E
Heterotrofia	120	51.51	3	2.11	E
Heterotrofia	96	51.51	3	2.11	E
Heterotrofia	72	51.51	3	2.11	E
Mixotrofia	72	56.32	3	2.11	E
Autotrofia	72	70.60	3	2.11	F
Autotrofia	96	73.55	3	2.11	F
Autotrofia	120	73.55	3	2.11	F
Mixotrofia	96	105.22	3	2.11	G
Mixotrofia	120	111.80	3	2.11	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.3 Resultados del ANOVA con InfoStat. Peso seco para crecimiento con medios tradicionales

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa base seca (g/l)	54	0.99	0.99	7.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	217.85	17	12.81	368.25	<0.0001
RutaMetabolica	94.76	2	47.38	1361.54	<0.0001
Tiempo (h)	83.65	5	16.73	480.78	<0.0001
RutaMetabolica*Tiempo (h)	39.44	10	3.94	113.33	<0.0001
Error	1.25	36	0.03		
Total	219.10	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.15199

Error: 0.0348 gl: 36

RutaMetabolica	Medias	n	E.E.	
Autotrofia	0.76	18	0.04	A
Heterotrofia	3.47	18	0.04	B
Mixotrofia	3.66	18	0.04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.26457

Error: 0.0348 gl: 36

Tiempo (h)	Medias	n	E.E.	
0	0.47	9	0.06	A
24	1.41	9	0.06	B
48	2.97	9	0.06	C
96	3.58	9	0.06	D
120	3.62	9	0.06	D
72	3.69	9	0.06	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.57122

Error: 0.0348 gl: 36

RutaMetabolica	Tiempo (h)	Medias	n	E.E.		
Autotrofia	0	0.14	3	0.11	A	
Mixotrofia	0	0.16	3	0.11	A	
Autotrofia	24	0.41	3	0.11	A	B
Mixotrofia	24	0.77	3	0.11		B C
Autotrofia	48	0.88	3	0.11		B C
Autotrofia	72	1.01	3	0.11		C
Autotrofia	96	1.05	3	0.11		C
Autotrofia	120	1.05	3	0.11		C
Heterotrofia	0	1.12	3	0.11		C
Heterotrofia	24	3.05	3	0.11		D
Heterotrofia	48	3.95	3	0.11		E
Mixotrofia	48	4.10	3	0.11		E
Heterotrofia	72	4.23	3	0.11		E
Heterotrofia	96	4.23	3	0.11		E
Heterotrofia	120	4.23	3	0.11		E
Mixotrofia	96	5.48	3	0.11		F
Mixotrofia	120	5.59	3	0.11		F
Mixotrofia	72	5.85	3	0.11		F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.4 Resultados del ANOVA con InfoStat. Concentración de clorofila respecto al peso seco para crecimiento con medios tradicionales

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de clorofila (%..	54	0.98	0.97	16.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	17	1.7E-03	99.64	<0.0001
RutaMetabolica	0.02	2	0.01	518.30	<0.0001
Tiempo (h)	3.9E-03	5	7.8E-04	47.06	<0.0001
RutaMetabolica*Tiempo (h)	0.01	10	7.0E-04	42.19	<0.0001
Error	6.0E-04	36	1.7E-05		
Total	0.03	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00332

Error: 0.0000 gl: 36

RutaMetabolica	Medias	n	E.E.	
Heterotrofia	0.01	18	9.6E-04	A
Mixotrofia	0.01	18	9.6E-04	A
Autotrofia	0.05	18	9.6E-04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00577

Error: 0.0000 gl: 36

Tiempo (h)	Medias	n	E.E.	
0	0.01	9	1.4E-03	A
24	0.02	9	1.4E-03	A
48	0.02	9	1.4E-03	B
72	0.03	9	1.4E-03	C
96	0.03	9	1.4E-03	C
120	0.03	9	1.4E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.01246
 Error: 0.0000 gl: 36

RutaMetabolica	Tiempo (h)	Medias	n	E.E.		
Mixotrofia	48	0.01	3	2.3E-03	A	
Mixotrofia	24	0.01	3	2.3E-03	A	B
Autotrofia	0	0.01	3	2.3E-03	A	B
Mixotrofia	72	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	96	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	120	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	72	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	0	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	48	0.01	3	2.3E-03	A	B
Heterotrofia	24	0.01	3	2.3E-03	A	B
Mixotrofia	0	0.02	3	2.3E-03	A	B
Mixotrofia	96	0.02	3	2.3E-03	B	C
Mixotrofia	120	0.02	3	2.3E-03	B	C
Autotrofia	24	0.03	3	2.3E-03		C
Autotrofia	48	0.06	3	2.3E-03		D
Autotrofia	96	0.07	3	2.3E-03		E
Autotrofia	120	0.07	3	2.3E-03		E
Autotrofia	72	0.07	3	2.3E-03		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.5 Resultados del ANOVA con InfoStat. Clorofila, peso seco y porcentaje de clorofila respecto al peso seco en último día de cada experimento para crecimiento con medio de fermento y medios sustitutos con melaza y purines, en mixotrofia y heterotrofia.

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Clorofila	24	1.00	1.00	5.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21294.33	7	3042.05	733.67	<0.0001
Experimento	21294.33	7	3042.05	733.67	<0.0001
Error	66.34	16	4.15		
Total	21360.67	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.75614

Error: 4.1463 gl: 16

Experimento	Medias	n	E.E.		
Het.Melaza.Purines	15.61	3	1.18	A	
Het.Glucosa.Purines	18.21	3	1.18	A	B
Mix.Melaza.Purines	21.46	3	1.18		B
Mix.Glucosa.Purines	22.62	3	1.18		B
Het.Melaza.Mineral	31.17	3	1.18		C
Mix.Melaza.Mineral	44.32	3	1.18		D
Het.Glucosa.Minerales	51.51	3	1.18		E
Mix.Glucosa.Minerales	111.80	3	1.18		F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa base seca	24	0.98	0.97	4.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19.75	7	2.82	108.09	<0.0001
Experimento	19.75	7	2.82	108.09	<0.0001
Error	0.42	16	0.03		
Total	20.17	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.45675

Error: 0.0261 gl: 16

Experimento	Medias	n	E.E.
Het.Melaza.Purines	2.50	3	0.09 A
Het.Glucosa.Purines	2.83	3	0.09 A B
Het.Melaza.Mineral	3.14	3	0.09 B C
Mix.Melaza.Purines	3.24	3	0.09 B C
Mix.Glucosa.Purines	3.46	3	0.09 C D
Mix.Melaza.Mineral	3.88	3	0.09 D E
Het.Glucosa.Minerales	4.23	3	0.09 E
Mix.Glucosa.Minerales	5.59	3	0.09 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de clorofila	24	0.98	0.97	7.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.7E-04	7	6.8E-05	110.70	<0.0001
Experimento	4.7E-04	7	6.8E-05	110.70	<0.0001
Error	9.8E-06	16	6.1E-07		
Total	4.8E-04	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00221

Error: 0.0000 gl: 16

Experimento	Medias	n	E.E.
Het.Melaza.Purines	0.01	3	4.5E-04 A
Het.Glucosa.Purines	0.01	3	4.5E-04 A
Mix.Glucosa.Purines	0.01	3	4.5E-04 A
Mix.Melaza.Purines	0.01	3	4.5E-04 A
Het.Melaza.Mineral	0.01	3	4.5E-04 B
Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	4.5E-04 B C
Het.Glucosa.Minerales	0.01	3	4.5E-04 C
Mix.Glucosa.Minerales	0.02	3	4.5E-04 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.6 Resultados del ANOVA con InfoStat. Clorofila, peso seco y porcentaje de clorofila respecto al peso seco durante todos los días de cada experimento para crecimiento con medios sustitutos con melaza y purines, en mixotrofia.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila	54	0.99	0.99	5.52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5875.34	17	345.61	222.57	<0.0001
Tiempo	2865.30	5	573.06	369.05	<0.0001
Experimento	1837.60	2	918.80	591.71	<0.0001
Tiempo*Experimento	1172.44	10	117.24	75.51	<0.0001
Error	55.90	36	1.55		
Total	5931.24	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.76730

Error: 1.5528 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	9.69	9	0.42	A
24	16.25	9	0.42	B
48	24.01	9	0.42	C
72	26.44	9	0.42	D
120	29.47	9	0.42	E
96	29.49	9	0.42	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.01528

Error: 1.5528 gl: 36

Experimento	Medias	n	E.E.	
Mix.Glucosa.Purines	18.18	18	0.29	A
Mix.Melaza.Purines	18.69	18	0.29	A
Mix.Melaza.Mineral	30.80	18	0.29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa base seca	54	0.98	0.97	5.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	39.19	17	2.31	89.82	<0.0001
Tiempo	35.95	5	7.19	280.16	<0.0001
Experimento	0.56	2	0.28	10.96	0.0002
Tiempo*Experimento	2.68	10	0.27	10.43	<0.0001
Error	0.92	36	0.03		
Total	40.12	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.22721

Error: 0.0257 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	1.17	9	0.05	A
24	2.51	9	0.05	B
48	2.75	9	0.05	C
72	3.28	9	0.05	D
96	3.50	9	0.05	D E
120	3.53	9	0.05	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.13053

Error: 0.0257 gl: 36

Experimento	Medias	n	E.E.	
Mix.Glucosa.Purines	2.67	18	0.04	A
Mix.Melaza.Purines	2.77	18	0.04	A
Mix.Melaza.Mineral	2.92	18	0.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.81576

Error: 1.5528 gl: 36

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.	
0	Mix.Glucosa.Purines	8.45	3	0.72	A
0	Mix.Melaza.Mineral	9.74	3	0.72	A
0	Mix.Melaza.Purines	10.88	3	0.72	A
24	Mix.Glucosa.Purines	14.97	3	0.72	B
24	Mix.Melaza.Mineral	15.24	3	0.72	B
48	Mix.Melaza.Purines	17.99	3	0.72	B C
48	Mix.Glucosa.Purines	18.19	3	0.72	B C
24	Mix.Melaza.Purines	18.54	3	0.72	B C D
96	Mix.Melaza.Purines	21.46	3	0.72	C D E
120	Mix.Melaza.Purines	21.46	3	0.72	C D E
72	Mix.Melaza.Purines	21.80	3	0.72	C D E
72	Mix.Glucosa.Purines	22.24	3	0.72	D E
96	Mix.Glucosa.Purines	22.62	3	0.72	E
120	Mix.Glucosa.Purines	22.62	3	0.72	E
72	Mix.Melaza.Mineral	35.28	3	0.72	F
48	Mix.Melaza.Mineral	35.84	3	0.72	F
120	Mix.Melaza.Mineral	44.32	3	0.72	G
96	Mix.Melaza.Mineral	44.38	3	0.72	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.49058

Error: 0.0257 gl: 36

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.	
0	Mix.Melaza.Mineral	0.83	3	0.09	A
0	Mix.Glucosa.Purines	1.17	3	0.09	A B
0	Mix.Melaza.Purines	1.51	3	0.09	B
24	Mix.Glucosa.Purines	2.20	3	0.09	C
48	Mix.Glucosa.Purines	2.35	3	0.09	C D
24	Mix.Melaza.Mineral	2.61	3	0.09	C D E
24	Mix.Melaza.Purines	2.73	3	0.09	D E F
48	Mix.Melaza.Purines	2.83	3	0.09	D E F G
48	Mix.Melaza.Mineral	3.08	3	0.09	E F G H
72	Mix.Melaza.Purines	3.10	3	0.09	F G H
96	Mix.Melaza.Purines	3.24	3	0.09	G H
120	Mix.Melaza.Purines	3.24	3	0.09	G H
72	Mix.Melaza.Mineral	3.34	3	0.09	H I
72	Mix.Glucosa.Purines	3.41	3	0.09	H I J
120	Mix.Glucosa.Purines	3.46	3	0.09	H I J
96	Mix.Glucosa.Purines	3.46	3	0.09	H I J
96	Mix.Melaza.Mineral	3.80	3	0.09	I J
120	Mix.Melaza.Mineral	3.88	3	0.09	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.7 Resultados del ANOVA con InfoStat. Clorofila y peso seco durante todos los días de cada experimento para crecimiento con medio de fermento y medios sustitutos con melaza y purines, en heterotrofia.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila	54	0.97	0.95	8.28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2325.15	17	136.77	64.93	<0.0001
Tiempo	1054.45	5	210.89	100.11	<0.0001
Experimento	627.97	2	313.98	149.05	<0.0001
Tiempo*Experimento	642.73	10	64.27	30.51	<0.0001
Error	75.84	36	2.11		
Total	2400.98	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.05847

Error: 2.1066 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	9.57	9	0.48	A
24	14.28	9	0.48	B
48	17.43	9	0.48	C
72	20.54	9	0.48	D
120	21.66	9	0.48	D
96	21.66	9	0.48	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.18256

Error: 2.1066 gl: 36

Experimento	Medias	n	E.E.	
Het.Melaza.Purines	14.99	18	0.34	A
Het.Glucosa.Purines	15.24	18	0.34	A
Het.Melaza.Mineral	22.34	18	0.34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.44443

Error: 2.1066 gl: 36

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.				
0	Het.Glucosa.Purines	8.45	3	0.84	A			
0	Het.Melaza.Purines	10.03	3	0.84	A	B		
0	Het.Melaza.Mineral	10.22	3	0.84	A	B		
24	Het.Melaza.Mineral	12.66	3	0.84	A	B	C	
24	Het.Glucosa.Purines	13.70	3	0.84		B	C	
96	Het.Melaza.Purines	15.61	3	0.84			C	D
72	Het.Melaza.Purines	15.61	3	0.84			C	D
120	Het.Melaza.Purines	15.61	3	0.84			C	D
72	Het.Glucosa.Purines	16.06	3	0.84			C	D
24	Het.Melaza.Purines	16.47	3	0.84			C	D
48	Het.Melaza.Purines	16.61	3	0.84			C	D
48	Het.Glucosa.Purines	16.79	3	0.84			C	D
120	Het.Glucosa.Purines	18.21	3	0.84				D
96	Het.Glucosa.Purines	18.21	3	0.84				D
48	Het.Melaza.Mineral	18.90	3	0.84				D
72	Het.Melaza.Mineral	29.95	3	0.84				E
96	Het.Melaza.Mineral	31.17	3	0.84				E
120	Het.Melaza.Mineral	31.17	3	0.84				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa base seca	54	0.93	0.90	10.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	27.32	17	1.61	28.38	<0.0001
Tiempo	25.16	5	5.03	88.87	<0.0001
Experimento	0.24	2	0.12	2.09	0.1382
Tiempo*Experimento	1.92	10	0.19	3.40	0.0033
Error	2.04	36	0.06		
Total	29.36	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.33750

Error: 0.0566 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	1.09	9	0.08	A
24	1.53	9	0.08	B
48	2.44	9	0.08	C
72	2.74	9	0.08	C D
120	2.82	9	0.08	D
96	2.82	9	0.08	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.19389

Error: 0.0566 gl: 36

Experimento	Medias	n	E.E.	
Het.Melaza.Purines	2.16	18	0.06	A
Het.Glucosa.Purines	2.25	18	0.06	A
Het.Melaza.Mineral	2.32	18	0.06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.72869

Error: 0.0566 gl: 36

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.	
0	Het.Glucosa.Purines	0.95	3	0.14	A
0	Het.Melaza.Mineral	0.98	3	0.14	A
0	Het.Melaza.Purines	1.35	3	0.14	A B
24	Het.Melaza.Mineral	1.37	3	0.14	A B
24	Het.Glucosa.Purines	1.49	3	0.14	A B
24	Het.Melaza.Purines	1.72	3	0.14	B C
48	Het.Melaza.Mineral	2.34	3	0.14	C D
48	Het.Melaza.Purines	2.36	3	0.14	C D
96	Het.Melaza.Purines	2.50	3	0.14	D E
120	Het.Melaza.Purines	2.50	3	0.14	D E
72	Het.Melaza.Purines	2.50	3	0.14	D E
48	Het.Glucosa.Purines	2.63	3	0.14	D E
72	Het.Glucosa.Purines	2.79	3	0.14	D E
120	Het.Glucosa.Purines	2.83	3	0.14	D E
96	Het.Glucosa.Purines	2.83	3	0.14	D E
72	Het.Melaza.Mineral	2.94	3	0.14	D E
120	Het.Melaza.Mineral	3.14	3	0.14	E
96	Het.Melaza.Mineral	3.14	3	0.14	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.8 Resultados del ANOVA con InfoStat. Clorofila y peso seco durante todos los días de cada experimento para crecimiento melaza y minerales en mixotrofia, pero con una o dos fuentes de luz.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila	36	0.98	0.97	9.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15033.87	11	1366.72	100.83	<0.0001
Tiempo	12195.10	5	2439.02	179.94	<0.0001
Experimento	1758.08	1	1758.08	129.71	<0.0001
Tiempo*Experimento	1080.68	5	216.14	15.95	<0.0001
Error	325.30	24	13.55		
Total	15359.17	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=6.57216

Error: 13.5543 gl: 24

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	9.70	6	1.50	A
24	15.93	6	1.50	A
48	40.81	6	1.50	B
72	49.65	6	1.50	C
96	54.78	6	1.50	C
120	55.88	6	1.50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.53283

Error: 13.5543 gl: 24

Experimento	Medias	n	E.E.	
Mix.Melaza.Mineral	30.80	18	0.87	A
Mix.Melaza.Mineral.2luz	44.78	18	0.87	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.53283

Error: 13.5543 gl: 24

Experimento	Medias	n	E.E.	
Mix.Melaza.Mineral	30.80	18	0.87	A
Mix.Melaza.Mineral.2luz	44.78	18	0.87	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=10.83862

Error: 13.5543 gl: 24

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.	
0	Mix.Melaza.Mineral.2luz	9.66	3	2.13	A
0	Mix.Melaza.Mineral	9.74	3	2.13	A
24	Mix.Melaza.Mineral	15.24	3	2.13	A
24	Mix.Melaza.Mineral.2luz	16.62	3	2.13	A
72	Mix.Melaza.Mineral	35.28	3	2.13	B
48	Mix.Melaza.Mineral	35.84	3	2.13	B
120	Mix.Melaza.Mineral	44.32	3	2.13	B
96	Mix.Melaza.Mineral	44.38	3	2.13	B
48	Mix.Melaza.Mineral.2luz	45.77	3	2.13	B
72	Mix.Melaza.Mineral.2luz	64.02	3	2.13	C
96	Mix.Melaza.Mineral.2luz	65.17	3	2.13	C
120	Mix.Melaza.Mineral.2luz	67.43	3	2.13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa base seca	36	0.97	0.96	8.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54.19	11	4.93	74.87	<0.0001
Tiempo	49.54	5	9.91	150.59	<0.0001
Experimento	0.13	1	0.13	1.94	0.1762
Tiempo*Experimento	4.52	5	0.90	13.73	<0.0001
Error	1.58	24	0.07		
Total	55.77	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.45790

Error: 0.0658 gl: 24

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	0.84	6	0.10	A
24	1.77	6	0.10	B
48	3.20	6	0.10	C
72	3.37	6	0.10	C
96	3.99	6	0.10	D
120	4.01	6	0.10	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17647

Error: 0.0658 gl: 24

Experimento	Medias	n	E.E.	
Mix.Melaza.Mineral.2luz	2.80	18	0.06	A
Mix.Melaza.Mineral	2.92	18	0.06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17647

Error: 0.0658 gl: 24

Experimento	Medias	n	E.E.
Mix.Melaza.Mineral.2luz	2.80	18	0.06 A
Mix.Melaza.Mineral	2.92	18	0.06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.75515

Error: 0.0658 gl: 24

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.					
0	Mix.Melaza.Mineral	0.83	3	0.15	A				
0	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.85	3	0.15	A				
24	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.93	3	0.15	A				
24	Mix.Melaza.Mineral	2.61	3	0.15	B				
48	Mix.Melaza.Mineral	3.08	3	0.15	B	C			
48	Mix.Melaza.Mineral.2luz	3.31	3	0.15	B	C	D		
72	Mix.Melaza.Mineral	3.34	3	0.15	B	C	D		
72	Mix.Melaza.Mineral.2luz	3.41	3	0.15		C	D	E	
96	Mix.Melaza.Mineral	3.80	3	0.15		C	D	E	F
120	Mix.Melaza.Mineral	3.88	3	0.15			D	E	F
120	Mix.Melaza.Mineral.2luz	4.13	3	0.15				E	F
96	Mix.Melaza.Mineral.2luz	4.19	3	0.15					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de clorofila	36	0.79	0.69	16.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.4E-04	11	4.0E-05	8.14	<0.0001
Tiempo	4.2E-05	5	8.3E-06	1.69	0.1750
Experimento	2.4E-04	1	2.4E-04	47.84	<0.0001
Tiempo*Experimento	1.6E-04	5	3.3E-05	6.64	0.0005
Error	1.2E-04	24	4.9E-06		
Total	5.6E-04	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00396

Error: 0.0000 gl: 24

Tiempo	Medias	n	E.E.
0	0.01	6	9.1E-04 A
24	0.01	6	9.1E-04 A
48	0.01	6	9.1E-04 A
96	0.01	6	9.1E-04 A
120	0.01	6	9.1E-04 A
72	0.01	6	9.1E-04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00153

Error: 0.0000 gl: 24

Experimento	Medias	n	E.E.
Mix.Melaza.Mineral	0.01	18	5.2E-04 A
Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.02	18	5.2E-04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00653

Error: 0.0000 gl: 24

Tiempo	Experimento	Medias	n	E.E.				
24	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A			
72	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A	B		
0	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.01	3	1.3E-03	A	B		
120	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A	B		
48	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A	B	C	
96	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A	B	C	
0	Mix.Melaza.Mineral	0.01	3	1.3E-03	A	B	C	
48	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.01	3	1.3E-03		B	C	D
96	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.02	3	1.3E-03		B	C	D
120	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.02	3	1.3E-03		B	C	D
24	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.02	3	1.3E-03			C	D
72	Mix.Melaza.Mineral.2luz	0.02	3	1.3E-03				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)