

EVALUACION DEL pH Y LA AGITACION DEL MEDIO MAS ADECUADA
PARA EL CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.



VANESSA DIAZ CORTES
CAMILO ORDOÑEZ OVALLE

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C.
28 DE NOVIEMBRE DE 2006

EVALUACION DEL pH Y LA AGITACION DEL MEDIO MAS ADECUADA
PARA EL CRECIMIENTO DE *Dunadiella salina* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.

VANESSA DIAZ CORTES
CAMILO ORDOÑEZ OVALLE

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C.
28 DE NOVIEMBRE DE 2006

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos aquí emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

EVALUACION DEL pH Y LA AGITACION DEL MEDIO MAS ADECUADA
PARA EL CRECIMIENTO DE *Dunadiella salina* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.

VANESSA DIAZ CORTES
CAMILO ORDOÑEZ OVALLE

APROBADO

Claudia Patricia Zambrano Parra, M.Sc.
Director

Jaime Bernal Castillo, Ph.D.
Coodirector

Janeth Arias Palacios, M.Sc.
Jurado

Crispin Astolfo Celis Zambrano, M.Sc.
Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2006

EVALUACION DEL pH Y LA AGITACION DEL MEDIO MAS ADECUADA
PARA EL CRECIMIENTO DE *Dunadiella salina* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.

VANESSA DIAZ CORTES
CAMILO ORDOÑEZ OVALLE

APROBADO

ANGELA UMAÑA MUÑOZ, M.Phil.
Decano Facultad de Ciencias

LUIS DAVID GOMEZ MENDEZ, M.Sc.
Director Carrera de Microbiología Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2006

“A mi mama y a mi hermano quienes siempre me han apoyado en el transcurso de mis estudios, con su amor, comprensión y también regaños. Por quienes lucho por ser mejor cada día, con todo mi corazón”

Gracias.
Vanessa.

“A mi mama, mi papa y mis hermanas por su apoyo incondicional en esta travesía de la universidad, dándome consejos para salir adelante y crecer profesionalmente, los amo”

Gracias.
Camilo.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo firme y constante por parte de la Doctora Claudia Zambrano, el Doctor Jaime Bernal Castillo.

A María Fernanda Contreras por su apoyo incondicional, al profesor Crispin Celis por su gran colaboración en el laboratorio, y todo el Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana por que sin el habría sido muy difícil llevar a cabo este trabajo.

28 de noviembre del 2006.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. Clasificación taxonómica.....	16
2.2. Morfología.....	16
2.3. Ciclo de vida y reproducción.....	18
2.4. Habitas naturales.....	19
2.5. Composición celular.....	19
2.5.1. Carbohidratos.....	19
2.5.2. Proteínas.....	19
2.5.3. Pigmentos.....	20
2.5.3.1. Clorofilas.....	20
2.5.3.2. Carotenóides.....	21
2.5.3.3. Glicerol.....	22
2.6. Condiciones de crecimiento.....	23
2.6.1. pH.....	25
2.6.2. Temperatura.....	25
2.6.3. Intensidad lumínica.....	25
2.6.4. Agitación.....	25
2.7. Aplicaciones.....	26
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Microorganismo.....	30
3.2. Condiciones del inóculo.....	30
3.3. Condiciones de experimentación.....	30
3.3.1. Agitación.....	31
3.3.2. Experimentación con el pH.....	31
3.4. Determinación de biomasa.....	33
3.4.1. Curva Patrón de Peso Seco.....	33
3.4.2. Recuento en cámara.....	33

3.5. Experimentación con velocidad de agitación y valor del pH simultáneamente.....	34
3.6. Análisis de datos.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
4.1. Agitación y valor del pH.....	36
4.1.1. Comportamiento del crecimiento en relación a la agitación.....	36
4.1.2. Comportamiento del crecimiento en relación al pH.....	40
4.2. Relación de la agitación de 75 rpm y pH de 8.0 en el desarrollo de la microalga.....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. RECOMENDACIONES.....	48
7. BIBLIOGRAFIA.....	49
ANEXOS.....	54

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Célula de <i>Dunadiella salina</i>	17
Figura 2. Estructuras de <i>D. salina</i>	17
Figura 3. Ciclo sexual de <i>D. salina</i>	18
Figura 4. Glóbulos de β caroteno dispersos en el cloroplasto de <i>D. salina</i>	22
Figura 5. Organic K-Biogreen.....	27
Figura 6. Beta Carotene.....	28
Figura 7. Grafica curva peso seco (Tomada de Lancheros, 2003).....	33
Figura 8. Promedio del crecimiento de <i>D salina</i> y sus respectivas desviaciones estándar en los ensayos de agitación.....	37
Figura 9. Comparación del crecimiento de <i>D. salina</i> (g/L) a diferentes velocidades de agitación (60rpm, 75 rpm y 90 rpm) y con agitación manual (Control) durante las 30 primeras horas.....	39
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>D. salina</i> con respecto a la agitación.....	39
Figura 11. Comparación del crecimiento de <i>D. salina</i> (g/L) a diferentes valores de pH (7.0, 8.0 y 9.0) y con pH 7.5 (Control) durante las 30 primeras horas.....	40
Figura 12. Promedio del crecimiento de <i>D salina</i> y sus respectivas desviaciones estándar en los ensayos de pH.....	41
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>D. salina</i> con respecto al pH.....	42
Figura 14. Fotografías día 5 y día 20 del cultivo de <i>D.salina</i>	44
Figura 15. Promedio del Crecimiento de <i>D. salina</i> y sus respectivas desviaciones estándar en el control (pH 7.5 y agitación manual) y en el ensayo (pH 8.0 y agitación 75 rpm)	

por triplicado.....	45
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>D. salina</i> en C (pH 7.5 agitación manual) y en M1 (pH 8.0 agitación 75 rpm).....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica.....	16
Tabla 2. Composición de aminoácidos en g (100g proteína) ⁻¹ Borowitzka and borowitzka, 1992.....	20
Tabla 3. Nomenclatura utilizada en los ensayos de agitación y pH.....	32
Tabla 4. Promedio de los valores del Test de Tukey y desviaciones estándar para los diferentes ensayos de Agitación.....	36
Tabla 5. Parámetros cinéticos para los ensayos de agitación.....	38
Tabla 6. Promedio de valores del Test de Tukey y desviaciones estándar para los diferentes ensayos de pH.....	41
Tabla 7. Parámetros cinéticos para los ensayos de pH.....	43
Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos en la segunda parte experimental.....	46

INDICE DE ANEXOS

1. Medio de cultivo Jonhson modificado por Borowitzka.....	55
2. Diseño experimental.	56
3. Resultados obtenidos del conteo en cámara de Newbauer en cada uno de los ensayos.	57
4. Regresión curva de peso seco para <i>D. salina</i>	59
5. Resultados estadística de ANOVA y Test de Tukey para agitación.	60
6. Biomasa, velocidad de crecimiento por intervalos para todos los ensayos de agitación.	63
7. Resultados estadística de ANOVA y Test de Tukey para pH.	69
8. Biomasa, velocidad de crecimiento por intervalos para todos los ensayos de pH.	72
9. Resultados estadística de ANOVA y Test de Tukey para la relación de la agitación de 75 rpm y pH 8.0.	78
10. Conteo en cámara de Neubauer, Biomasa, velocidad de crecimiento por intervalos para la relación de la agitación de 75 rpm y pH 8.0.....	79

RESUMEN

Se trabajó con *Dunadiella salina*, con el objetivo de establecer las condiciones de agitación y pH mas adecuadas para el crecimiento de la microalga en el laboratorio. Se evaluaron tres valores de pH: 7.0, 8.0 y 9.0 y tres velocidades de agitación: 60 rpm, 75 rpm y 90 rpm; cada uno por triplicado para un total de 24 ensayos, siendo cultivadas en medio Jonhson modificado por Borowitzka. Durante el tiempo de crecimiento se midieron los siguientes parámetros: células/mL utilizando cámara de Neubauer, biomasa máxima g/L, velocidad máxima de crecimiento, tiempo de duplicación, r^2 y tiempo total de la curva. La mayor velocidad de crecimiento para la agitación fue de $0,090 \text{ h}^{-1}$, con un tiempo de duplicación menor $7,693 \text{ h}^{-1}$, una biomasa máxima de $0,729 \text{ g/L}$ y un r^2 de $0,953$, para un tiempo total de cultivo de 23 días, todo esto se obtuvo para 75 rpm, podría deberse a que con esta velocidad un mayor número de células puedan exponerse a la luz favoreciendo un mejor proceso fotosintético. En cuanto a la mayor velocidad máxima de crecimiento para el pH fue de $0,082 \text{ h}^{-1}$, con un tiempo de duplicación menor que fue de $8,494 \text{ h}^{-1}$, una biomasa máxima de $0,630 \text{ g/L}$ y un r^2 de $0,931$, para un tiempo total de cultivo de 23 días, esto se obtuvo para un pH de 8.0 ya que a este pH el CO_2 se disuelve mas rápidamente haciendo que el crecimiento de *D. salina* sea mas eficiente. Se diseño un ensayo posterior donde se evaluó la mezcla de estos dos factores, agitación de 75 rpm y pH 8.0 lo que evidenció que la unión de los valores mas favorables influyeron positivamente en el aumento de la biomasa de *D. salina* maximizando su crecimiento.

1. INTRODUCCION

La superficie de la tierra está ocupada por el 70% de agua, de la cual una alta proporción pertenece a océanos y mares. En el medio acuoso la actividad biológica es elevada, por ello durante milenios, el aprovechamiento de este ecosistema ha sido de gran importancia para el desarrollo socio-económico de la humanidad. Los ecosistemas marinos proporcionan condiciones abióticas y bióticas adecuadas para el crecimiento de microalgas, las cuales son fuente de vitaminas, glicerol, proteínas y otros elementos importantes para la constitución celular de los seres vivos (Avron, 1998).

Dunaliella salina es una fuente rica en β -carotenos, tales como, criptoxantina y Licopeno, considerados protectores contra diversos tipos de cáncer. Esta microalga también produce vitamina C, E y β -caroteno empleadas como antioxidantes y suplemento alimenticio. Se usa para realzar el atractivo visual de alimentos conservados, embutidos y cereales. En la acuicultura es útil como suplemento alimenticio para peces, crustáceos, moluscos cultivados y en las granjas para conejos, cerdos, ganado, aves (Avron, 1998).

Tomando en cuenta estas consideraciones, el presente estudio estará enfocado al estudio de las mejores condiciones para la producción a escala de laboratorio de la microalga ***Dunaliella salina*** a pH y agitación controlados.

2. MARCO TEORICO

Características *Dunadiella salina*.

2.1 Clasificación taxonómica.

Conocida por ser el organismo causante del cambio de color (rojo) y el olor en cuerpos de agua hipersalinos, fue descrita por Dunal en 1838, quien le asignó el nombre de *Haematococcus salinus*. Luego de ser ubicada en varios grupos, Teodoresco finalmente la llamo *Dunadiella salina* en 1905, en reconocimiento a Dunal (Mancera, 1988), la clasificó como aparece en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica.

División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Volvocales</i>
Familia	<i>Polyblepharideaceae</i>

Dunadiella pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase *Chlorophyceae*; es tradicionalmente ubicada en el orden *Volvocales*, familia *Polyblepharidaceae* (Ben-Amoht, 1993; Cifuentes, y col., 1995); sin embargo Ettl (1983) propuso el nuevo orden *Dunaliellales* con la familia *Dunaliellaceae* (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

2.2 Morfología.

Dunadiella salina es una microalga unicelular de 8–15 µm de longitud y 6–11 µm de diámetro. Su crecimiento es muy variable, siendo ovoide, elipsoidal, cilíndrica, piriforme o casi esférica (Cifuentes, y col., 1995). Posee dos flagelos similares ubicados en el ápice, un cloroplasto en forma de pocillo, un estigma en la parte lateral posterior de este (Figura 1) y gránulos de almidón en la porción basal. (Ben-Amoht, 1993).

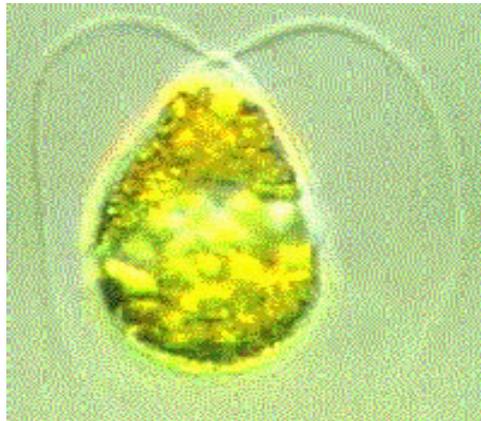


Figura 1. Célula de *Dunaliella salina*

www.icman.csic.es/servic/servCmicroalgas_en.htm

Dunaliella se encuentra cubierta por una membrana plasmática, delgada y elástica. Usualmente las células de *D. salina* muestran una coloración anaranjado-rojiza (Figura 2), debido a la síntesis de β -caroteno que se acumula como gotas en la periferia del cloroplasto (Cifuentes , y col., 1995) en condiciones adversas forman quistes elipsoidales con grandes glóbulos lipídicos, formando un estado de resistencia (Chapman , 1969).

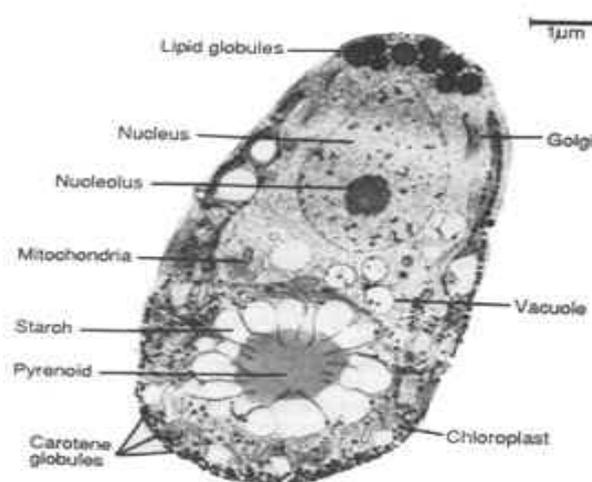


Figura 2. Estructuras de *D. salina*

www.stilweb.com/engstilbio.htm

2.3 Ciclo de vida y reproducción.

Dunadiella salina se reproduce asexualmente por división longitudinal de células móviles, el flagelo igualitariamente se distribuye entre las dos células (Fritisch, 1965). La reproducción sexual es por isogamia y meiosis; luego de la fusión forma un cigoto (Figura 3) que puede ser verde o rojo rodeado de una pared espesa y lisa; el núcleo de este cigoto posteriormente se divide formando 32 células, las cuales se liberan después de la ruptura que protege a la célula madre (Bold, 1985; Borowitzka y col, 1982).

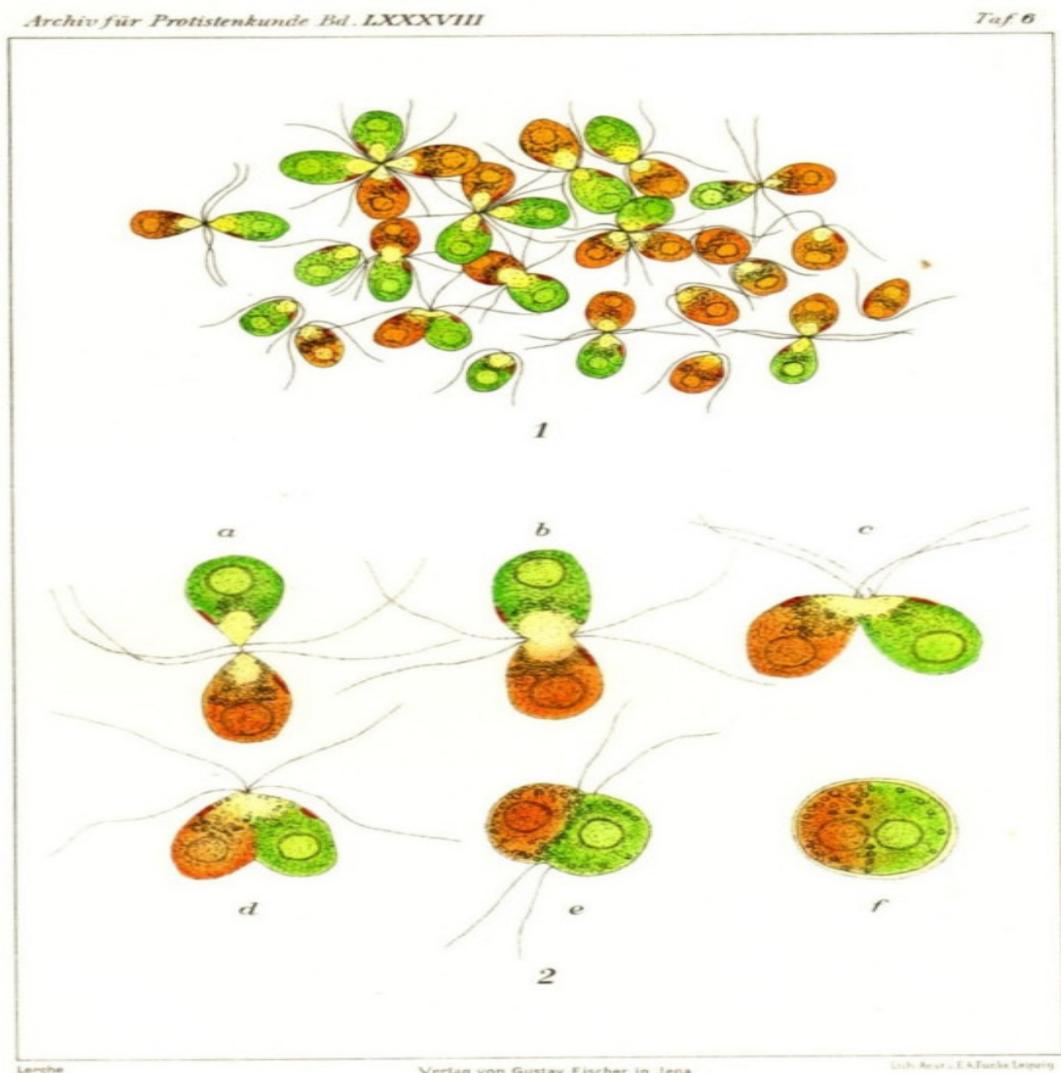


Figura 3. Ciclo sexual de *D. salina*.

www.salinesystems.org/content/1/1/2/figure/F4

2.4 Habitas naturales.

Las especies de *Dunadiella* se encuentran en diferentes ambientes, se han descrito seis especies de agua dulce entre las cuales se encuentran (*D. chordata*, *D. laterales*, *D. paupera*), cuyas inclusiones dentro del género son inciertas para algunos autores. Esta microalga, generalmente, se encuentra en cuerpos de agua salinos en los cuales la concentración de sales es mayor al 10% (Ben-Amoht, 1993) y en aguas hipersalinas (*D. salina*, *D. minuta*, *D. parva* y *D. viridis*) con salinidad mayor al 20% (Borowitzka and Borowitzka, 1988); también pueden encontrarse en suelos salinos (*D. terricola*) (Cifuentes, y col., 1995).

2.5 Composición celular.

2.5.1 Carbohidratos.

Los carbohidratos constituyen de un 30 a 40 % del peso seco de *D. salina* (Parsons, y col., 1961) incluyen mono y disacáridos como galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa; y polisacáridos, especialmente α -1-4 glucosan (Eddy, 1956; Brown, y col., 1983).

2.5.2 Proteínas.

La composición de aminoácidos de *Dunadiella* (Ver tabla 2) comprende aproximadamente del 50 al 60 % de proteína en peso seco, para células verdes (Parsons, y col; 1961) y 30% para células rojas, como también carotenóides en células de crecimiento y alta salinidad (Ben-Amoht, and Avron, 1981); el contenido de proteína es alto en las primeras etapas de crecimiento y decae con el crecimiento de las células (Thomas and Dumas, 1970). El contenido proteico varía según la fuente de nitrógeno, por ejemplo cuando *D. salina* esta creciendo en β -glutamina, diferente al nitrato que normalmente se utiliza, el contenido de proteína es incrementado en un 12% (Komaskova and Prozumenshchikova, 1983) para algunas cepas.

Tabla 2. Composición de aminoácidos en g (100g proteína)⁻¹
Borowitzka and borowitzka, 1992.

AMINOACIDO	<i>D.salina</i>
Alanina	6,3 - 12,9
Arginina	0,9 - 5,2
Acido aspartico	2,5 - 10,7
Cisteina	<i>Traza</i>
Acido glutámico	7,9 - 11,9
Glicina	9,5 - 13,3
Histidina	1,2 - 8,8
Isoleucina	2,3 - 4,2
Leucina	5,0 - 17,6
Lisina	4,8 - 33,9
Metionina	<i>Traza</i> - 1,4
Fenilalanina	1,4 - 5,4
Prolina	4,2 - 8,8
Serina	6,3 - 8,6
Treonina	2,5 - 6,0
Triptofano	
Tirosina	<i>Traza</i> - 1,9
Valina	3,6 - 5,8

2.5.3 Pigmentos.

2.5.3.1 Clorofilas.

La clorofila *a* es un complejo magnesio-porfirínico, tetrapirrólico, cíclico que posee un anillo de ciclopentanona fusionado. La clorofila *b* difiere de la *a* en que contiene como sustituyente un grupo formilo en vez de metilo en el anillo pirrólico (Andreo and Vallejos, 1984).

A pesar de que muchos de los pigmentos fotosintéticos modifican el color gris verdosos en las células, en la mayoría de clases de algas todas contienen clorofila en gran porción. Esta molécula es esencial para la transformación de la radiación electromagnética a energía termoquímica durante la fotosíntesis.

Los productos de degradación de clorofilas mas frecuentes son los derivados libre de magnesio, feofitinas y feoporfirinas (Rowan, 1989).

2.5.3.2 Carotenóides.

Los carotenos son largas cadenas poliisoprenoides con dobles enlaces conjugados que poseen en ambos extremos anillos de ciclohexano sustituidos (Bauernfeind, 1981), y se encuentran unidos a complejos proteínicos en las membranas de los tilacoides; se sabe que algunos como el β -caroteno protegen a las clorofilas contra la foto oxidación.

D.salina tiene el más alto contenido de β -caroteno, de cualquier alga conocida, con una concentración total de carotenoides de hasta 14% de su peso seco (Borowitzka and Borowitzka, 1988); la acumulación de carotenóides depende de la alta salinidad, altas temperaturas y alta intensidad lumínica. Dicha acumulación también aumenta bajo condiciones de limitación de nitrato y el β -caroteno se acumula en glóbulos lipidicos en los espacios intertilacoidales del cloroplasto (Figura 4). Según análisis de resonancia magnética nuclear se ha encontrado un amplio rango de formas cis (mono-cis y di-cis) además de 9-cis y completamente-trans, los cuales están presentes en niveles superiores al 20% del total β -caroteno, siendo la forma 9-cis la que se encuentra en mayor cantidad (Charlotte and Young, 2000).

Las formas 9-cis difieren de los completamente-trans; los 9-cis son mucho mas solubles en solventes hidrofóbicos, muy difícilmente se cristalizan y su forma concentrada es generalmente un aceite, mientras que completamente-trans es prácticamente insoluble en aceite y fácilmente se cristaliza (Ben-Amozi, 1993).

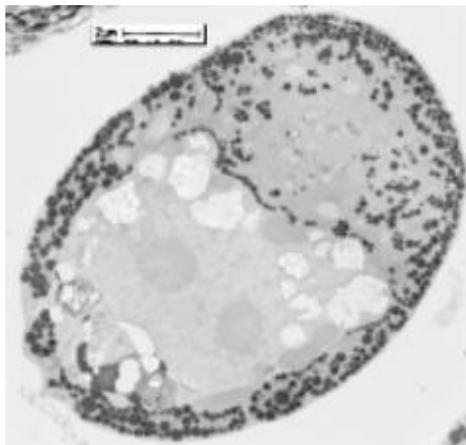


Figura 4. Glóbulos de β caroteno dispersos en el cloroplasto de *D. salina*.
www.adelaide.edu.au/.../image_analysis.html

Cultivos de *Dunaliella* transferidos de una concentración de NaCl del 15% a una del 25%, demuestran que disminuye el tiempo de duplicación y el contenido de β -carotenos aumenta de 50 a 90%, respecto al total de carotenos, en 4 – 5 días de cultivo, respecto al total de carotenos totales (Borowitzka and Borowitzka, 1999).

2.5.3.3 Glicerol.

Estos organismos, en respuesta al aumento repentino de la concentración iónica (NaCl), pierden agua inmediatamente y se contraen, concentrando sus solutos internos; al cabo de unas horas sintetizan varios polioles y vuelven a tener su tamaño original (Marshall, 1991). *Dunaliella* produce glicerol para impedir su deshidratación celular (Ben-Amozi, and Avron, 1981). El glicerol es un alcohol poli-hídrico soluble y su síntesis en *D. salina*, se debe a un mecanismo de adaptación que le permite crecer en altas concentraciones de sales del medio exterior. Por lo anterior se establece una relación directamente proporcional a la concentración de sal del medio donde esta creciendo la microalga (Ben-Amozi, and Avron, 1981).

La concentración intracelular del glicerol es un equilibrio entre su síntesis y la liberación del mismo, que responde al cambio de la presión osmótica externa

(Mancera, 1988). De acuerdo a esto, si la condición del medio es hipotónica o hipertónica, la célula puede hincharse o recogerse puesto que la membrana que rodea al protoplasma es elástica; por lo tanto el glicerol es una respuesta de osmoregulación, producida por cambios en la tensión de la membrana y concentración de moléculas que intervienen en la síntesis de glicerol (Ben-Amozt, and Avron, 1981).

La microalga marina ***Dunaliella salina*** (*Chloropyta, Chloropyceae*) contiene cantidades significativas de glicerol, que pueden incrementarse en respuesta a un aumento de la presión osmótica externa (Hernández, y col. 2000).

El perfil lipídico de las microalgas se caracteriza por la presencia de cantidades apreciables de lípidos neutros, principalmente glicéridos, que representan una fuente potencial de glicerol, además de haberse informado la existencia de glicerol libre en las células de un número considerable de especies y mas ampliamente en ***D.salina***.

El glicerol un trihidroxialcohol es ampliamente utilizado en las industrias química, farmacéutica y cosmética en virtud de sus propiedades humectantes, antisépticas, hidrosópicas y espesantes. Se trata de un líquido incoloro, viscoso y casi inoloro, que posee una temperatura de ebullición de 290 °C y una temperatura de fusión de 17,9 °C. La fuerza de tensión superficial es menor que la del agua, pero mayor que la de muchos disolventes orgánicos; resulta soluble en agua y etanol e insoluble en éter etílico y cloroformo (Hernández, y col. 2000).

2.6. Condiciones de crecimiento.

Todas las especies de ***Dunadiella*** estudiadas son estrictamente fotoautótrofas y requieren carbono inorgánico para sobrevivir. Existe evidencia de que rangos fotosintéticos, valores de pH y concentraciones de

carbono inorgánico, diferentes, no afectan el crecimiento de esta especie; incluso *D. tertiolecta* y *D. salina* pueden utilizar ambos, CO₂ y HCO₃ como fuente inorgánica de carbono. (Wegmann and Metzner, 1971; Loeblich, 1972; Latorella and Vadas, 1973).

En condiciones extremas de salinidad, temperatura y pH *D. salina* crece tomando como fuente de carbono inorgánico la forma iónica del carbono CO₃⁻². La adición de carbono inorgánico como CO₂ en aire o como NaHCO₃ estimula el crecimiento de *Dunadiella*, sin la precipitación de carbonatos (Massyuk, 1965; Drokova and Dovhorouka, 1966). El crecimiento es estimulado si el contenido de CO₂ en el aire es burbujeado a través del medio, reduciendo el pH e incrementando la concentración de CO₂ (Van Auken and McNulty, 1973). La adición de carbono inorgánico también parece afectar la tolerancia a intensidad de luz y temperaturas altas en algunas *Dunadiella spp* (Ginzburg and Ginzburg, 1981).

El mejor recurso de nitrógeno para *D. salina* es el NaNO₃, nitritos y nitratos (Mil'ko, 1962; Grant, 1968). También se utilizan sales de amonio como acetato, nitrato de amonio, citrato de amonio y cloruro de amonio; sin embargo, estas sustancias son menos efectivas pueden ser letales en concentraciones mayores de 2.5 M.

La fuente de fósforo más adecuada es K₂HPO₄ pero inhibe el crecimiento en concentraciones mayores a 5 g/litro.

Todas las especies marinas y halofílicas tienen un requerimiento específico por el sodio (Johnson's y col., 1968); de todas formas, para algunas especies la mayoría del NaCl puede ser remplazado por MgSO₄.

Además de los anteriores componentes, el cultivo de la microalga requiere hierro en concentraciones no mayores a 3.75 mg/mL; altas concentraciones de hierro inhiben su crecimiento (Mil'ko, 1962). Algunos elementos-traza, como zinc, cobalto, cobre, molibdeno y vanadio son adicionados al medio de *Dunadiella*. No existen datos precisos que muestren un absoluto requerimiento de la mayoría de estos (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Dunadiella spp. a diferencia de otras algas no requiere de vitaminas para su crecimiento (Gibor, 1956).

2.6.1 pH.

El pH del medio de crecimiento, afecta muchos procesos asociados con el crecimiento algal y el metabolismo, incluyendo la disponibilidad y asimilación de iones (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Este factor es de vital importancia para el crecimiento de ***D. salina*** y su metabolismo; incluyendo la disponibilidad del CO₂ para la fotosíntesis y para tomar diferentes iones. El óptimo pH reportado para el crecimiento de ***D. salina*** esta entre 7.0 y 9.0; sin embargo, la mayoría de las especies de ***Dunadiella*** pueden adaptarse a diferentes valores de pH, ***D. salina*** por ejemplo tolera un pH entre 5.5 y 10. (Baas-becking, 1930; Massyuk and Yurchenko, 1962).

2.6.2 Temperatura.

Esta debe tener un intervalo optimo entre 20 y 40 °C (Borowitzka and Borowitzka, 1988) y soporta temperaturas hasta de -18°C (Massyuk, 1966).

2.6.3 Intensidad lumínica.

Se ha encontrado que ***D. salina*** soporta radiaciones mayores a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo el óptimo para la fotosíntesis se encuentra en un rango de 100 – 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cifuentes y col, 1995). Como sistema de protección a la alta intensidad de luz, esta implicada la producción de carotenóides, que se acumulan en la periferia de los cloroplastos (Ben-Amotz, y col, 1989; Borowitzka and Borowitzka, 1988; Mancera, 1988)

2.6.4 Agitación.

La agitación es un factor que incide en forma positiva sobre el crecimiento de un medio liquido de cultivo (Eliach, 2004) la ventaja del sistema de agitación de Laws (vortex hidráulicos) radica precisamente en que consigue controlar

la turbulencia (la intermitencia de los periodos de luz-oscuridad) de una forma eficaz y poco costosa ya que consigue vortices con una rotación de entre 0,5 –1Hz, donde 1Hz es igual a 60 rpm, lo cual genera un incremento por efecto de luz de entre 2 y 2,5 veces en cultivos realizados durante tres meses y efectividad del 3,7%. En ensayos cortos (5 días) generando una efectividad de hasta el 10% (Richmond y col, 1990).

La agitación también es esencial para minimizar el efecto de un porcentaje relativamente bajo de oxígeno disuelto en el medio de cultivo % O₂, ya que aún a porcentaje relativamente bajo, el O₂ reduce la biomasa producida (Borowitzka, 1992). Para ello se compara la productividad de un cultivo de ***Dunaliella salina*** en tres velocidades de agitación magnética y una agitación manual.

Se han observado efectos positivos provocados por una intensa agitación sobre la productividad solamente en cultivos de algas que se desarrollan en estanques agitados por ruedas de paletas. En biorreactores cerrados, con utilización de bombas, el efecto positivo puede ser enmascarado debido al daño mecánico que sufren las paredes de las células. (Richmond y col, 1990).

Por tal razón uno de los objetivos de este trabajo es mostrar cómo incide la agitación del medio de cultivo en el crecimiento de microalgas al exponer las células a un régimen de luz más adecuado en agitación magnética, con respecto a un cultivo que es agitado manualmente por menor tiempo.

2.7 Aplicaciones.

Dunaliella salina puede ser utilizada como alimento de humanos. La ausencia de pared celular en esta alga, en contraste con la mayoría, la hace digestible. El incomparable contenido de carotenoides en ***D. salina*** aporta

varios beneficios para la salud; como antioxidantes, protegen al organismo animal de los radicales libres, reducen drásticamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares, previenen la artritis, el cáncer, las cataratas y el daño por rayos UV. Todo ello convierte **D. salina** en un compuesto atractivo para distintas industrias como la cosmética y alimentaria (Hernández, y col. 2000).

En el campo de la tecnología farmacéutica, el glicerol es un disolvente de extraordinario valor, capaz de formar disoluciones concentradas y permanentes, imposibles de obtener con otros vehículos. Algunas de estas disoluciones se emplean como medicamentos en su forma original, en tanto otras se usan para preparar diluciones acuosas o alcohólicas de baja solubilidad en estos disolventes. Entre las formas farmacéuticas que contienen glicerol en su composición se pueden citar: geles, lociones, supositorios y diferentes mezclas.

Se han desarrollado diversos productos multivitamínicos que ayudan al cuerpo a una detoxificación completa con base en microalgas, como el organic K-biogreen y el "Beta carotene" (Figura 5) los que se usan como suplementos dietéticos, libres de aditivos o colorantes (100% natural), teniendo dentro de su composición microalgas como **Spirulina** y **Dunaliella salina** esta última muy conocida por la producción de agentes antioxidantes y vitaminas A y C.

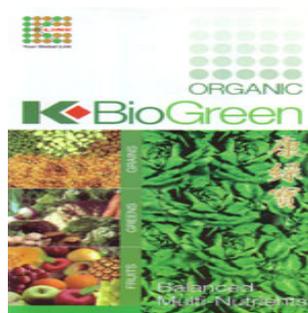


Figura 5. Organic K-Biogreen. www.k-biogreen.at/



Figura 6. Beta Carotene.

[www.zellersnaturalhealth.com/ Products/Images/...](http://www.zellersnaturalhealth.com/Products/Images/...)

Las microalgas son componentes propios de la microflora del suelo y de los cuerpos de agua, en los cuales se ha probado su efecto herbicida. Estas tienen diversas funciones como la producción de CO², fijación biológica de nitrógeno, acumulación de partículas minerales e interacción con otros organismos. Estos atributos hacen que puedan ser comercialmente usadas en agricultura ya que las microalgas no compiten en el suelo por carbón y energía, lo cual hace que si se usen como inoculo en fertilizantes y sea mejor su rendimiento (Metting, 1987).

En el tratamiento de aguas residuales las algas son de vital importancia ya que tiene gran capacidad de producir oxígeno, contribuyen en la sedimentación, desinfección y también en la remoción de metales pesados ya que tienen gran afinidad por los cationes polivalentes y tóxicos orgánicos;

estas tienen la capacidad de hacer cambios constantes en el potencial de agua, temperatura, radiación, sustratos de carbono, factores de crecimiento, pH, factor redox, capacidad de intercambiar cationes y en aguas con concentración de sales muy alta, en un medio completamente inorgánico, mantienen el cultivo prácticamente libre de competidores, patógenos y predadores (Borowitzka, 1999).

3. METODOLOGIA

3.1 Microorganismo:

Durante el trabajo de experimentación se utilizó una cepa de *Dunadiella salina* aislada de las salinas de Manaure (Guajira), caracterizada morfológicamente y fisiológicamente (Lancheros, 2003) y mantenida activa en el Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana.

3.2 Condiciones del inóculo:

La concentración del inóculo en el momento de realizar la curva de crecimiento fue de 0.7595 (g/L); como medio de cultivo se utilizó un Jonhson (Anexo 1) con concentración de NaCl (p/v) del 12% (2.05 M). El inóculo se mantuvo con foto período de 12/12 (día/noche), intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y agitación manual por 5 minutos, 2 veces al día (Lancheros, 2003). Se trabajó en frascos Erlenmeyer de 500 mL, con un volumen efectivo de trabajo de 250 mL y se llevó a cabo la técnica de recuento en cámara de Neubauer (ver 3.4.2) dos veces por semana, durante 2 meses, esto con el fin de controlar la viabilidad del Inóculo. Se hizo recambio del medio aproximadamente cada 10 días.

3.3 Condiciones de experimentación:

En el tiempo de experimentación se trabajó con una cámara, con la misma intensidad lumínica y foto período de mantenimiento del inóculo (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y 12/12 día/noche) y una temperatura que osciló entre 23 y 25 °C, esto con el fin de conservar constantes dichas variables, durante todos los bioensayos. (Anexo 2)

3.3.1 Agitación.

Para la evaluación de esta variable, se realizaron 3 réplicas (total: 9 ensayos), utilizando medio Jonhson con un pH inicial de 7.5 (Lancheros, 2003). Esta agitación se llevó a cabo con un agitador magnético. Se experimentaron 3 diferentes velocidades de agitación 60 rpm, 75 rpm y 90 rpm (Borowitzka, 1999) teniendo como control la agitación manual por 5 minutos 2 veces al día (Lancheros, 2003) dentro del trabajo las agitaciones se denominaran A1 para 60 rpm, A2 para 75 rpm y A3 para 90 rpm (Tabla 3). El crecimiento celular se evaluó realizando el recuento en cámara de Neubauer cada 5 horas durante las 30 primeras horas y luego cada 24 horas.

3.3.2 Experimentación con el pH.

Se trabajó con medio Jonhson, 3 replicas, a diferentes pH iniciales de 7.0, 8.0 y 9.0 (Bernal, 2006) (Cifuentes y col, 1996) los cuales se cultivaron en frascos Erlenmeyer de 500mL con un volumen efectivo de trabajo de 250mL para un total de 15 ensayos y se utilizó como control pH 7.5 (Lancheros, 2003). Se hicieron lecturas o conteo de células las 30 primeras horas, cada 5 horas, luego cada 24 horas. Los diferentes valores de pH ensayados se denominaron así: H1 para 7.0, H2 para 8.0 y H3 para 9.0 (Tabla 3).

Después de determinar los valores de pH y agitación que llevaron a los mayores valores de crecimiento celular se realizó un ensayo final con estas dos variables, bajo las mismas condiciones de temperatura y de luz, ya mencionadas.

Tabla 3. Nomenclatura utilizada en los ensayos de agitación y pH.

L A B O R A T O R I O	AGITACION	Control		C1		
		Control		C2		
		Control		C3		
		E N S A Y O S	A1			A1'1
						A1'2
						A1'3
			A2			A2'1
						A2'2
						A2'3
			A3			A3'1
						A3'2
						A3'3
	pH	Control		P1		
		Control		P2		
		Control		P3		
		E N S A Y O S	H1			H1'1
						H1'2
						H1'3
			H2			H2'1
						H2'2
						H2'3
H3					H3'1	
					H3'2	
					H3'3	

Los resultados obtenidos del conteo en cámara de Newbauer en cada uno de los ensayos se presentan en el anexo 3.

3.4 Determinación de biomasa.

3.4.1. Curva Patrón de Peso Seco.

Para determinar la cantidad de peso seco de la microalga durante su crecimiento se tomó como referencia (Anexo 4) la curva de peso seco (Figura 7) realizada en el Departamento de Química durante el desarrollo del trabajo “Aislamiento y cultivo bajo condiciones de laboratorio de una cepa nativa de *Dunadiella salina* (clorofita) de Manaure, Guajira” 2003.

Para una confiabilidad del 95% la variable explicativa es significativa y la ecuación que relaciona estas dos variables es:

$$\text{Peso Seco} = (6.2 * 10^{-6}) * (\text{número de células/mL})$$

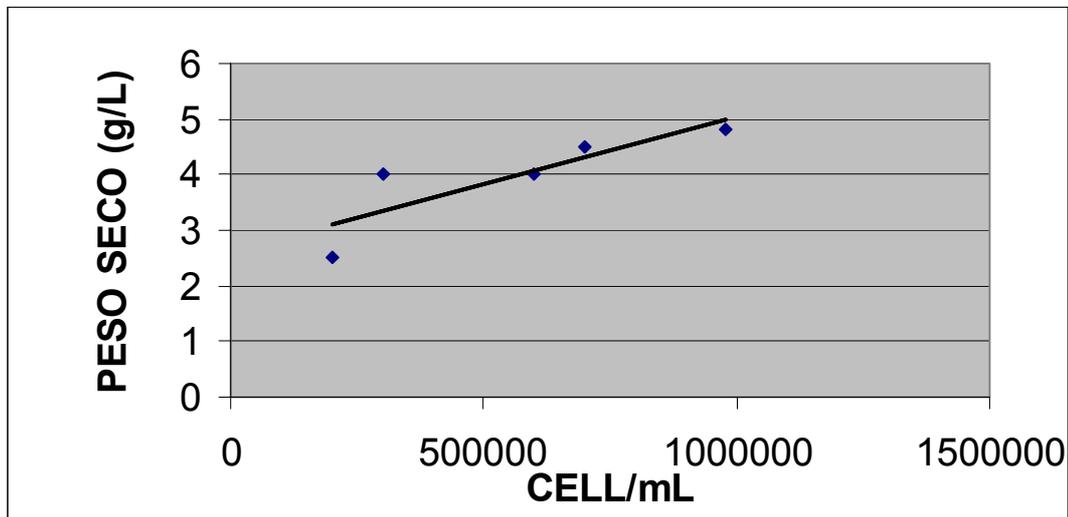


Figura 7. Grafica curva peso seco (Tomada de Lancheros, 2003).

3.4.2 Recuento en cámara.

Para este procedimiento, se aplicó agitación manual al cultivo y se tomaron 2 mL (2000 μ L) de este. La muestra se puso en un tubo de centrifuga con punta cónica y se inactivaron las células con una gota de lugol al 10% para facilitar el conteo. La estimación del número de células tuvo las siguientes condiciones recomendadas por Cifuentes y col., 1995: si la densidad del cultivo era baja se debe concentró el cultivo agregado con lugol y se sometió

a centrifugación a 2000 rpm/min durante 15 minutos (Mancera, 1988) para luego descartar el sobrenadante y concentrar la muestra 3 veces; si la densidad del cultivo era alta se diluyó con medio de cultivo fresco y el factor de dilución se multiplicó por el número de células en la fórmula empleada. Como la concentración obtenida se consideró óptima se hizo el conteo directamente luego de la inactivación con lugol al 10%. Después de realizar la fijación de la muestra con lugol, se llevaron 10 µL de la suspensión (micropipeta) a la cámara de Neubauer. El conteo se efectuó en los 25 cuadrantes de la cámara, hasta obtener un número de 300 células con el fin de tener una confianza del conteo del 90% (Wetzel, 2001). Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el número de células por mL (Cifuentes y col., 1995).

$$\text{Células/mL} = \text{número de células} * 10^4$$

3.5 Experimentación con velocidad de agitación y valor del pH simultáneamente.

Una vez obtenidos y analizados los datos obtenidos en los ensayos descritos en los numerales 3.3.1 y 3.3.2, se determina el pH y la agitación más adecuada con el fin de utilizar ambas variables en un solo bioensayo. En este caso correspondió a pH 8.0 y 75 rpm (M1). Se trabajaron las mismas condiciones de experimentación (numeral 3.3) que en la primera parte experimental, el control se mantuvo con agitación manual pH 7.5

3.6. Análisis de datos

Con el fin de comparar promedios del número de células en las variables de estudio, agitación y pH, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa R. Project (R. Development. Core Team, 2005), luego se efectuó un Test de Tukey para comparar diferencias entre ensayos, con respecto a los controles.

Estos análisis se reportan por medio de las medias y los errores estándar. Este modelo determinó la influencia de las condiciones de pH y Agitación adecuadas sobre el crecimiento celular de ***D. salina*** para de esta forma optimizar el rendimiento a escala de laboratorio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Agitación y valor del pH.

Estos factores físicos son de gran importancia para el crecimiento de la microalga, ya que afectan de manera directa la fijación del nitrógeno así como también la producción de pigmentos por parte de *D. salina* (Weissman & Benemann, 1979).

4.1.1. Comportamiento del crecimiento en relación a la agitación.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la incidencia de la agitación mecánica del medio de cultivo líquido, en el crecimiento microalgal con respecto a un cultivo sometido a las mismas condiciones experimentales pero agitado manualmente. Este último es considerado cultivo de referencia por haber sido utilizado en el trabajo de Lancheros (2003).

Se encontraron diferencias significativas entre los ensayos durante las pruebas de agitación (ANOVA, F: 224.45, gl: 252, $P < 0.0000001$). Posteriormente se aplicó el Test de Tukey con un 95 % de confianza (Anexo 5), en el cual se encontraron las mayores diferencias en los ensayos (Figura 8); estos datos aparecen graficados en la figura 8, se observa claramente

Tabla 4 Promedio de los valores del Test de Tukey y desviaciones estandar para los diferentes ensayos de Agitación.

<i>Ensayo</i>	Promedio cell/mL	desviacion estandar
C1	25,9	4,6
C2	25,9	4,5
C3	25,5	4,7
A1'1	28,1	6,2
A1'2	28,5	6,5
A1'3	29,1	6,9
A2'1	37,9	6,2
A2'2	39,1	6,4
A2'3	37,5	6,6
A3'1	28,7	6,6
A3'2	28,6	5,8
A3'3	27,7	6,3

que hubo una diferencia del ensayo (**A2'1**, **A2'2** y **A2'3**) con respecto al control ya que sus desviaciones estándar no se cruzaron.

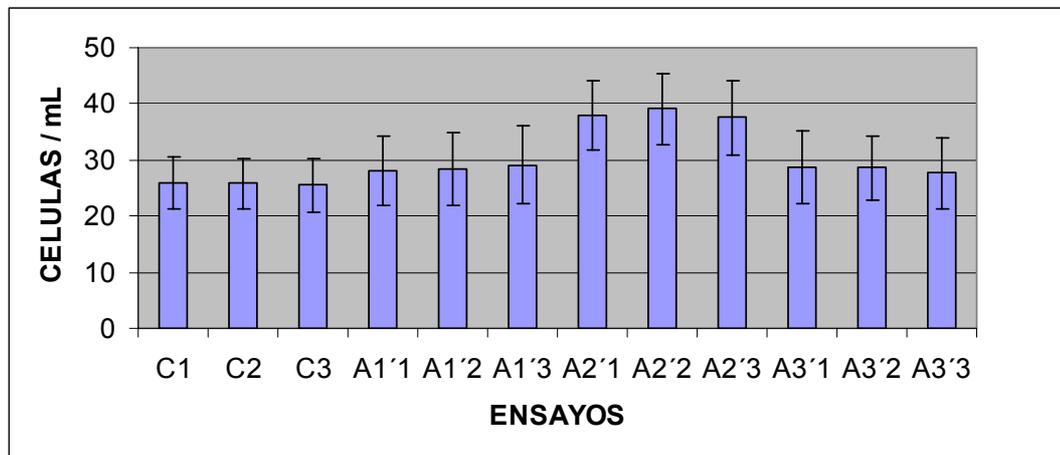


Figura 8. Promedio del crecimiento de *D. salina* y sus respectivas desviaciones estándar en los ensayos de agitación.

Se observó que la agitación es un factor que incide en forma positiva sobre el crecimiento de *D. salina*, al permitir el paso de la luz al fondo del recipiente, actuar como aislante térmico y formar una estratificación en la temperatura del medio de cultivo (Eliach, 2004).

En el ensayo control de la agitación (**C**), se formó en la superficie del medio de cultivo una capa compacta y densa de *D. salina* debido al crecimiento competitivo de las mismas, es por esto que la microalga necesita de la agitación para que las células en movimiento no se agrupen y tengan mayor contacto con el oxígeno, lo que beneficia el crecimiento y la productividad del cultivo (Richmond et al. 1990).

La fase de adaptación es un periodo de acoplamiento que necesitan las células para sintetizar determinados componentes básicos para su metabolismo ya que al hacer los pases de un medio a otro las células necesitan producir enzimas para metabolizar compuestos y así poder empezar su fase exponencial (Pedroza, 2003). Teniendo en cuenta la cinética de crecimiento de los ensayos (**A1**, **A2**, **A3**) con respecto al control

(C) (Figura 9). Se observó claramente un comportamiento similar en todos los ensayos manteniéndose de esta forma hasta la hora 30.

La fase exponencial en todos los bioensayos (**A1, A2, A3**) inicia el día 3 y termina el día 13 (Figura 10). Esta etapa se caracteriza porque los nutrientes se hallan en exceso y la velocidad de crecimiento esta limitada solo por las propiedades intrínsecas del organismo (Pedroza, 2003). Durante esta fase los parámetros cinéticos (Tabla 5) de las agitaciones (**A1, A2 y A3**) utilizadas en el trabajo presentan diferencias como es la máxima biomasa alcanzada en **A2** (0.73 g/L) con respecto a **C** (0.5 g/L). Igualmente se determinó un tiempo de duplicación (h^{-1}) menor y una μ_x max ligeramente mayor (Tabla 5) entre ambos casos, que se dio en un tiempo total de cultivo de 23 días (Anexo 6). Lo anterior podría deberse a que una agitación de 75 rpm permite que un mayor número de células puedan exponerse a la luz favoreciendo un mejor proceso fotosintético. Adicionalmente se da un intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el medio de cultivo, induciendo la liberación del oxígeno generado por la respiración (Richmond et al. 1990) lo que disminuye la pérdida de biomasa por esta causa. En el caso de **A3** no se favoreció el crecimiento debido posiblemente a que las altas velocidades indujeron un fenómeno conocido como vortex que genera un efecto de cizalla (Doran, 1988) el cual hace que se rompan las células contra las paredes del recipiente que las contiene.

Tabla 5. Parámetros cinéticos para los ensayos de agitación.

	60 rpm (A1)	75 rpm (A2)	90 rpm (A3)	CONTROL (manual)
μ_x	0,083	0,090	0,067	0,076
TIEMPO DE DUPLICACION (h^{-1})	8,381	7,693	10,330	9,084
TIEMPO TOTAL DE CULTIVO (días)	23	23	23	23
BIOMASA MAX (g/L)	0,548	0,729	0,532	0,496
r^2	0,988	0,953	0,978	0,958

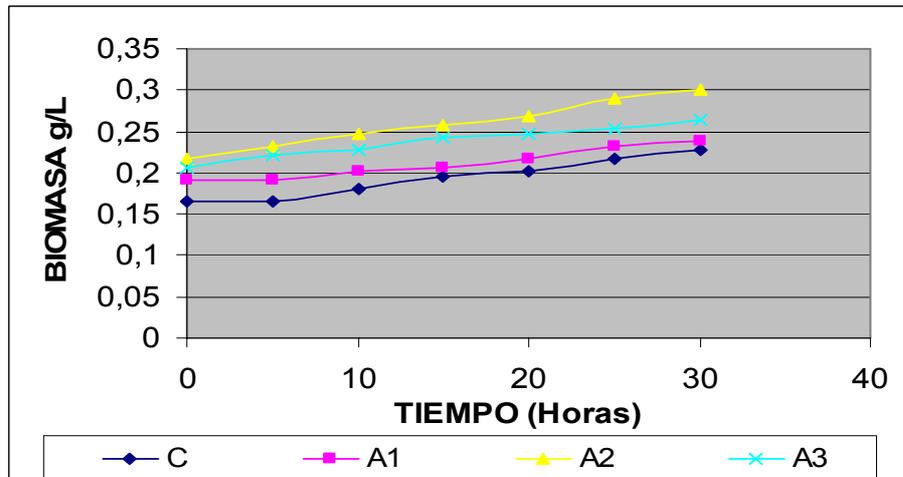


Figura 9. Comparación del crecimiento de *D. salina* (g/L) a diferentes velocidades de agitación (60rpm, 75 rpm y 90 rpm) y con agitación manual (Control) durante las 30 primeras horas.

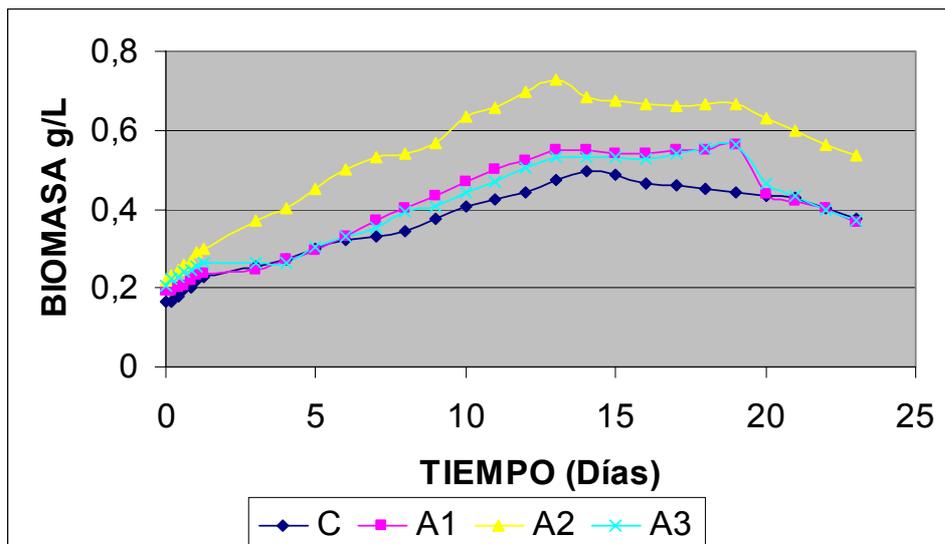


Figura 10. Curva de crecimiento de *D. salina* con respecto a la agitación.

A partir del día 13 se da inicio a la fase estacionaria en la cual el número de células que se dividen iguala al de las que mueren. Esta fase se prolongo hasta el día 19, en que se dio inicio a la fase de muerte la cual terminó el día 23.

4.1.2. Comportamiento del crecimiento en relación al pH.

El otro objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia del pH del medio en el crecimiento de la microalga, teniendo en cuenta que esta crece favorablemente en rangos de ambientes neutros a básicos (Ginzburg y Ginzburg, 1981). Este parámetro afecta muchos procesos directamente relacionados con el crecimiento algal y el metabolismo, incluyendo la disponibilidad y asimilación de iones (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

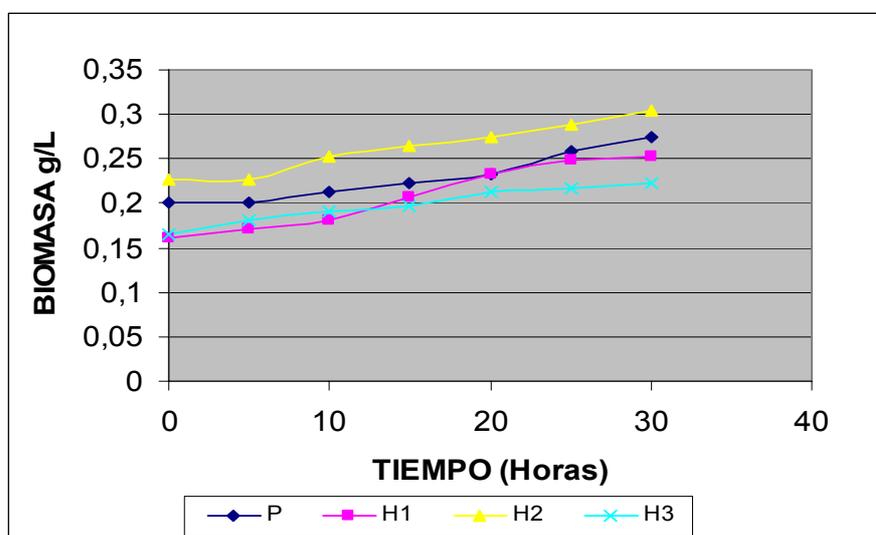


Figura 11. Comparación del crecimiento de *D. salina* (g/L) a diferentes valores de pH (7.0, 8.0 y 9.0) y con pH 7.5 (Control) durante las 30 primeras horas.

Teniendo en cuenta el crecimiento del control (**P**) y los ensayos (**H1, H2, H3**) durante las 30 primeras horas (Figura 11), se observó que no se presentó un cambio significativo que condujera a un aumento en la biomasa (g/L) de los ensayos, por lo cual no se tuvo en cuenta para aplicar la estadística.

A partir del día 3 se encontraron diferencias significativas entre los ensayos durante las pruebas de pH (ANOVA, F: 166.139, gl: 252, P < 0.0000001). Posteriormente se aplicó el Test de Tukey con un 95 % de confianza (Anexo 7), para el cual se encontraron las mayores diferencias en los ensayos (Ver

tabla 6) esto se aprecia mejor al usar los promedios y sus respectivas desviaciones estandar (Sd).

Tabla 6. Promedio de valores del Test de Tukey y desviaciones estandar para los diferentes ensayos de pH.

Ensayo	Promedio cell/mL	sd
P1	27,5	4,9
P2	28	5,5
P3	28	5,1
H1'1	25	4,5
H1'2	24,2	4,3
H1'3	22,3	3,9
H2'1	32,4	6,2
H2'2	33,6	5,4
H2'3	35,4	4,8
H3'1	21,6	2,7
H3'2	20,4	2,4
H3'3	20,7	2,5

A continuación se procedió a realizar una grafica de barras con los datos reportados (Figura 12), para mirar cual de los ensayos se comporoto de mejor manera, e hizo una diferencia respecto a **P**.

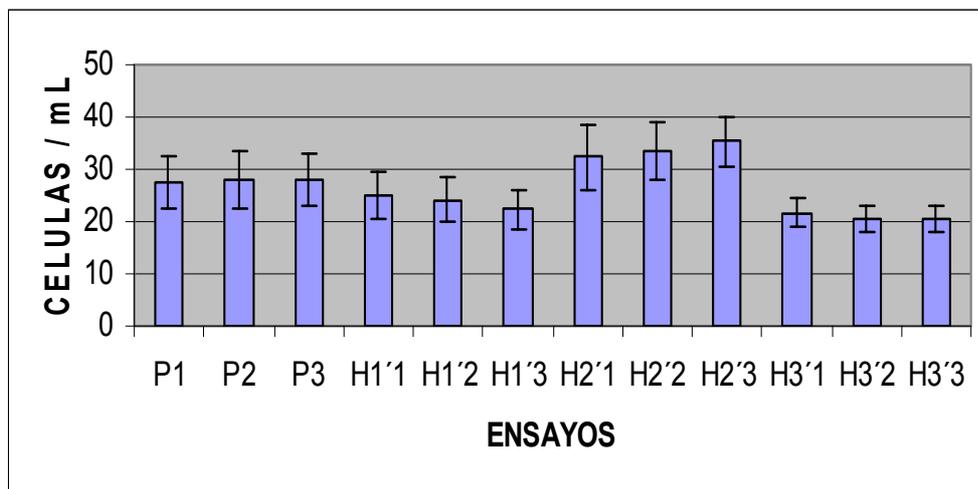


Figura 12. Promedio del crecimiento de *D salina* y sus respectivas desviaciones estándar en los ensayos de pH.

La fase exponencial en todos los bioensayos (**H1, H2, H3**) inicia el día 3 y termina el día 13 (Figura 13). Esta etapa se caracterizó por que los nutrientes se hallan en exceso y la velocidad de crecimiento estaba limitada solo por las propiedades intrínsecas del organismo (Pedroza, 2003) (Anexo 8). Durante esta fase los parámetros cinéticos (Tabla 7) del pH (**H1, H2 y H3**) utilizadas en el trabajo presentan diferencias como la máxima biomasa alcanzada en **H2** (0.63 g/L) con respecto a **P** (0.532 g/L). También se presentó un tiempo de duplicación (h^{-1}) menor y una μ_x mayor para los dos ensayos. Esto puede presentarse debido que a pH alcalino el CO^2 se disuelve mas rápidamente haciendo que el crecimiento de *D. salina* sea mas eficiente (Ginzburg y Ginzburg, 1981). En tanto que en los ensayos **H1** (pH 7.0) y **H3** (pH 9.0) respecto al control no se vieron influenciados de manera positiva, ya que a menor pH del medio, *D. salina* es incapaz de metabolizar el dióxido de carbono, influyendo así en su crecimiento (De la Noue, 1988); en contra parte a pH mas elevado el consumo de oxigeno es menor, alterando así el crecimiento de *D. salina*, lo cual muestra que el pH juega un papel importante en la optimización del balance del HCO^3 y el CO^2 (Thakur y Kumar, 1997).

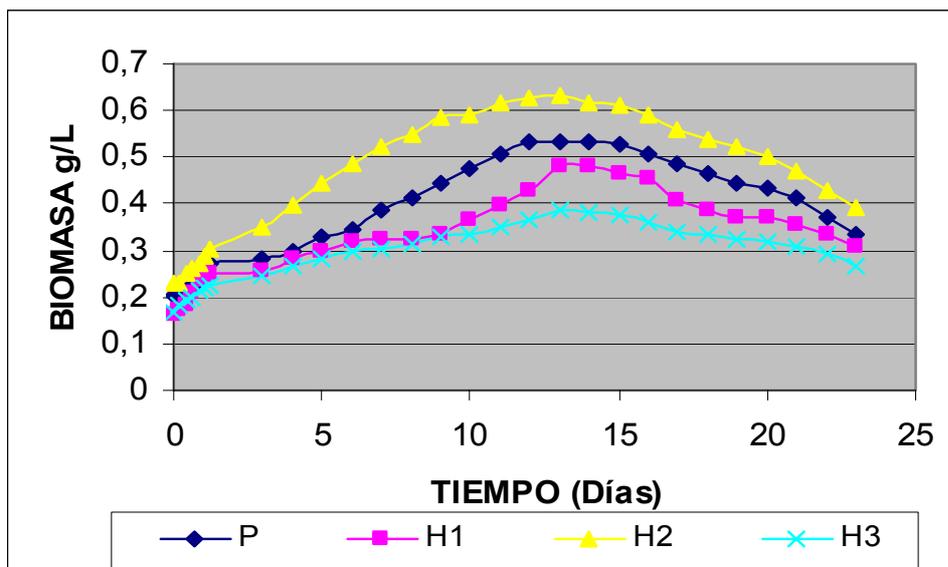


Figura 13. Curva de crecimiento de *D. salina* con respecto al pH.

Tabla 7. Parámetros cinéticos para los ensayos de pH.

	pH 7,0 (H1)	pH 8,0 (H2)	pH 9,0 (H3)	CONTROL
μX	0,066	0,082	0,056	0,075
TIEMPO DE DUPLICACION (h ⁻¹)	10,518	8,494	12,203	9,181
TIEMPO TOTAL DE CULTIVO (días)	23	23	23	23
BIOMASA MAX (g/L)	0,481	0,630	0,388	0,532
r ²	0,889	0,931	0,929	0,969

A partir del día 14 se dio inicio a la fase estacionaria, periodo en el que cesa el crecimiento porque se agota el sustrato, formándose metabolitos tóxicos que promueven la muerte de las células y que se manifiestan por una producción de biomasa estable y sin cambios (Pedroza, 2003). En el día 16 se da inicio a la fase de muerte que se prolongo hasta el día 23, tiempo total de la curva, caracterizado por disminución de nutrientes disponibles en el medio, lo cual afecta las funciones metabólicas de las células.

Se notó que dependiendo del pH que se maneje, incidirá de forma positiva o negativa sobre el crecimiento de *D. salina*, teniendo en cuenta que este parámetro al ser muy ácido o muy básico hará que la microalga se estrese y no lleve a cabo correctamente sus procesos metabólicos, afectando directamente su desarrollo y crecimiento incluso hasta producir la muerte (Borowitzka, 1999).

Las diferencias entre los resultados se pueden deber a que a pH 8.0 el CO₂ se disuelve mas rápidamente haciendo que el crecimiento de *D. salina* sea mas eficiente (Ginzburg y Ginzburg, 1981). Por otra parte la agitación promueve la distribución de la luz, actúa como factor de uniformidad térmica evitando la estratificación en la temperatura del medio de cultivo (Eliach, 2004) favorece un mayor intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el de cultivo e induce la liberación del oxígeno generado por la respiración (Richmond y col, 1990).

Es importante destacar que durante el transcurso del crecimiento de la microalga tanto en los controles como en los ensayos, se pudo observar un cambio en la tonalidad del medio de cultivo. En los ensayos en los que se experimento separadamente los factores de pH y velocidad de agitación el color cambio de un verde muy claro, casi transparente, a una tonalidad más oscura (Figura 14), esto se debe posiblemente a que cuando *D. salina* se lleva a condiciones de estrés, como en el caso del pH 9.0 desarrolle una mayor cantidad de pigmentos con el fin de protegerse del medio en el que se encuentra (Borowitzka, 1999).

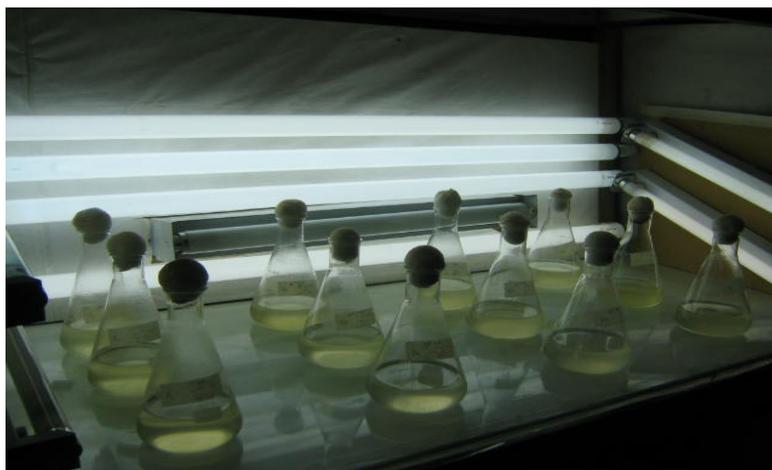
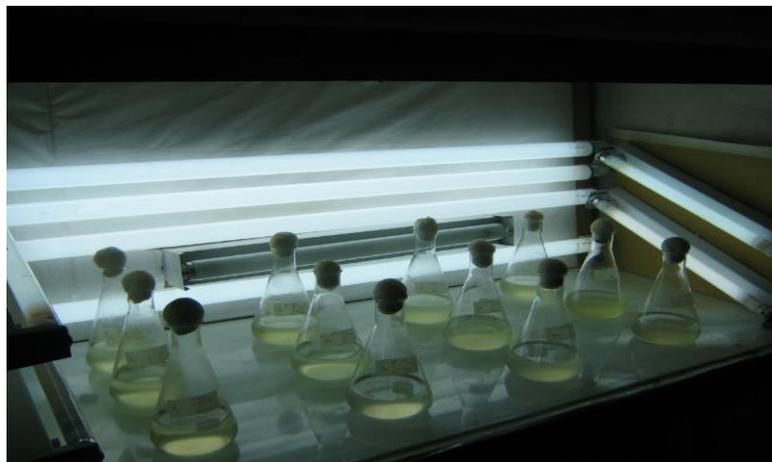


Figura 14. Fotografías día 5 y día 20 del cultivo de *D.salina*.

4.2. Relación de la agitación de 75 rpm y pH de 8.0 en el desarrollo de la microalga.

Después de aplicar el análisis de varianza de una vía sobre los mejores ensayos de pH y agitación y encontrar diferencias significativas entre los ensayos (ANOVA, $F= 73.7$; $gl = 66$; $P < 0.0000001$), se aplicó el Test de Tukey con 95% de confianza (Anexo 9), donde se encontró que las mayores diferencias se dieron entre C3 (26.2 ± 5.2) y M1'1 (44.1 ± 11.2) (Figura 15).

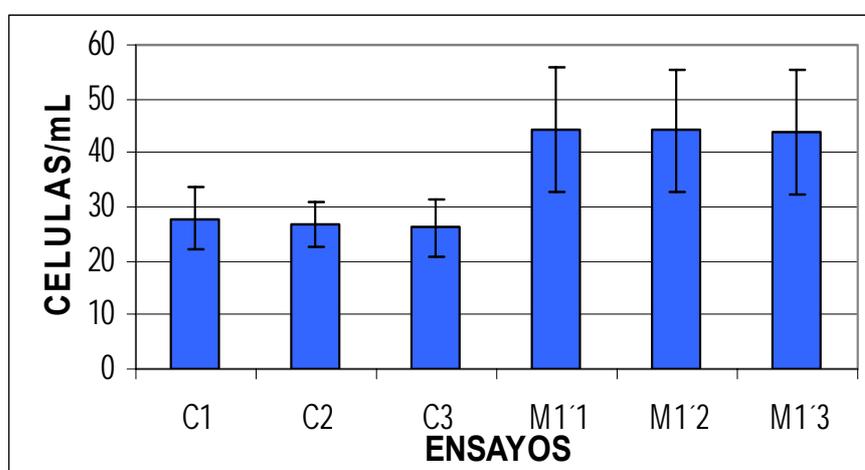


FIGURA 15. Promedio del Crecimiento de *D. salina* y sus respectivas desviaciones estándar en el control (pH 7.5 y agitación manual) y en el ensayo (pH 8.0 y agitación 75 rpm) por triplicado.

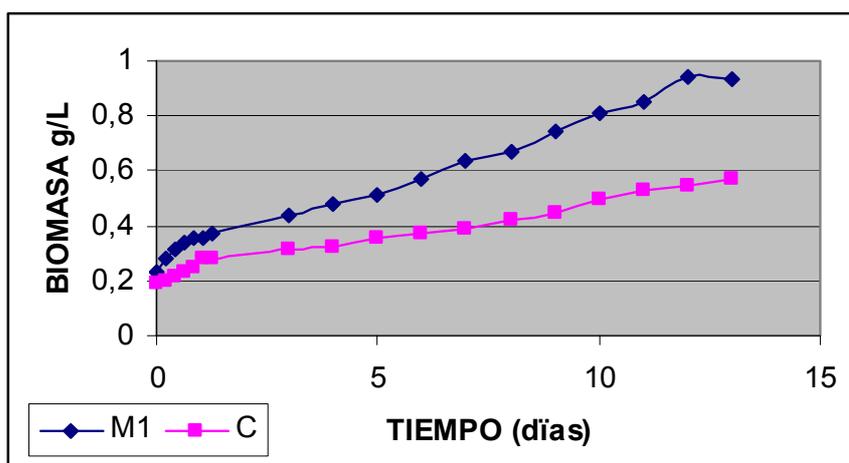


Figura 16. Curva de crecimiento de *D. salina* en C (pH 7.5 Agitación manual) y en M1 (pH 8.0 Agitación 75 rpm).

En la fase experimental que involucró los mejores valores hallados, previamente, del pH y agitación del medio, (Figura 16) se observó que se presentan las mismas características de crecimiento observadas en el periodo experimental, cuando se detecto que no había fase de adaptación y se observaba una fase exponencial hasta el día decimotercero.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos en la segunda parte experimental.

	75 rpm pH 8,0 (M1)	CONTROL
μX	0,095	0,072
TIEMPO DE DUPLICACION (h^{-1})	7,258	9,569
TIEMPO TOTAL DE CULTIVO (días)	13	13
BIOMASA MAX (g/L)	0,924	0,547
r^2	0,949	0,940

Los parámetros cinéticos hallados en este bioensayo indican (Tabla 8) que el ensayo **M1** presentó una mayor velocidad de crecimiento comparado con **C**, lo que evidenció que la unión de los valores mas favorables para las variables (pH y agitación) influyeron positivamente en el aumento de la biomasa de **D. salina** maximizando su crecimiento. Lo anterior se confirma con el tiempo de duplicación, que en el caso de **M1** fue menor que en el control, indicando que las condiciones de crecimiento para **D. salina** fueron mejor en **M1** (Anexo 10).

Finalmente es posible decir que la agitación de 75 rpm y el pH de 8.0 pueden ser consideradas como condiciones adecuadas de crecimiento para **D. salina** en cultivos a escala de laboratorio, ya que la biomasa se ve claramente influenciada cuando se unen estos dos factores.

5. CONCLUSIONES

- La agitación más adecuada para el crecimiento de ***D. salina*** es de 75 rpm.
- El pH mas adecuado para el crecimiento de la microalga fue de 8.0.
- La unión de los valores mas favorables para los factores de crecimiento: agitación 75 rpm y pH de 8.0, promueven el aumento acelerado de la biomasa.
- La agitación y el pH son factores que influyen de manera notoria en la producción de ***Dunadiella salina***.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar la agitación con un factor de estrés para generar en la microalga una mayor producción de pigmentos.
- Se sugiere trabajar con otros medios de cultivo, donde su clase de salinidad venga de otras fuentes, como los desechos industriales o los desechos agrícolas.

7. BIBLIOGRAFIA

- **American Public Health Association, 1998.** Standard Methods for Examination of water and Wastewater. New York: American Public Health Association.
- **Andreo, c. y Vallejos, R. 1984.** Fotosíntesis. Organización de los Estados Americanos. Washington pg 35-40.
- **Baas-Becking, L. G. M. 1930.** observations on *Dunadiella viridis* teodoresco. Contributions in Marine Science. Stanford University. pp.102-14.
- **Bauernfeind, J. C. 1981.** Natural Food colors. En: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Technological and nutritional applications. J. C. Bauernfeind (Ed.). Academia press. New Cork. pp 32-36.
- **Ben – Amozt , A. 1993.** Production of β -carotene and vitamins by the tolerant alga *Dunadiella*. In: Marine Biotechnology : Pharmaceutical and bioactive natural products. Atawway, D. & Zaborsky O. (Ed). Plenum press. New York , USA. pp. 411–417.
- **Ben – Amozt , A., & Avron, M. 1981.** Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunadiella* : one model system for biosolar energy conversión. Trenes Biochem Sci. 6:297-299.
- **Bold, H. 1985.** Introduction to the algae. Structure and reproduction. Prentice Hall. 5th ed. New Jersey. USA. pp 78-81.
- **Borowitzka, M. A., post, F. & Borowitzka, L. J. 1982.** The life cycle of *Dunadiella salina*. Australasian Society for Phycology and aquatic Botany, Annual Meeting Abstracts. pp 6.
- **Borowitzka, M., & Borowitzka, L. 1988.** *Dunadiella*. In: Microalgal Bitechology. Borowitzka, M & Borowitzka, L (Ed). Cambridge University Press. Cambridge. UK. pp 27-58.
- **Borowitzka, M. and Borowitzka, L. 1992.** Micro-algal biotechnology. Edited by Michael A. Borowitzka and Lesley J. Borowitzka. Cambridge University Press. pp 27-51.
- **Borowitzka, M. 1992.** Evaluación de sistemas de cultivo // estructura de costes. Journal of Applied Phycology 4:267-279
- **Borowitzka, W.1999.** In *Chemicals from Microalgae*, Z.Cohen ed. (Taylor y Francis Ltd).
- **Brow, F.F., Sussman , I., Avron, M. & Degani, H. 1982.** NMR studies of glycerol permeability in lipid vesicles, erythrocytes and the alga, *Dunadiella*. Biochimica et Biophysica Acta. 690:165-73.
- **Cifuentes, A.,Gonzalez, M., y Parra, O. 1995.** Métodos para el cultivo de microalgas de ambientes hipersalinos. En: Manual de

Métodos Fisiológicos. Alveal, K., Ferrario, F., Oliveira, E. & Sar E.(Ed.). Universidad de Concepción. Concepción. Chile. pg. 251-274.

- **Chapman, V. 1969.** The algae. MacMillan and Company Limited. London. Great Britain. UK. pp 250-253.
- **Charlotte, S., & Young, A. 2000.** Exposure to low Irradiances Favors the síntesis of 9-cis β , β -Carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). Plant Physiol. 122:609-618.
- **De la Noue, T. 1988.** An improved cathode for the measurement of photosyntetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New phytol. 71 201-25.
- **Duque, S. 1988.** Estudio del Fitoplancton durante las primeras etapas de llenado del embalse de la central hidroeléctrica de Betania. Huila Colombia. pp 152-165.
- **Droková, I. G & Dovhorouka, S. I. 1966.** Carotene-formation in *Dunaliella salina*. Teodoresco Ander the effect of some carbon sources. Ukranskya Botanichnya Zhournal. 21:59-62.
- **Eddy, B.P. 1956.** The suitability of some algae for mass cultivation for food, with special reference to *Dunaliella salina*. Journal of Experimental Botany. 7:21-7.
- **Eliach, J. Bourges, G. Duré, L. Medina, M. Lara, M. 2004.** Incidencia de la agitación en el crecimiento microalgal en biorreactores. Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura. Universidad Nacional de Rosario. Buenos aires. Argentina
- **Ettl, H. 1983.** Taxonomische Bemerkungen zu den Phytomonadina. Nova Hedwigia. 35:731-736.
- **Fernández-Sevilla, Guerrero, M. Molina-Grima, E. Acién-Fernández, J.A. Sánchez and Whitton, B. 2003.** Algal Biotechnology: A sea of opportunities. J. Appl. Phycol, 15
- **Gibor, A. 1956.** The culture of brine algae. Biological Bulletin. Woods Hole. 3:223-9.
- **Ginzburg, M. & Ginzburg, B. Z. 1981.** Interrelationships of light, temperature, sodium chloride and carbon source in growth of halotolerant and halophilic strains of *Dunaliella*. British Phycological Journal. 16:313-24.
- **Grant, B. R. 1968.** The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite and assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. Journal of General Microbiology. 54:327-36.
- **Fritsch, F. 1965.** The structure and reproduction of the algae. Cambridge University Press. London. Great Britain. pp 22-24.
- **Hernández, L. Quintana, M. Morris, H. 2000.** Obtención de glicerol a partir de la Microalga *Dunaliella Salina*. Rev Cubana Farm, 34(2):134-7.

- **Johnson, M.K., Jonson, E. J., McElroy, R. D., Speer, H. L. & Bruff, B. S. 1968.** Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of bacteriology. 95:1461-8.
- **Katz, A. Bental, M. Degani, H. Avron, M. 1991.** In Vivo pH regulation by a Na⁺/H⁺ antiporter in the Halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol. May; 96(1):110–115.
- **Kosmakova, V. E. & Prozumenshchikova, L. T. 1993.** Growth and biochemical composition of the algae *Dunaliella salina* and *Platymonas viridis* fed on organic and inorganic forms of nitrogen. Biologiya Morya. 1:42-6.
- **Lancheros, A. 2003.** Aislamiento y cultivo bajo condiciones de laboratorio de una cepa de *Dunaliella salina* (clorofita) de Manaure, Guajira. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Química. Bogotá. Colombia.
- **Latorella, A. H. & Vadas, R. L. 1973.** Salinity adaptation by *Dunaliella tertiolecta*. I. Increases in carbonic anhydrase activity and evidence for light-dependent Na⁺/H⁺ exchange. Journal of Phycology. 9:211-14.
- **Loeblich, L. A. 1972.** Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina*. Ph.D. Thesis. University of California. San Diego.
- **Mancera, J. 1988.** Contribución al estudio de la microalga de salmuera *Dunaliella salina* (Dunal), Teodoresco, 1905 (Chlorophyceae: volvocales) y su comportamiento en cultivos experimentales. Tesis maestría. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Bogotá. pg 162.
- **Mashall, D. 1991.** Biología de las algas: enfoque fisiológico. 1^a ed. Noriega Editores. Editorial Limusa. México D.F. pg 74-76.
- **Massyuk, N. P. 1965b.** Carbonate and bicarbonate as stimulators of growth and carotene accumulation in *Dunaliella salina* Teod. Ukransky Botany Zhurnal. 22:18-22.
- **Massyuk, N. P. 1966.** Mass culture of the carotene-bearing alga *Dunaliella salina* Teod. Ukransky Botany Zhurnal. 23:12-19.
- **Massyuk, N. P. & Yurchenko, V. V. 1962.** Effect of hydrogen ion concentration on *Dunaliella salina* Teod. Ukransky Botany Zhurnal. 19:91-5.
- **Mil'ko, N.P. 1962.** Study of the requirements of two *Dunaliella sp.* In mineral and organic components of the medium. Moscow University Vestnik. Biologiya. 6:21-3.
- **Metting, B. 1987.** Dynamics of wet and dry aggregate stability from a three-year microalgal soil conditioning experiment in the field. Soil Science. 143:139-43.

- **Montgomery, D. 1991.** Diseño y analisis de experimentos. Grupo editorial Iberoamericana. Mexico D.F. pp 589.
- **Parsons, T.R., Stephens, K. & Strickland, J.D.H. 1961.** On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankter. Journal of the Fisheries Research Board. Canada. 18:1001-16.
- **Pedroza, A. 2003.** Manual de biotecnología. Pontificia Universidad Javeriana. Editorial Javegraf. Bogotá. Colombia.
- **Rice, J. 1995.** Mathematical statistics and data analysis. Second Edition. Duxbury press.
- **Richmond A, Lichtenberg E, Sthal B, Vonshak A. 1990.** Quantitative assessment of the major limitation on productivity of *Spirulina Platensis* in open raceways. *J.Appl. Phycol*, 2, 195.
- **Roa, Luis Alfonso. 1991.** Analisis fisicoquímico de aguas. Manual de procedimientos. Ministerio de salud. Instituto nacional de salud. Santa Fé de Bogotá, D.C. Colombia. pg. 9-11.
- **Rowan, K. 1989.** Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press. New York. pp 113-159.
- **Salguero, A. Leon, R. Mariotti, A. De La Morena, Cb. Vega, Jm. Vilchez, C. 2005.** UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:506-511.
- **Takur, A. and Kumar, A. 2001.** Effect of pH, temperature, salinity and nitrogen concentration on the growth and carotenoid content of *dunadiella salina*. school of biotechnology, Banaras Hindu University Varanasi, India.
- **Thomas, P. & Dumas, R. 1970.** Contribution a l'étude de *Dunadiella salina* en culture bactériennes: nutrition et composition. *Tethys*. 2:19-28
- **Van Auken, O. W. & McNulty, I. B. 1973.** The effect of environmental factors on the growth of halophilic species of algae. *Biological Bulletin, Woods Hole*. 145:210-22.
- **Wegmann, K. & Metzner, H. 1971.** Synchronization of *Dunadiella salina* cultures. *Archivfür Microbiologie*. 78:360-7
- **Wetzel, R. 2001.** Limnology: Lake and River ecosystems. Academic Press. California. pp 153-159.

RECURSOS ELECTRONICOS

Programa estadístico, (en línea). www.r-project.org.com (Acceso 2 octubre de 2006).

Célula de *Dunaliella salina*, (en línea). www.icman.csic.es/servic/servCmicroalgas_en.htm (Acceso 4 Marzo de 2006).

Estructuras de *D. salina*, (en línea). www.stilweb.com/engstilbio.htm (Acceso 4 Marzo de 2006).

Ciclo sexual de *D. salina*, (en línea). www.salinesystems.org/content/1/1/2/figure/F4 (Acceso 4 Marzo de 2006).

Glóbulos de β caroteno dispersos en el cloroplasto de *D. salina*, (en línea) www.adelaide.edu.au/.../image_analysis.html (Acceso 06 Marzo de 2006).

Organic K-Biogreen, (en línea). www.k-biogreen.at/ (Acceso 06 de Marzo de 2006).

Beta Carotene, (en línea). www.zellersnaturalhealth.com/Products/Images/ (Acceso 06 de Marzo de 2006).

ANEXOS

Anexo 1

Médo de cultivo Johnson's modificado por Borowitzka (J/1)

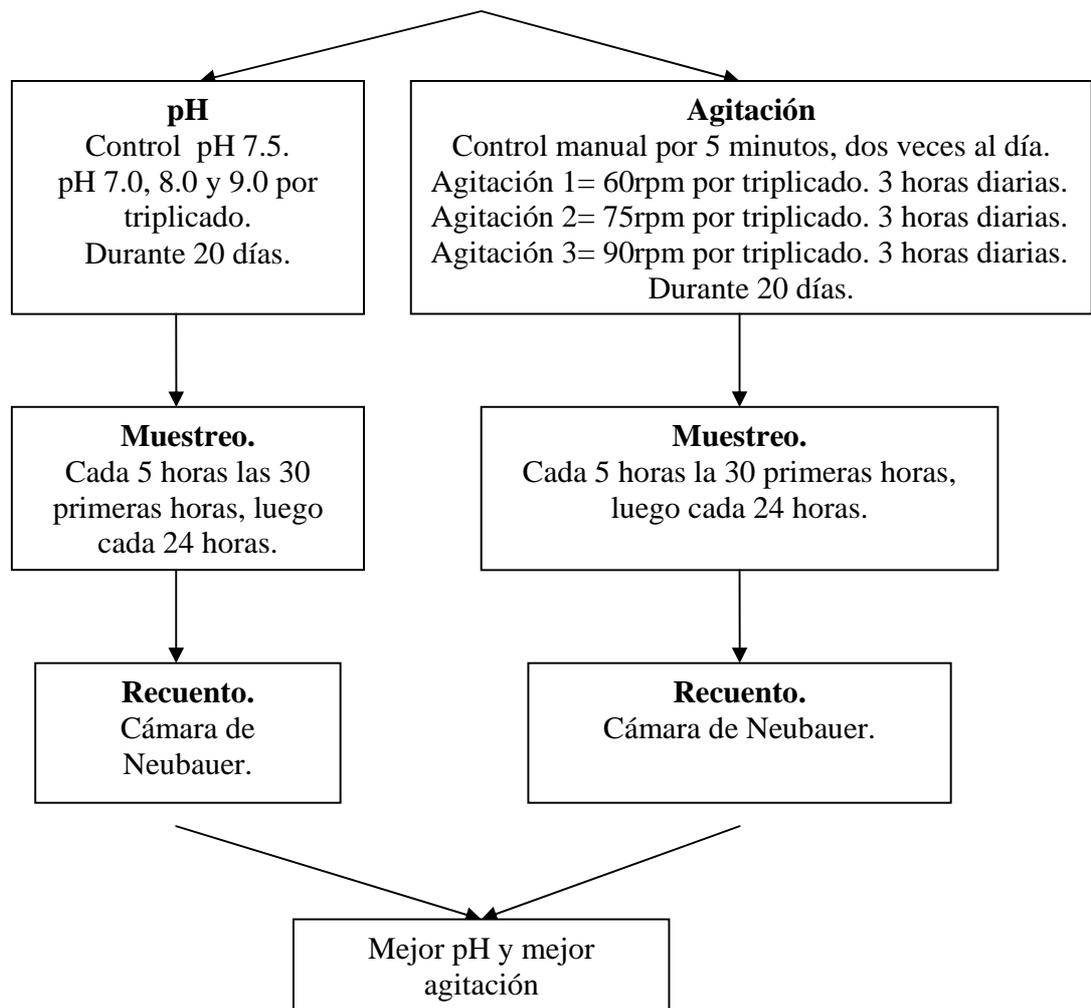
- A 980 mL de agua destilada añadir:

REACTIVO	CANTIDAD
NaCl	3 g 0.5 M
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1.5 g
Mg SO ₄ * 7 H ₂ O	0.5 g
KCl	0.2 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.2 g
KNO ₃	1.0 g
NaHCO ₃	0.043 g
KH ₂ PO ₄	0.035 g
Solución de hierro	10 mL
Solución de elementos en trazas	10 mL
H ₃ PO ₃	61.0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	38.0 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	6.0 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	5.1 mg
ZnCl	4.1 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	4.1 mg

- El medio debe ser ajustado a pH 7.5 con HCl
- Esterilizar en autoclave.

Anexo 2
Metodología. Diagrama de flujo.

Mantenimiento del inoculo
Durante 10 días a T 25°C, Luz 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, agitación manual 2
veces al día y pH 7.5



Anexo 3

AGITACION		C1	C2	C3	A1'1	A1'2	A1'3	A2'1	A2'2	A2'3	A3'1	A3'2	A3'3
HORA 0	jueves	11	10	11	12	12	13	14	14	14	12	15	13
HORA 5	jueves	11	10	11	12	12	13	15	15	15	15	15	13
HORA 10	jueves	12	11	12	13	12	14	16	16	16	15	15	14
HORA 15	jueves	13	12	13	13	13	14	17	17	16	16	16	15
HORA 20	viernes	14	12	13	14	13	15	18	18	16	17	16	15
HORA 25	viernes	14	13	15	15	14	16	19	18	19	17	17	15
HORA 30	viernes	15	14	15	15	15	16	20	18	20	18	17	16
DIA 3	sabado	16	17	16	16	16	16	25	24	23	18	17	16
DIA 4	domingo	18	18	17	18	18	17	27	26	25	18	17	16
DIA 5	lunes	19	20	19	19	19	19	29	30	28	19	21	19
DIA 6	martes	21	21	20	22	21	21	32	34	31	22	22	20
DIA 7	miercoles	22	21	21	24	24	24	34	36	33	24	24	20
DIA 8	jueves	22	23	22	26	26	26	35	36	34	26	26	24
DIA 9	viernes	24	26	23	28	28	28	37	37	36	26	27	26
DIA 10	sabados	26	28	25	30	31	30	40	41	42	29	29	28
DIA 11	domingo	27	29	26	31	33	33	41	43	43	31	30	30
DIA 12	lunes	28	30	28	33	34	34	46	45	44	33	33	32
DIA 13	martes	30	32	30	35	36	35	47	46	48	34	35	34
DIA 14	miercoles	32	32	32	35	36	35	44	45	43	34	35	34
DIA 15	jueves	31	31	32	34	35	36	43	45	43	36	35	32
DIA 16	viernes	31	29	30	33	35	37	42	46	41	36	33	33
DIA 17	sabados	31	29	29	35	34	37	42	44	42	37	34	34
DIA 18	domingo	30	28	29	35	34	37	43	44	42	38	34	35
DIA 19	lunes	29	28	29	36	36	37	43	44	42	38	36	35
DIA 20	martes	28	28	28	27	28	30	41	42	39	29	31	30
DIA 21	miercoles	28	27	28	26	27	28	38	40	38	27	29	28
DIA 22	jueves	26	25	27	25	26	27	35	38	36	25	27	25
DIA 23	viernes	25	23	25	23	23	25	33	36	35	23	26	23

		P1	P2	P3	H1'1	H1'2	H1'3	H2'1	H2'2	H2'3	H3'1	H3'2	H3'3
PH													
HORA 0	jueves	12	13	14	11	10	10	15	15	14	11	10	11
HORA 5	jueves	12	13	14	11	11	11	15	15	14	12	12	11
HORA 10	jueves	12	13	16	12	12	11	16	17	16	12	12	13
HORA 15	jueves	13	14	16	14	14	12	16	18	17	12	13	13
HORA 20	viernes	13	15	17	16	15	14	17	19	17	13	14	14
HORA 25	viernes	16	16	18	18	15	15	18	19	19	14	14	14
HORA 30	viernes	17	17	19	18	15	16	18	21	20	14	14	15
DIA 3	sábado	18	18	19	19	16	15	21	23	24	15	16	17
DIA 4	domingo	21	18	19	20	17	18	23	26	28	17	17	18
DIA 5	lunes	22	21	21	20	19	19	25	28	33	18	18	19
DIA 6	martes	23	22	22	21	21	20	28	32	34	21	18	19
DIA 7	miércoles	24	26	25	21	22	20	31	34	36	20	19	20
DIA 8	jueves	26	28	26	21	22	20	33	36	37	21	20	20
DIA 9	viernes	27	30	29	21	23	21	36	38	39	22	21	21
DIA 10	sábado	29	32	31	23	25	23	36	39	39	23	20	22
DIA 11	domingo	32	34	32	26	27	24	38	41	40	24	21	23
DIA 12	lunes	34	35	34	28	29	26	40	40	41	24	23	24
DIA 13	martes	34	35	34	33	31	29	40	40	42	25	25	25
DIA 14	miércoles	34	35	34	33	31	29	40	39	40	25	24	25
DIA 15	jueves	34	34	34	32	30	28	40	38	40	25	24	24
DIA 16	viernes	33	32	33	32	28	28	39	37	38	24	23	23
DIA 17	sábado	31	31	32	27	26	26	36	35	37	23	22	21
DIA 18	domingo	30	30	30	27	26	22	34	33	37	23	21	21
DIA 19	lunes	28	29	29	26	25	21	32	33	36	22	21	20
DIA 20	martes	27	28	29	26	25	21	31	33	33	22	20	20
DIA 21	miércoles	26	26	28	25	24	20	29	31	31	21	20	19
DIA 22	jueves	24	23	25	23	22	20	26	27	30	20	19	18
DIA 23	viernes	21	22	22	21	20	19	23	24	29	19	17	16

Anexo 4

Regresión curva de peso seco para *D. salina*

Estadísticas de regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0,958110457							
Coefficiente de determinación R ²	0,917975648							
R ²	0,667975648							
Error típico	1,289582965							
Observaciones	5							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad		Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	74,4469511	74,4469511	44,7660052	0,00681053			
Residuos	4	6,6520969	1,663024225					
Total	5	81,099048						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico T	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Variable X 1	6,19E-06	9,26E-07	6,690740259	0,00259535	3,62E-06	8,76E-06	3,62E-06	8,76E-06
Análisis de los residuales								
Observación	Pronóstico para Y	Residuos						
1	1,393563534	1,19843847						
2	1,981957026	1,92804297						
3	3,685201345	0,33279866						
4	4,304562915	0,08743709						
5	6,038775313	-1,17477531						

Anexo 5

R : Copyright 2005, The R Foundation for Statistical Computing
Version 2.2.1 (2005-12-20 r36812)
ISBN 3-900051-07-0

R is free software and comes with ABSOLUTELY NO WARRANTY.
You are welcome to redistribute it under certain conditions.
Type 'license()' or 'licence()' for distribution details.

R is a collaborative project with many contributors.
Type 'contributors()' for more information and
'citation()' on how to cite R or R packages in publications.

Type 'demo()' for some demos, 'help()' for on-line help, or
'help.start()' for an HTML browser interface to help.
Type 'q()' to quit R.

[Previously saved workspace restored]

```
> CELLTODAS<-read.table("H:/agitacion.txt",header=TRUE)
> attach(CELLTODAS)
> ANOVACELLTODAS<-aov(NCELL~DIA+AGITACION)
> summary(ANOVACELLTODAS)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
DIA      20 8262.1   413.1  177.91 < 2.2e-16 ***
AGITACION  11 5732.9   521.2  224.45 < 2.2e-16 ***
Residuals 220  510.8     2.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukeyHSD(ANOVACELLTODAS,"AGITACION")
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level
```

Fit: aov(formula = NCELL ~ DIA + AGITACION)

\$AGITACION

	diff	lwr	upr	p adj
A1'2-A1'1	0.42857143	-1.1250148	1.98215763	0.9989586
A1'3-A1'1	1.00000000	-0.5535862	2.55358621	0.6044222
A2'1-A1'1	9.80952381	8.2559376	11.36311002	0.0000000
A2'2-A1'1	11.00000000	9.4464138	12.55358621	0.0000000
A2'3-A1'1	9.38095238	7.8273662	10.93453859	0.0000000
A3'1-A1'1	0.57142857	-0.9821576	2.12501478	0.9873016

A3'2-A1'1	0.47619048	-1.0773957	2.02977668	0.9972929
A3'3-A1'1	-0.80952381	-2.3631100	0.74406240	0.8565541
C1-A1'1	-2.23809524	-3.7916814	-0.68450903	0.0002181
C2-A1'1	-2.19047619	-3.7440624	-0.63688998	0.0003393
C3-A1'1	-2.61904762	-4.1726338	-1.06546141	0.0000048
A1'3-A1'2	0.57142857	-0.9821576	2.12501478	0.9873016
A2'1-A1'2	9.38095238	7.8273662	10.93453859	0.0000000
A2'2-A1'2	10.57142857	9.0178424	12.12501478	0.0000000
A2'3-A1'2	8.95238095	7.3987947	10.50596716	0.0000000
A3'1-A1'2	0.14285714	-1.4107291	1.69644335	1.0000000
A3'2-A1'2	0.04761905	-1.5059672	1.60120525	1.0000000
A3'3-A1'2	-1.23809524	-2.7916814	0.31549097	0.2681500
C1-A1'2	-2.66666667	-4.2202529	-1.11308046	0.0000029
C2-A1'2	-2.61904762	-4.1726338	-1.06546141	0.0000048
C3-A1'2	-3.04761905	-4.6012053	-1.49403284	0.0000000
A2'1-A1'3	8.80952381	7.2559376	10.36311002	0.0000000
A2'2-A1'3	10.00000000	8.4464138	11.55358621	0.0000000
A2'3-A1'3	8.38095238	6.8273662	9.93453859	0.0000000
A3'1-A1'3	-0.42857143	-1.9821576	1.12501478	0.9989586
A3'2-A1'3	-0.52380952	-2.0773957	1.02977668	0.9938110
A3'3-A1'3	-1.80952381	-3.3631100	-0.25593760	0.0084119
C1-A1'3	-3.23809524	-4.7916814	-1.68450903	0.0000000
C2-A1'3	-3.19047619	-4.7440624	-1.63688998	0.0000000
C3-A1'3	-3.61904762	-5.1726338	-2.06546141	0.0000000
A2'2-A2'1	1.19047619	-0.3631100	2.74406240	0.3262041
A2'3-A2'1	-0.42857143	-1.9821576	1.12501478	0.9989586
A3'1-A2'1	-9.23809524	-10.7916814	-7.68450903	0.0000000
A3'2-A2'1	-9.33333333	-10.8869195	-7.77974713	0.0000000
A3'3-A2'1	-10.61904762	-12.1726338	-9.06546141	0.0000000
C1-A2'1	-12.04761905	-13.6012053	-10.49403284	0.0000000
C2-A2'1	-12.00000000	-13.5535862	-10.44641379	0.0000000
C3-A2'1	-12.42857143	-13.9821576	-10.87498522	0.0000000
A2'3-A2'2	-1.61904762	-3.1726338	-0.06546141	0.0327415
A3'1-A2'2	-10.42857143	-11.9821576	-8.87498522	0.0000000
A3'2-A2'2	-10.52380952	-12.0773957	-8.97022332	0.0000000
A3'3-A2'2	-11.80952381	-13.3631100	-10.25593760	0.0000000
C1-A2'2	-13.23809524	-14.7916814	-11.68450903	0.0000000
C2-A2'2	-13.19047619	-14.7440624	-11.63688998	0.0000000
C3-A2'2	-13.61904762	-15.1726338	-12.06546141	0.0000000
A3'1-A2'3	-8.80952381	-10.3631100	-7.25593760	0.0000000
A3'2-A2'3	-8.90476190	-10.4583481	-7.35117570	0.0000000
A3'3-A2'3	-10.19047619	-11.7440624	-8.63688998	0.0000000
C1-A2'3	-11.61904762	-13.1726338	-10.06546141	0.0000000
C2-A2'3	-11.57142857	-13.1250148	-10.01784237	0.0000000
C3-A2'3	-12.00000000	-13.5535862	-10.44641379	0.0000000

```

A3'2-A3'1 -0.09523810 -1.6488243 1.45834811 1.0000000
A3'3-A3'1 -1.38095238 -2.9345386 0.17263383 0.1355750
C1-A3'1 -2.80952381 -4.3631100 -1.25593760 0.0000006
C2-A3'1 -2.76190476 -4.3154910 -1.20831856 0.0000010
C3-A3'1 -3.19047619 -4.7440624 -1.63688998 0.0000000
A3'3-A3'2 -1.28571429 -2.8393005 0.26787192 0.2169293
C1-A3'2 -2.71428571 -4.2678719 -1.16069951 0.0000017
C2-A3'2 -2.66666667 -4.2202529 -1.11308046 0.0000029
C3-A3'2 -3.09523810 -4.6488243 -1.54165189 0.0000000
C1-A3'3 -1.42857143 -2.9821576 0.12501478 0.1048414
C2-A3'3 -1.38095238 -2.9345386 0.17263383 0.1355750
C3-A3'3 -1.80952381 -3.3631100 -0.25593760 0.0084119
C2-C1 0.04761905 -1.5059672 1.60120525 1.0000000
C3-C1 -0.38095238 -1.9345386 1.17263383 0.9996571
C3-C2 -0.42857143 -1.9821576 1.12501478 0.9989586

```

```

> tapply(NCELL,AGITACION,mean)
  A1'1  A1'2  A1'3  A2'1  A2'2  A2'3  A3'1  A3'2
28.14286 28.57143 29.14286 37.95238 39.14286 37.52381 28.71429
28.61905
  A3'3  C1  C2  C3
27.33333 25.90476 25.95238 25.52381

```

```

> tapply(NCELL,AGITACION,sd)
  A1'1  A1'2  A1'3  A2'1  A2'2  A2'3  A3'1  A3'2
6.239277 6.515915 6.901346 6.232786 6.490653 6.637914 6.641859
5.886223
  A3'3  C1  C2  C3
6.374428 4.689400 4.510834 4.781412

```

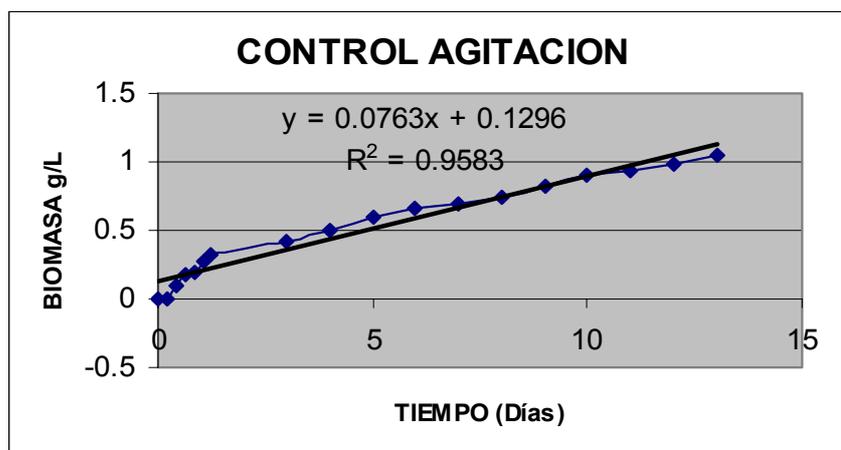
Anexo 6

CONCENTRACION CELL/mL		Agitación		
DIAS	C	A1	A2	A3
0	26666.6667	30833,3333	35000	33333.3333
0.20833333	26666.6667	30833,3333	37500	35833.3333
0.41666667	29166.6667	32500	40000	36666.6667
0.625	31666.6667	33333,3333	41666,6667	39166.6667
0.83333333	32500	35000	43333,3333	40000
1.04166667	35000	37500	46666,6667	40833.3333
1.25	36666.6667	38333,3333	48333,3333	42500
3	40833.3333	40000	60000	42500
4	44166.6667	44166,6667	65000	42500
5	48333.3333	47500	72500	49166.6667
6	51666.6667	53333,3333	80833,3333	53333.3333
7	53333.3333	60000	85833,3333	56666.6667
8	55833.3333	65000	87500	63333.3333
9	60833.3333	70000	91666,6667	65833.3333
10	65833.3333	75833,3333	102500	71666.6667
11	68333.3333	80833,3333	105833,333	75833.3333
12	71666.6667	84166,6667	112500	81666.6667
13	76666.6667	88333,3333	117500	85833.3333
14	80000	88333,3333	110000	85833.3333
15	78333.3333	87500	109166,667	85833.3333
16	75000	87500	107500	85000
17	74166.6667	88333,3333	106666,667	87500
18	72500	88333,3333	107500	89166.6667
19	71666.6667	90833,3333	107500	90833.3333
20	70000	70833,3333	101666,667	75000
21	69166.6667	67500	96666,6667	70000
22	65000	65000	90833,3333	64166.6667
23	60833.3333	59166,6667	86666,6667	60000

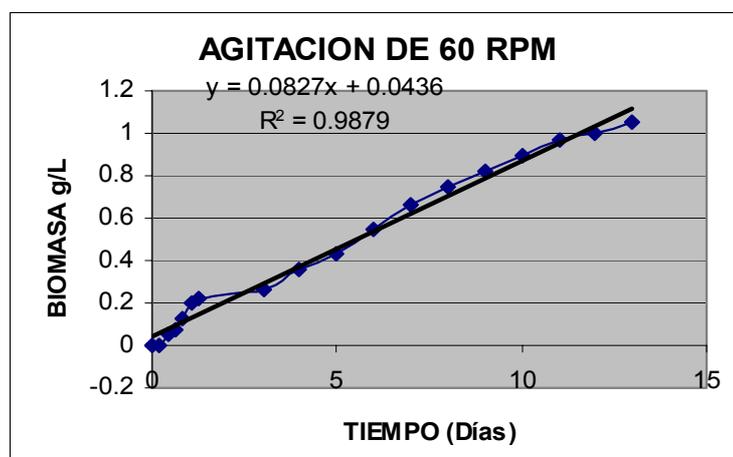
PESO SECO g/L Agitación

DIAS	C	A1	A2	A3
0	0.16533333	0.19116667	0.217	0.20666667
0.20833333	0.16533333	0.19116667	0.2325	0.22216667
0.41666667	0.18083333	0.2015	0.248	0.22733333
0.625	0.19633333	0.20666667	0.25833333	0.24283333
0.83333333	0.2015	0.217	0.26866667	0.248
1.04166667	0.217	0.2325	0.28933333	0.25316667
1.25	0.22733333	0.23766667	0.29966667	0.2635
3	0.25316667	0.248	0.372	0.2635
4	0.27383333	0.27383333	0.403	0.2635
5	0.29966667	0.2945	0.4495	0.30483333
6	0.32033333	0.33066667	0.50116667	0.33066667
7	0.33066667	0.372	0.53216667	0.35133333
8	0.34616667	0.403	0.5425	0.39266667
9	0.37716667	0.434	0.56833333	0.40816667
10	0.40816667	0.47016667	0.6355	0.44433333
11	0.42366667	0.50116667	0.65616667	0.47016667
12	0.44433333	0.52183333	0.6975	0.50633333
13	0.47533333	0.54766667	0.7285	0.53216667
14	0.496	0.54766667	0.682	0.53216667
15	0.48566667	0.5425	0.67683333	0.53216667
16	0.465	0.5425	0.6665	0.527
17	0.45983333	0.54766667	0.66133333	0.5425
18	0.4495	0.54766667	0.6665	0.55283333
19	0.44433333	0.56316667	0.6665	0.56316667
20	0.434	0.43916667	0.63033333	0.465
21	0.42883333	0.4185	0.59933333	0.434
22	0.403	0.403	0.56316667	0.39783333
23	0.37716667	0.36683333	0.53733333	0.372

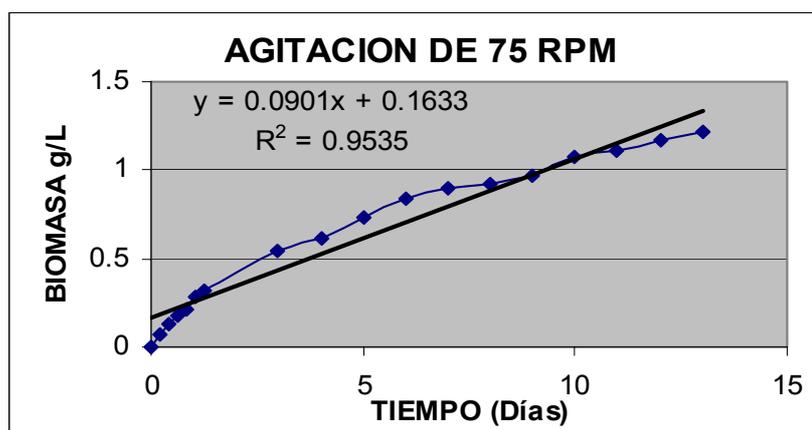
UX PARA CONTROL DE LA AGITACION			
TIEMPO	X/X0	ln	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0
0.20833333	1	0	0.43013836
0.41666667	1.09375	0.08961216	0.39474287
0.625	1.1875	0.17185026	0.12468233
0.83333333	1.21875	0.19782574	0.35571827
1.04166667	1.3125	0.27193372	0.22329608
1.25	1.375	0.31845373	0.06150324
3	1.53125	0.4260844	0.07847162
4	1.65625	0.50455601	0.0901511
5	1.8125	0.59470711	0.06669137
6	1.9375	0.66139848	0.0317487
7	2	0.69314718	0.04580954
8	2.09375	0.73895672	0.08576682
9	2.28125	0.82472354	0.07898841
10	2.46875	0.90371195	0.03727139
11	2.5625	0.94098334	0.04762805
12	2.6875	0.98861139	0.06744128
13	2.875	1.05605267	



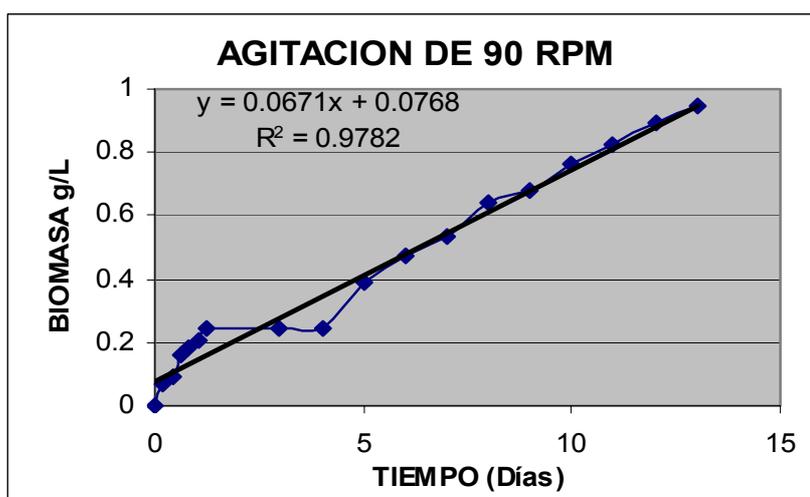
	UX PARA AGITACION DE 60 RPM		
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0
0.20833333	1	0	0.25268992
0.41666667	1.05405405	0.05264373	0.12152548
0.625	1.08108108	0.07796154	0.23419279
0.83333333	1.13513514	0.12675171	0.33116578
1.04166667	1.21621622	0.19574458	0.10549875
1.25	1.24324324	0.21772348	0.02431978
3	1.2972973	0.2602831	0.0990909
4	1.43243243	0.359374	0.07275935
5	1.54054054	0.43213336	0.11583182
6	1.72972973	0.54796517	0.11778304
7	1.94594595	0.66574821	0.08004271
8	2.10810811	0.74579091	0.07410797
9	2.27027027	0.81989889	0.08004271
10	2.45945946	0.89994159	0.06385147
11	2.62162162	0.96379307	0.04040954
12	2.72972973	1.0042026	0.04831858
13	2.86486486	1.05252118	



	UX PARA AGITACION DE 75 RPM		
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0.33116578
0.20833333	1.07142857	0.06899287	0.3097849
0.41666667	1.14285714	0.13353139	0.19594557
0.625	1.19047619	0.17435339	0.18825942
0.83333333	1.23809524	0.2135741	0.35571827
1.04166667	1.33333333	0.28768207	0.16843834
1.25	1.38095238	0.32277339	0.12355606
3	1.71428571	0.5389965	0.08004271
4	1.85714286	0.61903921	0.10919929
5	2.07142857	0.7282385	0.10880286
6	2.30952381	0.83704136	0.06001801
7	2.45238095	0.89705937	0.01923136
8	2.5	0.91629073	0.04652002
9	2.61904762	0.96281075	0.11170399
10	2.92857143	1.07451474	0.03200273
11	3.02380952	1.10651747	0.06108769
12	3.21428571	1.16760516	0.04348511
13	3.35714286	1.21109027	



	UX PARA AGITACION DE 90 RPM		
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0.34713918
0.20833333	1.075	0.07232066	0.11034969
0.41666667	1.1	0.09531018	0.31659825
0.625	1.175	0.16126815	0.10105636
0.83333333	1.2	0.18232156	0.09897258
1.04166667	1.225	0.20294084	0.19202561
1.25	1.275	0.24294618	0
3	1.275	0.24294618	0
4	1.275	0.24294618	0.14571181
5	1.475	0.38865799	0.08134564
6	1.6	0.47000363	0.06062462
7	1.7	0.53062825	0.11122564
8	1.9	0.64185389	0.03871451
9	1.975	0.6805684	0.08489944
10	2.15	0.76546784	0.05651221
11	2.275	0.82198005	0.07410797
12	2.45	0.89608802	0.04976151
13	2.575	0.94584953	



Anexo 7

```
CELLTODAS<-read.table("H:/PH2.txt",header=TRUE)
> attach(CELLTODAS)
```

The following object(s) are masked from CELLTODAS (position 3) :

CELL DIA NCELL

```
> ANOVACELLTODAS<-aov(NCELL~DIA+PH)
> summary(ANOVACELLTODAS)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
DIA	20	4263.3	213.2	63.827	< 2.2e-16 ***
PH	11	6103.4	554.9	166.139	< 2.2e-16 ***
Residuals	220	734.7	3.3		

```
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> TukeyHSD(ANOVACELLTODAS,"PH")
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = NCELL ~ DIA + PH)
```

\$PH

	diff	lwr	upr	p adj
H1'2-H1'1	-0.76190476	-2.6250867	1.10127721	0.9711371
H1'3-H1'1	-2.66666667	-4.5298486	-0.80348469	0.0002498
H2'1-H1'1	7.42857143	5.5653895	9.29175340	0.0000000
H2'2-H1'1	8.66666667	6.8034847	10.52984864	0.0000000
H2'3-H1'1	10.42857143	8.5653895	12.29175340	0.0000000
H3'1-H1'1	-3.38095238	-5.2441344	-1.51777041	0.0000005
H3'2-H1'1	-4.57142857	-6.4346105	-2.70824660	0.0000000
H3'3-H1'1	-4.28571429	-6.1488963	-2.42253231	0.0000000
P1-H1'1	2.52380952	0.6606275	4.38699150	0.0007378
P2-H1'1	3.04761905	1.1844371	4.91080102	0.0000109
P3-H1'1	3.00000000	1.1368180	4.86318198	0.0000164
H1'3-H1'2	-1.90476190	-3.7679439	-0.04157993	0.0400736
H2'1-H1'2	8.19047619	6.3272942	10.05365817	0.0000000
H2'2-H1'2	9.42857143	7.5653895	11.29175340	0.0000000
H2'3-H1'2	11.19047619	9.3272942	13.05365817	0.0000000
H3'1-H1'2	-2.61904762	-4.4822296	-0.75586564	0.0003606
H3'2-H1'2	-3.80952381	-5.6727058	-1.94634183	0.0000000
H3'3-H1'2	-3.52380952	-5.3869915	-1.66062755	0.0000001

P1-H1'2 3.28571429 1.4225323 5.14889626 0.0000013
P2-H1'2 3.80952381 1.9463418 5.67270578 0.0000000
P3-H1'2 3.76190476 1.8987228 5.62508674 0.0000000
H2'1-H1'3 10.09523810 8.2320561 11.95842007 0.0000000
H2'2-H1'3 11.33333333 9.4701514 13.19651531 0.0000000
H2'3-H1'3 13.09523810 11.2320561 14.95842007 0.0000000
H3'1-H1'3 -0.71428571 -2.5774677 1.14889626 0.9823631
H3'2-H1'3 -1.90476190 -3.7679439 -0.04157993 0.0400736
H3'3-H1'3 -1.61904762 -3.4822296 0.24413436 0.1589785
P1-H1'3 5.19047619 3.3272942 7.05365817 0.0000000
P2-H1'3 5.71428571 3.8511037 7.57746769 0.0000000
P3-H1'3 5.66666667 3.8034847 7.52984864 0.0000000
H2'2-H2'1 1.23809524 -0.6250867 3.10127721 0.5548508
H2'3-H2'1 3.00000000 1.1368180 4.86318198 0.0000164
H3'1-H2'1 -10.80952381 -12.6727058 -8.94634183 0.0000000
H3'2-H2'1 -12.00000000 -13.8631820 -10.13681802 0.0000000
H3'3-H2'1 -11.71428571 -13.5774677 -9.85110374 0.0000000
P1-H2'1 -4.90476190 -6.7679439 -3.04157993 0.0000000
P2-H2'1 -4.38095238 -6.2441344 -2.51777041 0.0000000
P3-H2'1 -4.42857143 -6.2917534 -2.56538945 0.0000000
H2'3-H2'2 1.76190476 -0.1012772 3.62508674 0.0832925
H3'1-H2'2 -12.04761905 -13.9108010 -10.18443707 0.0000000
H3'2-H2'2 -13.23809524 -15.1012772 -11.37491326 0.0000000
H3'3-H2'2 -12.95238095 -14.8155629 -11.08919898 0.0000000
P1-H2'2 -6.14285714 -8.0060391 -4.27967517 0.0000000
P2-H2'2 -5.61904762 -7.4822296 -3.75586564 0.0000000
P3-H2'2 -5.66666667 -7.5298486 -3.80348469 0.0000000
H3'1-H2'3 -13.80952381 -15.6727058 -11.94634183 0.0000000
H3'2-H2'3 -15.00000000 -16.8631820 -13.13681802 0.0000000
H3'3-H2'3 -14.71428571 -16.5774677 -12.85110374 0.0000000
P1-H2'3 -7.90476190 -9.7679439 -6.04157993 0.0000000
P2-H2'3 -7.38095238 -9.2441344 -5.51777041 0.0000000
P3-H2'3 -7.42857143 -9.2917534 -5.56538945 0.0000000
H3'2-H3'1 -1.19047619 -3.0536582 0.67270578 0.6155886
H3'3-H3'1 -0.90476190 -2.7679439 0.95842007 0.9059604
P1-H3'1 5.90476190 4.0415799 7.76794388 0.0000000
P2-H3'1 6.42857143 4.5653895 8.29175340 0.0000000
P3-H3'1 6.38095238 4.5177704 8.24413436 0.0000000
H3'3-H3'2 0.28571429 -1.5774677 2.14889626 0.9999970
P1-H3'2 7.09523810 5.2320561 8.95842007 0.0000000
P2-H3'2 7.61904762 5.7558656 9.48222959 0.0000000
P3-H3'2 7.57142857 5.7082466 9.43461055 0.0000000
P1-H3'3 6.80952381 4.9463418 8.67270578 0.0000000
P2-H3'3 7.33333333 5.4701514 9.19651531 0.0000000
P3-H3'3 7.28571429 5.4225323 9.14889626 0.0000000

```
P2-P1    0.52380952 -1.3393725  2.38699150 0.9987598
P3-P1    0.47619048 -1.3869915  2.33937245 0.9994908
P3-P2   -0.04761905 -1.9108010  1.81556293 1.0000000
```

```
> tapply(NCELL,PH,mean)
```

```
  H1'1  H1'2  H1'3  H2'1  H2'2  H2'3  H3'1  H3'2
25.00000 24.23810 22.33333 32.42857 33.66667 35.42857 21.61905 20.42857
  H3'3  P1  P2  P3
20.71429 27.52381 28.04762 28.00000
```

```
> tapply(NCELL,PH,sd)
```

```
  H1'1  H1'2  H1'3  H2'1  H2'2  H2'3  H3'1  H3'2
4.582576 4.300055 3.941235 6.265552 5.480268 4.832923 2.729033 2.481359
  H3'3  P1  P2  P3
2.571825 4.976134 5.581005 5.108816
```

Anexo 8

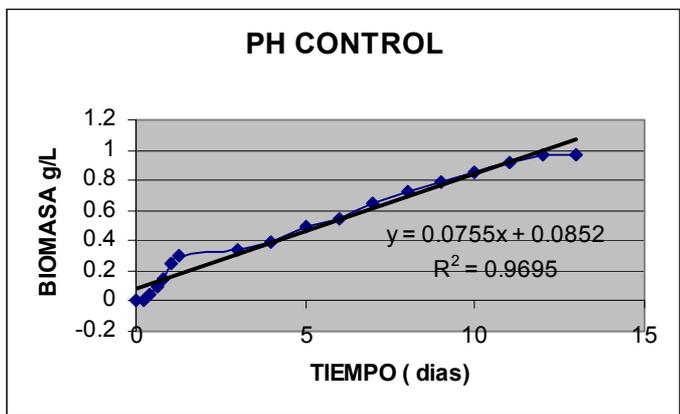
CONCENTRACION CELL/mL Ph

DIAS	P	H1	H2	H3
0	32500	25833.3333	36666.6667	26666.6667
0.20833333	32500	27500	36666.6667	29166.6667
0.41666667	34166.6667	29166.6667	40833.3333	30833.3333
0.625	35833.3333	33333.3333	42500	31666.6667
0.83333333	37500	37500	44166.6667	34166.6667
1.04166667	41666.6667	40000	46666.6667	35000
1.25	44166.6667	40833.3333	49166.6667	35833.3333
3	45833.3333	41666.6667	56666.6667	40000
4	48333.3333	45833.3333	64166.6667	43333.3333
5	53333.3333	48333.3333	71666.6667	45833.3333
6	55833.3333	51666.6667	78333.3333	48333.3333
7	62500	52500	84166.6667	49166.6667
8	66666.6667	52500	88333.3333	50833.3333
9	71666.6667	54166.6667	94166.6667	53333.3333
10	76666.6667	59166.6667	95000	54166.6667
11	81666.6667	64166.6667	99166.6667	56666.6667
12	85833.3333	69166.6667	100833.333	59166.6667
13	85833.3333	77500	101666.667	62500
14	85833.3333	77500	99166.6667	61666.6667
15	85000	75000	98333.3333	60833.3333
16	81666.6667	73333.3333	95000	58333.3333
17	78333.3333	65833.3333	90000	55000
18	75000	62500	86666.6667	54166.6667
19	71666.6667	60000	84166.6667	52500
20	70000	60000	80833.3333	51666.6667
21	66666.6667	57500	75833.3333	50000
22	60000	54166.6667	69166.6667	47500
23	54166.6667	50000	63333.3333	43333.3333

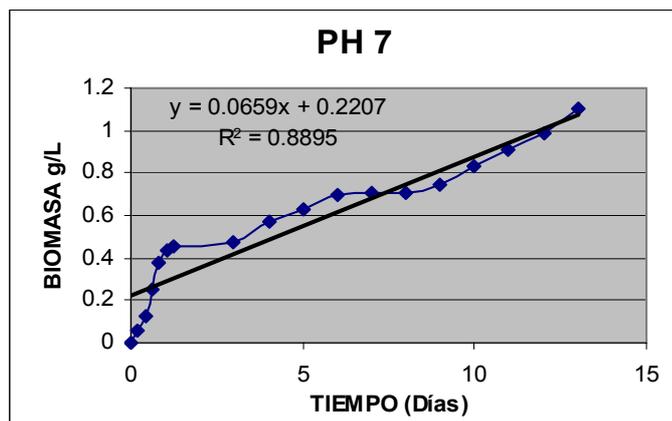
PESO SECO g/L PH

DIAS	P	H1	H2	H3
0	0.2015	0.16016667	0.22733333	0.16533333
0.20833333	0.2015	0.1705	0.22733333	0.18083333
0.41666667	0.21183333	0.18083333	0.25316667	0.19116667
0.625	0.22216667	0.20666667	0.2635	0.19633333
0.83333333	0.2325	0.2325	0.27383333	0.21183333
1.04166667	0.25833333	0.248	0.28933333	0.217
1.25	0.27383333	0.25316667	0.30483333	0.22216667
3	0.28416667	0.25833333	0.35133333	0.248
4	0.29966667	0.28416667	0.39783333	0.26866667
5	0.33066667	0.29966667	0.44433333	0.28416667
6	0.34616667	0.32033333	0.48566667	0.29966667
7	0.3875	0.3255	0.52183333	0.30483333
8	0.41333333	0.3255	0.54766667	0.31516667
9	0.44433333	0.33583333	0.58383333	0.33066667
10	0.47533333	0.36683333	0.589	0.33583333
11	0.50633333	0.39783333	0.61483333	0.35133333
12	0.53216667	0.42883333	0.62516667	0.36683333
13	0.53216667	0.4805	0.63033333	0.3875
14	0.53216667	0.4805	0.61483333	0.38233333
15	0.527	0.465	0.60966667	0.37716667
16	0.50633333	0.45466667	0.589	0.36166667
17	0.48566667	0.40816667	0.558	0.341
18	0.465	0.3875	0.53733333	0.33583333
19	0.44433333	0.372	0.52183333	0.3255
20	0.434	0.372	0.50116667	0.32033333
21	0.41333333	0.3565	0.47016667	0.31
22	0.372	0.33583333	0.42883333	0.2945
23	0.33583333	0.31	0.39266667	0.26866667

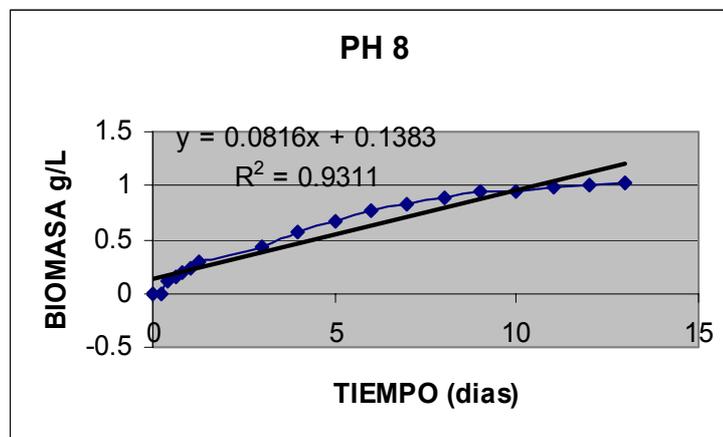
UX PARA EL CONTROL			
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0
0.20833333	1	0	0.24005002
0.41666667	1.05128205	0.05001042	0.22861464
0.625	1.1025641	0.09763847	0.2182194
0.83333333	1.15384615	0.14310084	0.50573048
1.04166667	1.28205128	0.24846136	0.27969076
1.25	1.35897436	0.30673027	0.02116644
3	1.41025641	0.34377154	0.05310983
4	1.48717949	0.39688136	0.09844007
5	1.64102564	0.49532144	0.04580954
6	1.71794872	0.54113097	0.11279549
7	1.92307692	0.65392647	0.06453852
8	2.05128205	0.71846499	0.07232066
9	2.20512821	0.79078565	0.06744128
10	2.35897436	0.85822693	0.0631789
11	2.51282051	0.92140583	0.04976151
12	2.64102564	0.97116734	0
13	2.64102564	0.97116734	



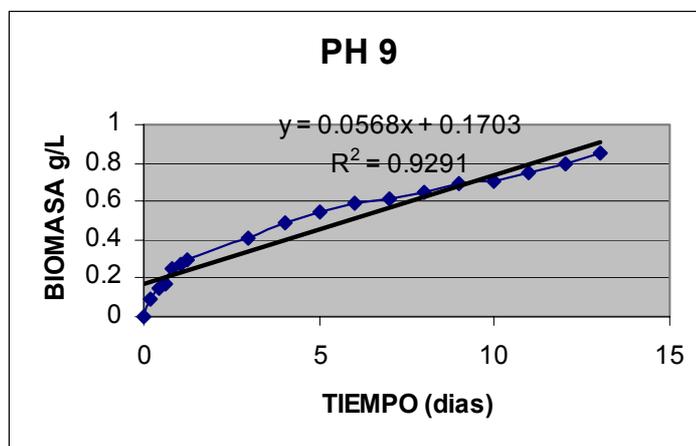
UX PARA PH 7			
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0.30009771
0.20833333	1.06451613	0.06252036	0.2824344
0.41666667	1.12903226	0.12136086	0.64095068
0.625	1.29032258	0.25489225	0.56535857
0.83333333	1.4516129	0.37267529	0.3097849
1.04166667	1.5483871	0.43721381	0.09897258
1.25	1.58064516	0.45783309	0.0115444
3	1.61290323	0.4780358	0.09531018
4	1.77419355	0.57334598	0.05310983
5	1.87096774	0.62645581	0.06669137
6	2	0.69314718	0.01600034
7	2.03225806	0.70914752	0
8	2.03225806	0.70914752	0.03125254
9	2.09677419	0.74040007	0.08829261
10	2.29032258	0.82869267	0.08112554
11	2.48387097	0.90981822	0.07503519
12	2.67741935	0.9848534	0.11375889
13	3	1.09861229	



UX PARA PH 8			
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0
0.20833333	1	0	0.51662719
0.41666667	1.11363636	0.10763066	0.19202561
0.625	1.15909091	0.147636	0.18463815
0.83333333	1.20454545	0.18610228	0.26428693
1.04166667	1.27272727	0.24116206	0.25049162
1.25	1.34090909	0.29334781	0.08112586
3	1.54545455	0.43531807	0.12429772
4	1.75	0.55961579	0.11054187
5	1.95454545	0.67015766	0.08894749
6	2.13636364	0.75910515	0.07182573
7	2.29545455	0.83093088	0.04831858
8	2.40909091	0.87924946	0.06394872
9	2.56818182	0.94319818	0.00881063
10	2.59090909	0.95200881	0.04292504
11	2.70454545	0.99493386	0.01666705
12	2.75	1.01160091	0.0082305
13	2.77272727	1.01983141	



UX PARA PH 9			
TIEMPO	X/X0	LN	UX POR INTERVALOS
0	1	0	0.43013836
0.20833333	1.09375	0.08961216	0.26673529
0.41666667	1.15625	0.14518201	0.12800759
0.625	1.1875	0.17185026	0.36473235
0.83333333	1.28125	0.24783616	0.11566825
1.04166667	1.3125	0.27193372	0.11294639
1.25	1.34375	0.29546421	0.06285765
3	1.5	0.40546511	0.08004271
4	1.625	0.48550782	0.05608947
5	1.71875	0.54159728	0.05310983
6	1.8125	0.59470711	0.01709443
7	1.84375	0.61180154	0.03333642
8	1.90625	0.64513796	0.04800922
9	2	0.69314718	0.01550419
10	2.03125	0.70865137	0.04512044
11	2.125	0.7537718	0.04317217
12	2.21875	0.79694397	0.05480824
13	2.34375	0.85175221	



Anexo 9

```
> CELLTODAS<-read.table("H:/AGITACION1.txt",header=TRUE)
> attach(CELLTODAS)
> ANOVACELLTODAS<-aov(NCELL~DIA+ENSAYO)
> summary(ANOVACELLTODAS)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
DIA      10 4104.1   410.4  30.742 < 2.2e-16 ***
ENSAYO     5 4922.3   984.5  73.741 < 2.2e-16 ***
Residuals 50  667.5    13.4
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukeyHSD(ANOVACELLTODAS,"ENSAYO")
  Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = NCELL ~ DIA + ENSAYO)

$ENSAYO
      diff      lwr      upr    p adj
A2H2`2-A2H2`1 -0.2727273 -4.889136  4.343681 0.9999757
A2H2`3-A2H2`1 -0.4545455 -5.070954  4.161863 0.9996977
C1-A2H2`1    -16.5454545 -21.161863 -11.929046 0.0000000
C2-A2H2`1    -17.7272727 -22.343681 -13.110864 0.0000000
C3-A2H2`1    -18.1818182 -22.798227 -13.565410 0.0000000
A2H2`3-A2H2`2 -0.1818182 -4.798227  4.434590 0.9999968
C1-A2H2`2    -16.2727273 -20.889136 -11.656319 0.0000000
C2-A2H2`2    -17.4545455 -22.070954 -12.838137 0.0000000
C3-A2H2`2    -17.9090909 -22.525499 -13.292682 0.0000000
C1-A2H2`3    -16.0909091 -20.707318 -11.474501 0.0000000
C2-A2H2`3    -17.2727273 -21.889136 -12.656319 0.0000000
C3-A2H2`3    -17.7272727 -22.343681 -13.110864 0.0000000
C2-C1        -1.1818182 -5.798227  3.434590 0.9731149
C3-C1        -1.6363636 -6.252772  2.980045 0.8982711
C3-C2        -0.4545455 -5.070954  4.161863 0.9996977

> tapply(NCELL,ENSAYO,mean)
  A2H2`1 A2H2`2 A2H2`3  C1  C2  C3
44.45455 44.18182 44.00000 27.90909 26.72727 26.27273
> tapply(NCELL,ENSAYO,sd)
  A2H2`1 A2H2`2 A2H2`3  C1  C2  C3
11.613472 11.223352 11.687600 5.889899 4.221159 5.217105
>
```

Anexo 10

AGITACION 75 rpm Ph 8,0		M1'1	M1'2	M1'3
HORA 0	Jueves	15	14	15
HORA 5	Jueves	18	17	17
HORA 10	Jueves	20	21	20
HORA 15	Jueves	22	22	21
HORA 20	Viernes	23	22	21
HORA 25	Viernes	23	23	24
HORA 30	Viernes	24	25	25
DIA 3	Sábado	28	29	27
DIA 4	Domingo	31	33	32
DIA 5	Lunes	33	33	32
DIA 6	Martes	37	34	35
DIA 7	Miércoles	41	40	39
DIA 8	Jueves	43	44	44
DIA 9	Viernes	48	48	49
DIA 10	Sábado	52	51	52
DIA 11	Domingo	55	54	56
DIA 12	Lunes	61	60	59
DIA 13	Martes	60	60	59

CONTROL AGITACION MANUAL PH 7,5		C1	C2	C3
HORA 0	Jueves	12	12	13
HORA 5	Jueves	13	13	13
HORA 10	Jueves	14	13	14
HORA 15	Jueves	15	14	15
HORA 20	Viernes	16	15	16
HORA 25	Viernes	18	17	17
HORA 30	Viernes	18	19	18
DIA 3	Sábado	20	21	19
DIA 4	Domingo	21	22	20
DIA 5	Lunes	23	23	22
DIA 6	Martes	24	24	23
DIA 7	Miércoles	25	25	24
DIA 8	Jueves	27	26	25
DIA 9	Viernes	29	28	27
DIA 10	Sábado	32	29	29
DIA 11	Domingo	34	30	31
DIA 12	Lunes	35	32	33
DIA 13	Martes	37	34	35

CONCENTRACION CELL/mL AGITACION 75 RPM pH 8,0	
DIA	M1
0	36666,6667
0,20833333	43333,3333
0,41666667	50833,3333
0,625	54166,6667
0,83333333	55000
1,04166667	58333,3333
1,25	61666,6667
3	70000
4	80000
5	81666,6667
6	88333,3333
7	100000
8	109166,667
9	120833,333
10	129166,667
11	137500
12	150000
13	149166,667

PESO SECO g/L	
DIA	M1
0	0,22733333
0,20833333	0,26866667
0,41666667	0,31516667
0,625	0,33583333
0,83333333	0,341
1,04166667	0,36166667
1,25	0,38233333
3	0,434
4	0,496
5	0,50633333
6	0,54766667
7	0,62
8	0,67683333
9	0,74916667
10	0,80083333
11	0,8525
12	0,93
13	0,92483333

CONCENTRACION CELL / mL CONTROL. AGITACION MANUAL pH 7,5	
DIA	C
0	30833,3333
0,20833333	32500
0,41666667	34166,6667
0,625	36666,6667
0,83333333	39166,6667
1,04166667	43333,3333
1,25	45833,3333
3	50000
4	52500
5	56666,6667
6	59166,6667
7	61666,6667
8	65000
9	70000
10	75000
11	79166,6667
12	83333,3333
13	88333,3333

PESO SECO G/L	
DIA	C
0	0,19116667
0,20833333	0,2015
0,41666667	0,21183333
0,625	0,22733333
0,83333333	0,24283333
1,04166667	0,26866667
1,25	0,28416667
3	0,31
4	0,3255
5	0,35133333
6	0,36683333
7	0,38233333
8	0,403
9	0,434
10	0,465
11	0,49083333
12	0,51666667
13	0,54766667