

R. 48-759  
B-137-98

C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA TECNICA

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA |            |
| GRANADA                  |            |
| Nº Documento             | 613531037  |
| Nº Copia                 | i 15508122 |

INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE  
ILUMINACION EN EL CRECIMIENTO  
DE CHLORELLA PYRENOIDOSA



OCTUBRE, 1980

M<sup>a</sup> EUGENIA MARTINEZ SANCHO

INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACION EN EL CRECIMIENTO  
DE CHLORELLA PYRENOIDOSA

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias  
,Sección Químicas,

por

Ma EUGENIA MARTINEZ SANCHO

Realizada bajo la dirección del Prof.Dr.D.FERNANDO CAMACHO RUBIO,catedrático de Química Técnica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y juzgada el día 31 de Octubre - de 1980, en dicha Facultad y por el siguiente Tribunal

PRESIDENTE:Prof.Dr.D.ENRIQUE COSTA NOVELLA,Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid

VOCALES :Prof.Dr.D.FERNANDO CAMACHO RUBIO,Catedrático de Química Técnica de esta Universidad

:Prof.Dr.D.JUAN ARENAS ROSADO,Catedrático de Química Física de la Universidad de Extremadura

:Prof.Dr.D.EDUARDO GARCIA PEREGRIN,Profesor Agregado de Bioquímica de esta Universidad

SECRETARIO:Prof.Dr.D.JOSE RODRIGO MARTIN,Profesor Adjunto de Química Técnica de esta Universidad

Calificación obtenida:SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA TECNICA

FERNANDO CAMACHO RUBIO, Director del Departamento de Química Técnica de la Universidad de Granada.

CERTIFICO: Que el presente trabajo sobre "INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACION EN EL CRECIMIENTO DE CHLORELLA PYRENOIDOSA" ha sido realizado bajo mi dirección, desde 1976 hasta el momento, en los Laboratorios de este Departamento por la Lcda. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Eugenia Martinez Sancho, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente trabajo en Granada a 10 de Septiembre de 1980.

Fdo. Fernando Camacho Rubio

En primer lugar, quiero agradecer al profesor - Dr.D.Fernando Camacho Rubio jefe del Departamento de Química Técnica de la Facultad de Ciencias (Universidad de Granada) y director de esta tesis el estímulo ,ayuda y consejos que han posibilitado la realización de esta memoria.

Al profesor Dr.D.Antonio Padial Vico, por la ayuda prestada en los diseños y montajes; así como en la puesta a punto de la Técnica Experimental.

Asimismo quiero agradecer a todos mis compañeros del Departamento, su desinteresada ayuda a lo largo del presente trabajo.

Mi agradecimiento al "Instituto Gregorio Marañón" del C.S.I.C por las muestras del alga utilizada.

Por último, he de agradecer a la Dirección General de Universidades e Investigación la concesión de una Beca de Formación del Personal Investigador, durante el periodo 1976-79 que ha posibilitado la realización del presente trabajo.

A todos mi más sincero agradecimiento.

TA<sup>a</sup> Eugenia Martínez

**INDICE**

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMEN.....   | 1  |
| 2. INTRODUCCION.....  | 7  |
| 2.1 INTERES DEL CULTIVO DE ALGAS UNICELULARES.....                            | 9  |
| 2.1.1 Las algas como materia prima en la<br>industria.....                    | 11 |
| 2.1.2 Producción de algas a escala industrial.                                | 13 |
| 2.2 SISTEMAS UTILIZADOS.....  | 17 |
| 2.2.1 Crecimiento autotrófico.....  | 17 |
| 2.2.2 Crecimiento heterotrófico y mixotrófico.                                | 28 |
| 2.3 CINETICA DEL CRECIMIENTO LIMITADO POR LA LUZ..                            | 31 |
| 2.3.1 Aparatos utilizados.....  | 33 |
| a) Cultivo continuo.....  | 33 |
| b) Cultivo discontinuo.....   | 37 |
| 2.3.2 Influencia de la intensidad de ilumina-<br>ción.....                    | 40 |
| 2.3.3 Cultivo sincrónico.....   | 45 |
| 2.3.4 Adaptación a los cambios de iluminación.                                | 48 |
| 2.3.5 Influencia de la temperatura en culti-<br>vos limitados por la luz..... | 50 |
| 2.3.6 Cinética y mecanismo de la fotosíntesis.                                | 53 |
| 2.4 OBJETO DE LA PRESENTE INVESTIGACION.....                                  | 55 |
| 3. TECNICA EXPERIMENTAL.....  | 57 |
| 3.1 DESCRIPCION DE LA INSTALACION.....  | 59 |
| 3.2 PROCEDIMIENTO.....  | 67 |
| 3.3 MEDIDA DE CAUDALES.....   | 73 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.4 DETERMINACION DE LA INTENSIDAD MEDIA DE ILU-<br>MINACION EN LOS VASOS DE CULTIVO..... | 79  |
| 3.5 MEDIDA DE LA CONCENTRACION CELULAR.....   | 93  |
| 3.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CLOROFILA Y<br>EN PROTEINA BRUTA.....                  | 97  |
| 3.7 MEDIDA DE LAS PROPIEDADES FISICAS DE LA SUS-<br>PENSION DE CELULAS.....               | 101 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS MISMOS.....  | 107 |
| 4.1 INTENSIDAD DE ILUMINACION.....  | 109 |
| 4.1.1 Coeficiente de extinción.....   | 109 |
| 4.1.2 Intensidad media de iluminación.....  | 121 |
| 4.2 INFLUENCIA DEL GRADO DE MEZCLA.....   | 149 |
| 4.3 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACION... ..                                      | 163 |
| 4.3.1 Zona exponencial de crecimiento.....  | 193 |
| 4.3.2 Zona lineal de crecimiento.....   | 202 |
| 4.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....   | 213 |
| 4.5 INTERPRETACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS....   | 257 |
| 5. CONCLUSIONES.....  | 285 |
| 6. NOMENCLATURA.....  | 295 |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....  | 301 |

## 1. RESUMEN





En la investigación de que se dá cuenta en esta memoria se ha estudiado la influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad de crecimiento de Chlorella Pyrenoidosa, en el intervalo de 18 a 35°C; en un aparato de cultivo discontinuo.

Los resultados obtenidos indican que la intensidad de iluminación se atenúa rápidamente con la distancia al penetrar la luz en la suspensión de algas, - siendo el coeficiente de extinción de 2,42 l/g cm. La distribución de intensidades de iluminación en la cámara de cultivo ha permitido determinar la intensidad media de iluminación,  $I_m$ , que se ajusta aceptablemente, en función de la intensidad de iluminación correspondiente al medio de cultivo fresco,  $I_0$ , y a la concentración de biomasa,  $c$ , a la ecuación

$$I_m = \frac{I_0}{\alpha c} ( 1 - e^{-\alpha c} )$$

donde  $\alpha$  es una constante que incluye el coeficiente de - extinción y una longitud característica que depende de - la geometría de la cámara de cultivo.

La interpretación de los experimentos pone de manifiesto que en las condiciones utilizadas en esta investigación, agitación mecánica para suplementar la mezcla suministrada por el burbujeo, el grado de mezcla es perfecto y la velocidad específica de crecimiento es fun

ción de la intensidad media de iluminación y no de su distribución espacial.

En el intervalo de 250 a 2500 lux, la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , durante la zona exponencial parece variar linealmente con la intensidad incidente, hasta aproximadamente unos 1000 lux, para a continuación observarse un efecto de saturación. Los valores encontrados se ajustan bien a la ecuación exponencial

$$\mu = \mu_m \left( 1 - e^{-\frac{I}{I_s}} \right)$$

Como era de esperar, la velocidad de crecimiento,  $p$ , durante la zona lineal varía linealmente con la intensidad de iluminación.

Se han determinado los valores de los parámetros de las ecuaciones que relacionan  $\mu$  y  $p$  con  $I_0$  a las temperaturas de 18, 25, 30 y 35°C. Solo a la menor de estas temperaturas se observa un efecto negativo al aumentar la intensidad de iluminación, en el intervalo estudiado.

Sobre la base del mecanismo simplificado para la fotosíntesis, propuesto por Lumry y Rieske (1959) se han interpretado los resultados obtenidos llegando a la conclusión de que durante la zona exponen--

cial las células son capaces de adaptar, en cierto grado, su contenido en clorofila a las variaciones lentas de la intensidad media de iluminación provocadas por el crecimiento.



... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..

## 2. INTRODUCCION

1947

## 2.1 INTERES DEL CULTIVO DE ALGAS UNICELULARES

El principal interés del cultivo de algas unicelulares a escala industrial es indudablemente su utilización en la alimentación animal y humana. En este sentido, las algas unicelulares presentan algunas ventajas importantes con respecto a las plantas superiores, entre las que cabe destacar:

- a) en el caso de las algas unicelulares toda la biomasa es utilizable como alimento ya que no poseen estructuras no digeribles, al contrario que en las plantas superiores en que solo suele utilizarse los frutos, semillas o raíces que, en general, constituyen menos de la mitad del peso seco total de la planta.
- b) como media, el contenido en proteínas de las algas unicelulares es alrededor del 50% de su peso seco. Estas proteínas son de bajo peso molecular (fácil digestibilidad) y contienen los diez aminoácidos esenciales para la alimentación humana.

Por otra parte, aunque de acuerdo con los datos más recientes, el aprovechamiento de la energía solar es del mismo orden en las algas unicelulares y en las plantas superiores: luz de baja intensidad,  $\approx 20\%$  del espectro visible; luz plena del sol,  $\approx 2$  a  $3\%$  del espectro visible; esta disminución tan apreciable que pone de mani



fiesto el fenómeno de saturación de luz podría eliminarse en parte en el caso de las algas unicelulares como parecen sugerir los experimentos con luz intermitente, que se considerarán más adelante.

La creciente necesidad de proteínas - para una población humana en continuo aumento y todavía hoy mal alimentada, ha determinado un gran interés por los organismos unicelulares como fuente de proteína, Costa Novella (1974), y particularmente por las algas verdes que dado su carácter autotrófico tienen requerimientos mínimos en cuanto a nutrientes, Burlew (1953).

Aunque se han utilizado diferentes especies de algas, la mayor parte de los trabajos de investigación en este campo han sido realizados con *Chlorella* dada su velocidad de crecimiento relativamente rápida y su tolerancia a una gran variedad de condiciones de cultivo, Rainbow y Rose (1963). La producción encontrada oscila generalmente entre 10-15 gramos de peso seco / día m<sup>2</sup> que es unas 10 veces superior a la producción de los mejores cultivos agrícolas, así Fogg (1957) considera que en condiciones climáticas favorables pueden conseguirse rendimientos anuales de cerca de 30 Tn de peso seco/acre.

Con respecto al contenido en proteínas de estas algas y sus características de asimilación se han realizado también un gran número de trabajos de -

investigación Brandt y col.(1975),Bhattacharyya y col.(1971).Estos últimos autores calculan una producción anual - de proteínas de alga de 7,4 Tn/acre y encuentran que la - Chlorella seca tiene un contenido apreciable en vitaminas y coenzimas.También se han realizado experimentos de nutrición en seres humanos con resultados prometedores,Dam y col.(1965).

### 2.1.1 Las algas como materia prima en la industria

El aprovechamiento industrial de las - algas unicelulares no se basa unicamente en su contenido en proteínas,aún cuando éste sea el aspecto más interesante como se ha indicado anteriormente,si no que también -- pueden extraerse de ellas algunas otras sustancias de interés en la industria química,alimentaria o farmacéutica.

Así,el contenido en clorofila de estos microorganismos es muy superior al de las plantas superiores,por lo que puede extraerse de ellos con mayor facilidad y menor coste.Aunque naturalmente la demanda relativamente baja de este producto no justificaría por si sola - el cultivo industrial de las algas unicelulares.

Las grasas contenidas en ellas tienen un alto porcentaje en ácidos grasos insaturados,por lo que se están investigando aplicaciones de las mismas como aceites secantes para pinturas y barnices,Milner (1953).

En algunas especies como *Scenedesmus obliquus* el contenido en esteroides es apreciable y podría tener interés su extracción con vistas a la síntesis de cortisonas.

El mayor interés de estos procesos radica en que después de la separación la proteína es utilizable, a veces en mejores condiciones, y también en que las condiciones de crecimiento pueden determinar de manera muy apreciable la composición de las algas cosechadas, Spoehr y col. (1949), Fogg y col. (1953). Así estos autores encuentran que bajo condiciones favorables a un rápido crecimiento los productos de la fotosíntesis son utilizados fundamentalmente en la síntesis de protoplasma y las células tienen un alto contenido en proteínas, mientras que cuando el crecimiento es retardado los productos primarios de la fotosíntesis se dirigen a la producción de materiales de reserva, aumentando el contenido en carbohidratos y lípidos.

Por otra parte, la fotosíntesis implica absorción de  $\text{CO}_2$  y desprendimiento de  $\text{O}_2$  lo que ha sugerido aplicaciones muy específicas, pero interesantes, para el mantenimiento de la vida humana en viajes espaciales, Shuller y Affens (1970).

Es interesante también señalar que la aplicación de las algas unicelulares al tratamiento de las

aguas residuales urbanas puede presentar la ventaja de que en este caso la biomasa producida es un subproducto valioso, al mismo tiempo que se consigue disminuir de manera muy apreciable la DBO de las aguas tratadas. En general, estas aguas constituyen un medio de cultivo idóneo por su alto contenido en N y por el  $\text{CO}_2$  que se desprende como consecuencia de la descomposición bacteriana de la materia orgánica.

Finalmente, el cultivo a escala industrial de estos microorganismos utilizando energía solar para el bombeo, centrifugación y secado tiene un balance de energía positivo, es decir, que la energía solar absorbida y almacenada en las algas es superior a la energía mecánica y térmica consumida en el funcionamiento de la instalación. Es evidente, dada la crisis energética, cada vez más aguda, el interés de este último aspecto considerado.

### 2.1.2 Producción de algas a escala industrial

Después de la primera planta piloto en la que se lleva a cabo un estudio sistemático de la influencia de las diferentes variables en el cultivo industrial de la *Chlorella* montada por la Carnegie Institution de Arthur D. Little Inc. en Cambridge (Massachusetts) en 1951, se han puesto a punto gran número de cultivos continuos - semiindustriales en Estados Unidos, Japón, Alemania y Fran-

cia.

El principal problema industrial consiste en diseñar la instalación para conseguir que el alga crezca a la máxima velocidad posible y poder cosecharla de manera continua, sin alterar las condiciones del cultivo. La necesidad de conseguir los máximos rendimientos por unidad de área,  $g/h m^2$  radica en que el coste total será proporcional a la superficie de la instalación, por lo que el coste unitario será inversamente proporcional al rendimiento.

En esencia, una planta industrial de cultivo deberá disponer de los siguientes elementos:

- a) Una cámara de cultivo con superficie superior transparente. En general, el cultivo cerrado permitirá disponer una presión parcial de  $CO_2$  superior a la atmosférica con objeto de alcanzar las condiciones óptimas de crecimiento y evitar más fácilmente problemas de contaminación, que si bien parecen ser poco importantes en el caso de las bacterias no ocurre así con los protozoos. El cultivo abierto parece ser adecuado solo en el caso del tratamiento de aguas residuales, en el que, como ya se ha indicado, la biomasa es un subproducto y el objetivo esencial del proceso es la depuración.
- b) Un sistema de circulación de la suspensión de algas en

el medio de cultivo, para evitar la sedimentación y permitir que el proceso sea continuo. El grado de turbulencia en la cámara de cultivo debería ser tal, que permitiera un máximo aprovechamiento de la energía luminosa.

- c) Un sistema de control de la temperatura que mantenga - ésta en toda la instalación en el valor óptimo para el alga considerada. En este sentido conviene destacar que variaciones cíclicas de la temperatura acopladas a los periodos de luz y de oscuridad parece que puedan incrementar el rendimiento, Burlew (1953).
- d) Un sistema de suministro de  $\text{CO}_2$  y nutrientes para mantener la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto y de los nutrientes también en sus valores óptimos.
- e) Un sistema de cosechado de las algas que permita retirar del medio de cultivo, de manera continua, la biomasa producida para mantener su concentración constante. En este sentido la utilización de la sedimentación para conseguir una concentración parcial previa a la centrifugación parece ser el sistema más idóneo, Albertsson - (1972).
- f) Finalmente las algas cosechadas deberán ser tratadas de alguna forma para conservarlas hasta el momento de su empleo. Con este fin, la liofilización, Osmund Holm Hansen (1967), el secado por pulverización y el desengrasado y

deseccación simultáneos, parecen ser las técnicas más aconsejables.

## 2.2 SISTEMAS UTILIZADOS

Los microorganismos más utilizados en los trabajos de investigación en este campo, son las algas verdes unicelulares de los géneros Chlorella, Chlamydomonas y Scenedesmus.

En esta investigación se ha utilizado Chlorella Pyrenoidosa, cuya clasificación taxonómica se indica a continuación, Javornicky (1973):

|          |   |                |
|----------|---|----------------|
| DIVISION | : | CHLOROPHYTA    |
| CLASE    | : | CHLOROPHYCEAE  |
| ORDEN    | : | CHLOROCOCCALES |
| FAMILIA  | : | CHLORELLACEAE  |
| GENERO   | : | CHLORELLA      |
| ESPECIE  | : | PYRENOIDOSA    |

Esta elección se realizó porque de acuerdo con el estudio bibliográfico, este alga verde proporciona una de las mayores velocidades de crecimiento y se adapta con facilidad a muy diferentes condiciones ambientales.

### 2.2.1 Crecimiento autotrófico

Teniendo en cuenta el objeto de la presente investigación se llevó a cabo una revisión biblio -



gráfica con el fin de seleccionar el medio de cultivo más adecuado, imponiendo las condiciones de que el crecimiento fuera autotrófico, es decir, que la fuente de energía fuera la luz y la fuente de carbono el  $\text{CO}_2$ ; y de que el nitrógeno asimilable se encontrara en la forma de  $\text{NO}_3^-$ .

En general, estos medios de cultivo consisten en una disolución acuosa que contiene menos del 1% de sales y gases disueltos. El medio de cultivo seleccionado fué el medio A propuesto por Rodríguez-López (1964) que de acuerdo con Zarnowski (1972) es uno de los más idóneos para *Chlorella*. La composición y preparación de este medio de cultivo se indica en la parte 3 de esta memoria.

Es interesante destacar, sin embargo, - que los medios de cultivo utilizados en el crecimiento autotrófico de *Chlorella* con  $\text{NO}_3^-$  como fuente de N varían ampliamente en su composición, como se observa en la tabla 2.1 en la que se indican algunos de ellos a título de ejemplo. En esta tabla se dan las concentraciones en g/l de los macronutrientes, considerando como tales los elementos Mg, Fe y Ca.

Puede observarse en la tabla 2.1 que las concentraciones de los elementos indicados en los diferentes medios propuestos varían entre límites muy amplios y que incluso no existe acuerdo en sobre si la presencia del Ca es necesaria o no Stewart (1974), Scott (1943).

TABLA 2.1

Medios de cultivo más frecuentes

| Nombre              | Utilizado en esta investigación | DETMER       | KNOP sin Ca  | KNOP modificado        | NIHEI y col.       |
|---------------------|---------------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------------|
| Macronutrientes g/l |                                 |              |              |                        |                    |
| N                   | 0,140                           | 0,085        | 0,168        | 0,168                  | 0,693              |
| P                   | 0,157                           | 0,057        | 0,279        | 0,279                  | 0,285              |
| S                   | 0,033                           | 0,067        | 0,320        | 0,320                  | 0,325              |
| K                   | 0,390                           | 0,203        | 0,819        | 0,819                  | 2,289              |
| Mg                  | 0,024                           | 0,050        | 0,243        | 0,243                  | 0,247              |
| Fe                  | 0,001                           | 0,004        | 0,001        | 0,001                  | 0,001              |
| Ca                  | 0,004                           | 0,244        | - - -        | 0,030                  | - - -              |
| Referencia          | Rodriguez-López(1964)           | Scott (1943) | Myers (1944) | Phillips y Myers(1954) | Nihei y col.(1954) |

TABLA 2.1 (cont.)

Medios de cultivo más frecuentes

| Nombre              | SOROKIN<br>y<br>KRAUSS    | RODRIGUEZ-<br>LOPEZ B     | BEALE<br>y<br>col.    | HASE<br>y<br>col.    | JAGUZINS-<br>KIEGO  |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Macronutrientes g/l |                           |                           |                       |                      |                     |
| N                   | 0,173                     | 0,173                     | 0,448                 | 0,693                | 0,069               |
| P                   | 0,285                     | 0,285                     | 0,124                 | 0,285                | 0,044               |
| S                   | 0,136                     | 0,326                     | 0,320                 | 0,325                | 0,013               |
| K                   | 0,841                     | 0,841                     | 1,326                 | 2,289                | 0,193               |
| Mg                  | 0,099                     | 0,247                     | 0,243                 | 0,247                | 0,010               |
| Fe                  | 0,010                     | 0,002                     | 0,001                 | 0,001                | 0,0004              |
| Ca                  | 0,030                     | - - -                     | 0,040                 | - - -                | - - -               |
| Referencia          | Sorokin y<br>Krauss(1958) | Rodriguez-<br>López(1964) | Beale y<br>col.(1971) | Hase y<br>col.(1971) | Zarnowski<br>(1972) |

TABLA 2.1 (cont.)

Medios de cultivo más frecuentes

| Nombre               | JAPON           | KANAZAWA | KNOP   | MYERS | PIETROD-<br>WORIECKA |
|----------------------|-----------------|----------|--------|-------|----------------------|
| Macronutrientes g/ l |                 |          |        |       |                      |
| N                    | 0,280           | 0,693    | 0,156  | 0,168 | 0,279                |
| P                    | 0,068           | 0,285    | 0,036  | 0,279 | 0,068                |
| S                    | 0,040           | 0,325    | 0,013  | 0,172 | 0,040                |
| K                    | 0,086           | 2,289    | 0,476  | 0,819 | 0,858                |
| Mg                   | 0,030           | 0,247    | 0,010  | 0,119 | 0,030                |
| Fe                   | 0,001           | 0,001    | 0,0002 | 0,028 | 0,001                |
| Ca                   | - - -           | - - -    | 0,024  | - - - | 0,002                |
| Referencia           | Zarnowski(1972) |          |        |       |                      |

TABLA 2.1 (cont.)

Medios de cultivo más frecuentes

| Nombre              | PRATT           | TRZEBONKA<br>SETLIK | TAMIYA                 | EDTA-<br>KNOP      | DAVIS |
|---------------------|-----------------|---------------------|------------------------|--------------------|-------|
| Macronutrientes g/l |                 |                     |                        |                    |       |
| N                   | 0,014           | 0,175               | 0,693                  | 0,168              | 1,386 |
| P                   | 0,004           | 0,071               | 0,570                  | 0,278              | 0,278 |
| S                   | 0,001           | 0,093               | 0,650                  | 0,320              | 0,320 |
| K                   | 0,046           | 0,090               | 2,648                  | 0,817              | 4,211 |
| Mg                  | 0,001           | 0,062               | 0,493                  | 0,243              | 0,243 |
| Fe                  | 0,0002          | 0,004               | 0,001                  | 0,005              | 0,020 |
| Ca                  | - - -           | - - -               | - - -                  | - - -              | - - - |
| Referencia          | Zarnowski(1972) |                     | Tamiya y<br>col.(1953) | Davis y col.(1953) |       |

Por otra parte, además de los elementos indicados anteriormente el medio de cultivo debe contener pequeñas cantidades de otros elementos considerados como micronutrientes, y entre los que cabe mencionar Mn, Zn, Cu, B y Mo, por citar solo aquellos en los que todos los investigadores están de acuerdo en su necesidad.

Con objeto de suministrar estos micronutrientes al medio de cultivo se suelen utilizar soluciones más concentradas de los mismos que se emplean en la proporción de 1 a 1000 y que se designan con nombres ya establecidos, como por ejemplo las soluciones Arnon A-4, A-5, B-7 y Hutner, Hase (1971), Krauss (1953) y Starr (1971).

Conviene destacar que la deficiencia en alguno de estos micronutrientes esenciales puede disminuir de manera muy apreciable la velocidad de crecimiento de las algas, Reisner y Thompson (1956).

Otro factor importante a tener en cuenta es el pH del medio de cultivo, ya que aunque las algas durante su crecimiento pueden influir dentro de ciertos límites en el valor de esta variable, mediante sustancias segregadas por las mismas, Sorokin (1971), su establecimiento en el medio de cultivo inicial permitirá una más fácil adaptación al mismo. El valor del pH seleccionado fué de 6,5 que al mismo tiempo que permite el crecimiento óptimo de *Chlorella* inhibe en parte la contaminación por bacte -

rias.

Durante el crecimiento fotoautotrófico de las algas la fuente de carbono será el anhídrido carbónico.

Las investigaciones al respecto sugieren que el camino de la fijación autotrófica del  $\text{CO}_2$  en las algas es el ciclo de Calvin. Latzko y Gibbs (1969), han encontrado que todas las enzimas necesarias para este ciclo están presentes en *Chlorella*.

Puesto que la mayor parte de las algas son organismos acuáticos el  $\text{CO}_2$  deberá disolverse en el medio acuoso previamente a su asimilación. En este medio se encontrará fundamentalmente como  $\text{CO}_2$  disuelto o como los aniones  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{CO}_3^-$  dependiendo del valor del pH.

No existe acuerdo en la bibliografía sobre que formas del  $\text{CO}_2$  en disolución son esencialmente asimiladas por las algas. Aunque la mayor parte de los investigadores consideran que *Chlorella* absorbe el  $\text{CO}_2$  en la forma sin disociar, ya que las membranas celulares son más permeables a ella, Osterlind (1948), Briggs y Whittingham (1952); sin embargo, las elevadas velocidades de asimilación encontradas por Osterlind (1949) a pH relativamente altos, en que la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto es despreciable, Emerson y Green (1938), sugieren que debe haber-

algún mecanismo celular para la utilización de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  o  $\text{CO}_3^{=}$

Por otra parte dado que el  $\text{CO}_2$  es un gas relativamente poco soluble en agua, en el rango de presiones en que se trabaja se cumple la ley de Henry y por tanto a cada temperatura, la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto será proporcional a la presión parcial del anhídrido carbónico en la fase gaseosa.

Emerson y Green (1938), encuentran que del 0,1 al 0,5% en volumen de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa es suficiente para una máxima velocidad de fotosíntesis y que aumentar esta concentración hasta el 5% en volumen no provoca ninguna mejora, sin embargo a partir de esta última concentración aparecen efectos tóxicos. En contradicción con lo anterior, Spoehr y Milner (1949), indican que hasta el 5% V/V el aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa ejerce un efecto positivo sobre la velocidad de fotosíntesis.

Osterlind (1950) llega a la conclusión de que en las condiciones naturales, 0,03% en volumen de  $\text{CO}_2$ , la velocidad de fotosíntesis está en parte limitada por el aporte de  $\text{CO}_2$ , y por tanto que puede conseguirse incrementar la velocidad de crecimiento utilizando atmósferas artificiales más ricas en  $\text{CO}_2$ .

Warburg (1952) considera que una con -



concentración del 5% de  $\text{CO}_2$  es la necesaria para una velocidad máxima de crecimiento, de acuerdo con lo indicado anteriormente por Spoehr y Milner. Mientras que Davis, Myers y Dedrick (1953) vuelven a encontrar que entre el 0,5 y el 4,5% V/V la velocidad de crecimiento no varía significativamente, de acuerdo con lo indicado anteriormente por Emerson y Green.

Nielsen (1955), al contrario que Osterlind, utilizando suspensiones muy diluidas encuentra que la velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de  $\text{CO}_2$  por encima del 0,01-0,03%.

Es interesante destacar, que no existe acuerdo entre los investigadores que han trabajado en este campo y que pueden clasificarse con facilidad en dos grupos:

Emerson y Green (1938); Davis, Myers y Dedrick (1953) y Nielsen (1955) concluyen que no existe un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento claro al aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa, y si acaso la concentración óptima de  $\text{CO}_2$  es muy pequeña próxima a la natural, menor del 0,5%; por el contrario, Spoehr y Milner (1949); Osterlind (1950) y Warburg (1952) si encuentran una mejora apreciable y sitúan la concentración óptima de  $\text{CO}_2$  alrededor del 5% V/V.

Puesto que los efectos negativos no se han encontrado por debajo del 5% en volumen, es práctica universal el uso de esta concentración en los estudios de crecimiento autotrófico de algas. Las diferencias anteriores podrían justificarse en parte teniendo en cuenta que los diferentes investigadores no han trabajado en condiciones comparables, sobre todo en lo que se refiere a la densidad del cultivo y a la temperatura.

Por otra parte, puesto que el  $\text{CO}_2$  di --suelto es consumido durante el crecimiento y debe ser re--puesto a partir del que se encuentra en la fase gaseosa -- es evidente que problemas cinéticos de la transferencia -- del  $\text{CO}_2$  desde el gas al líquido, pueden interferir también con el proceso del crecimiento. Estos fenómenos están relacionados con el grado de agitación de la fase líquida, el grado de subdivisión del gas en el seno del líquido y el caudal de fase gaseosa por unidad de volumen de líquido.

Hasta el momento, la atención de los investigadores se ha dirigido únicamente a analizar la in--fluencia del caudal de gas, pudiendo destacarse los traba--jos de Geoghegan (1953) y Beale y Appleman (1971), que en--tre ambos analizan la influencia del caudal de gas en el intervalo de 6,25 ml / l / min a 500 ml / l / min, para una --mezcla gaseosa con un 5% V/V de  $\text{CO}_2$ . En este intervalo no se aprecia influencia del caudal de la fase gaseosa sobre la velocidad de crecimiento de las algas.

### 2.2.2 Crecimiento heterotrófico y mixotrófico

Cierta atención se ha dedicado también al estudio del crecimiento de *Chlorella* con compuestos orgánicos como fuente de C y en ausencia de luz (crecimiento heterotrófico) o en presencia de luz (crecimiento mixotrófico).

Rodríguez-López (1964 y 1966) estudia el crecimiento de *Chlorella Pyrenoidosa* en presencia de una serie de carbohidratos, encontrando que solo la glucosa, fructosa y manosa son consumidas con velocidad apreciable. La luz estimula fuertemente el consumo de azúcares, que son polimerizados a almidón en el microorganismo, provocando gigantismo de las células e inhibición de la división. Este autor considera que puede ser de gran interés práctico el alcanzar por este tratamiento formas gigantes de *Chlorella* para usarlas como inóculo en cultivos cuya velocidad de crecimiento se desee aumentar, tal como se desprende de sus experimentos de crecimiento autotrófico en los medios A y B, inoculados con células normales y células gigantes.

Otro posible factor que hace interesante este tipo de investigaciones es si la velocidad específica máxima de crecimiento es superior en condiciones mixotróficas a la que se obtiene en el crecimiento autotrófico de un microorganismo dado, como parece deducirse del-

trabajo de Endo y Shirota (1972) que encuentran que la eficiencia en la utilización de la luz es muy superior en el cultivo mixotrófico que en el cultivo autotrófico. Según estos autores, de una manera aproximada el crecimiento mixotrófico podría considerarse la suma de los obtenidos en condiciones heterotróficas y autotróficas.

Sin embargo, los resultados de Pearsall y Bengry (1940) y los de Follmann, Markl y Vortmeyer (1978) son contrarios a los de los autores anteriormente mencionados, en el sentido de que encuentran que la velocidad específica máxima de crecimiento no cambia de manera apreciable al pasar de condiciones autotróficas a mixotróficas. Debe señalarse sin embargo que el último grupo de investigadores mencionado si encuentran un efecto positivo de la presencia de glucosa en el medio de cultivo, en condiciones de limitación de luz, lo cual puede significar la posibilidad de incrementar de manera apreciable la velocidad de crecimiento de un cultivo denso, en el que la limitación por la luz es provocada por la misma concentración celular.



### 2.3 CINETICA DEL CRECIMIENTO LIMITADO POR LA LUZ

Cuando las algas unicelulares crecen - bajo pequeñas intensidades de iluminación se observa generalmente una relación lineal entre la velocidad de fotosíntesis y la intensidad de iluminación, sin embargo, a valores altos de la intensidad de iluminación la velocidad de fotosíntesis se hace constante e independiente de ésta. Esto mismo puede afirmarse para la velocidad específica de crecimiento tanto si se expresa la concentración de biomasa por peso seco, volumen empacado o número de células.

La intensidad máxima de la luz del sol es de 10 a 20 veces superior al valor de  $I_s$  para *Chlorella*, es decir el valor de la intensidad de iluminación a partir del cual la velocidad específica de crecimiento permanece prácticamente constante. Parece, por tanto, que como el objetivo esencial es el aprovechamiento de la energía solar - no deberían darse frecuentemente problemas de limitación por la luz, sin embargo, es preciso considerar que de acuerdo con la ley de Beer la intensidad de iluminación se atenua rápidamente al penetrar en la suspensión de células.

Teniendo en cuenta los coeficientes de extinción determinados experimentalmente para cultivos de *Chlorella*, puede calcularse que para una concentración de 1 g/l (no demasiado alta) la intensidad de iluminación -

se reduciría a  $1/20$  de la incidente a una profundidad ligeramente superior a 1 cm.

El cálculo anterior pone de manifiesto que en una delgada capa del medio de cultivo próxima a la superficie iluminada se desaprovecha una gran parte de la energía solar, mientras que debajo de esta capa la velocidad de crecimiento está limitada por la luz.

Estas consideraciones ponen de manifiesto que el aspecto esencial que debe conocerse a fondo - para el desarrollo industrial del cultivo de algas unicelulares es la influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad específica de crecimiento.

Con objeto de analizar la influencia - de esta variable, controlando las condiciones adecuadamente es preciso realizar estudios cinéticos con aparatos de laboratorio e iluminación artificial; aunque naturalmente dada la influencia de la geometría y del grado de mezcla o turbulencia en la historia de iluminación de una célula a lo largo de su ciclo de vida, así como de las variaciones diarias y estacionales de la intensidad de iluminación procedente del sol, será preciso pasar por instalaciones - planta piloto con luz natural antes del diseño del equipo industrial.

### 2.3.1 Aparatos utilizados

La velocidad de crecimiento de algas unicelulares bajo limitación de luz presenta problemas diferentes a los del crecimiento bajo limitación de un sustrato disuelto e incluso a los del crecimiento bajo limitación por un gas que se transfiere al medio de cultivo. En efecto, en estas circunstancias la intensidad media de iluminación en el medio de cultivo depende de la concentración de biomasa y por consiguiente esta última variable parece influir sobre la velocidad específica de crecimiento.

El problema es más complicado en el caso del cultivo discontinuo ya que entonces, aunque la intensidad de iluminación incidente sea constante, la intensidad de iluminación en el medio de cultivo variará con la posición y con el tiempo. Esta circunstancia complica considerablemente la interpretación de los resultados obtenidos y ha llevado a un gran número de investigadores a diseñar sistemas de cultivo continuo, en los que al ser constante la concentración de biomasa la intensidad de iluminación varia solo con la posición.

#### a) Cultivo continuo

Si se representa por  $V_c$  el volumen del medio de cultivo en litros, por  $c$  la concentración de bio-



masa en g/l, por  $F$  el caudal de alimentación de medio de cultivo fresco en l/h y por  $\mu$  la velocidad específica de crecimiento en  $h^{-1}$ , un balance de biomasa de forma general será

$$F_0 + \mu c V_c = F c + \frac{d}{dt} (c V_c) \quad [2.1]$$

que puede ponerse en la forma

$$\frac{d}{dt} (V_c c) = - F c + \mu c V_c \quad [2.2]$$

En general, se han utilizado dos tipos de dispositivos de cultivo continuo, según que la velocidad de alimentación de medio fresco se regule mediante un dispositivo fotométrico para mantener constante la concentración de biomasa en la cámara de cultivo e igual a un valor previamente escogido o no se regule.

En el primer caso  $c$  sería constante - desde el primer momento y la ecuación [2.2] se reduciría a

$$\frac{d V_c}{dt} = - F + \mu V_c \quad [2.3]$$

A este primer tipo pertenece el aparato propuesto por Myers y Clark en 1944 que ha sido ampliamente utilizado. En este dispositivo se alimentaba continuamente medio fresco, con un caudal regulado como se ha -

descrito anteriormente, pero no se extraía medio de cultivo; por tanto  $V_c$  aumenta continuamente con el tiempo y  $F$  es cero (tégase en cuenta que  $F$  aparece en el 2º miembro de la ecuación [2.3] representando el caudal de salida)

$$\frac{d V_c}{dt} = \mu V_c \quad [2.4]$$

separando variables e integrando esta última ecuación

$$\ln \frac{V_c}{V_{c0}} = \mu (t - t_0) \quad [2.5]$$

que permite calcular  $\mu$  por medidas de los volúmenes de medio de cultivo en función del tiempo.

Posteriormente Phillips y Myers (1954a) utilizando también un dispositivo fotométrico para regular la entrada de medio fresco, pero manteniendo constante el volumen de la cámara de cultivo mediante un sifón, diseñan un aparato en el que la ecuación [2.3] se reducirá a

$$0 = -F + \mu V_c \quad [2.6]$$

es decir

$$\mu = \frac{F}{V_c} = D \quad [2.7]$$

que permite la medida directa de la velocidad específica de crecimiento a partir del caudal de alimentación regis-

trado y del volumen de la cámara de cultivo.

Los dos aparatos descritos pueden denominarse como dispositivos de dilución controlada y cámara de cultivo de volumen variable el primero y de volumen constante el segundo.

Cuando no se controla automáticamente la velocidad de dilución caben, en principio, también las dos posibilidades anteriores: volumen variable o volumen constante de la cámara de cultivo. Sin embargo, solo se ha utilizado el dispositivo de volumen constante propuesto por Novick y Szilard (1950) con el nombre de quimiostato y utilizado también por Monod (1950), que puede describirse como un dispositivo de dilución constante y volumen constante.

En las condiciones de este último aparato, en que la velocidad de dilución es ajustada por el propio investigador, las condiciones de estabilidad requieren que ésta sea menor que la máxima velocidad específica de crecimiento posible, para evitar el lavado de la cámara de cultivo. Una vez que la velocidad de dilución ha sido fijada, la densidad de población en la cámara de cultivo se ajusta por sí misma al valor de estado estacionario correspondiente a las condiciones existentes en dicha cámara, y en este momento la velocidad específica de crecimiento coincide con la velocidad de dilución.

Un dispositivo de dilución constante, no controlada, y volumen variable (sin salida de medio de cultivo) alcanzaría una concentración de biomasa constante - cuando

$$\frac{d V_c}{dt} = \mu V_c \quad [2.4]$$

lo que exigiría que el volumen de la cámara de cultivo variara logaritmicamente con el tiempo. Esta es la razón fundamental de que esta cuarta posibilidad no haya sido utilizada hasta el momento.

En todos los dispositivos de cultivo - continuo descritos la velocidad específica de crecimiento medida corresponderá a las condiciones existentes en la - cámara de cultivo, en el caso de cultivos de algas unicelulares limitados por la luz, corresponderá a las condiciones de iluminación existentes en dicha cámara. Generalmente se utilizan cámaras muy estrechas (en el sentido de paso de la luz) y bajas concentraciones celulares para poder despreciar la atenuación de la intensidad de iluminación incidente y poder considerar ésta constante en toda la cámara.

#### b) Cultivo discontinuo

En los aparatos de laboratorio que funcionan en régimen no estacionario, cultivo discontinuo o -

por cargas, la intensidad de iluminación en el medio de cultivo varia con la posición y con el tiempo, debido al aumento de la concentración de biomasa. Por estas circunstancias, se alcanza generalmente una concentración de biomasa a la cual toda la energía radiante incidente es absorbida en la cámara de cultivo. A partir de este momento la velocidad de crecimiento se mantiene constante determinada por la velocidad de aporte de la energía radiante. Esta región denominada zona lineal de crecimiento aparece siempre cuando se utilizan estos aparatos si los experimentos se prolongan por un tiempo suficiente.

Si el volumen de la cámara de cultivo es apreciable es necesario utilizar agitación mecánica para mantener uniforme la concentración de biomasa y evitar la sedimentación de las células, ya que generalmente el burbujeo de la mezcla gaseosa no es suficiente para conseguir este fin, Winokur (1948), Fogg y col. (1959).

Sin embargo, el principal problema en estos aparatos es el ya indicado de la variación de la intensidad de iluminación, por esta razón el diseño de la cámara de cultivo se suele hacer con vistas a un fácil cálculo de la distribución de luz en la misma, Tamiya (1953b). Este autor utiliza una cámara de cultivo de muy poco espesor en la dirección de propagación de la luz (2,8 cm), de volumen relativamente pequeño y por tanto sin agitación mecánica.

Evidentemente, solo la región previa a la zona lineal de crecimiento puede utilizarse con el fin de analizar la influencia de las variables de operación - sobre la velocidad específica de crecimiento, e incluso para la interpretación de estos datos será preciso conocer la distribución espacial de intensidades de iluminación.

Puesto que la velocidad específica de crecimiento será un valor medio para toda la cámara de cultivo, su relación con la distribución de luz en la misma vendrá dada por

$$\mu = \frac{1}{V_c} \iiint_{V_c} \mu [I(r)] dV \quad [2.8]$$

o por

$$\mu = \mu (I_m) \quad [2.9]$$

donde

$$I_m = \frac{1}{V_c} \iiint_{V_c} I(r) dV \quad [2.10]$$

dependiendo del grado de agitación de la suspensión de células y de la velocidad con que éstas se adaptan a la intensidad de iluminación local.

Por estas razones el desarrollo de expresiones para la intensidad media de iluminación, en fun-

ción de la geometría del sistema y de la intensidad de iluminación incidente, ha recibido considerable atención - por parte de los investigadores, Tamiya (1951), Rabe y Benoit (1962), Roger y Villiermaux (1975).

### 2.3.2 Influencia de la intensidad de iluminación

Las ecuaciones propuestas para relacionar la velocidad específica de crecimiento con la intensidad de iluminación, en un cultivo de algas limitado por la luz, han sido revisadas por Oorschot (1955) que las resume en el modelo discontinuo

$$\mu = \alpha I_0 \quad I_0 \leq I_s \quad [2.11]$$

$$\mu = \mu_m \quad I_0 \geq I_s \quad [2.12]$$

el modelo hiperbólico de Tamiya y col. (1953b)

$$\mu = \frac{\alpha \mu_m I_0}{\mu_m + \alpha I_0} \quad [2.13]$$

y el modelo exponencial

$$\mu = \mu_m \left( 1 - e^{-\frac{I}{I_s}} \right) \quad [2.14]$$

La comparación de los resultados experimentales de Oorschot sobre crecimiento de *Chlorella* y *Scenedesmus*, con las ecuaciones anteriores, pone de manifiesto que los dos primeros modelos indicados simplifican mu-

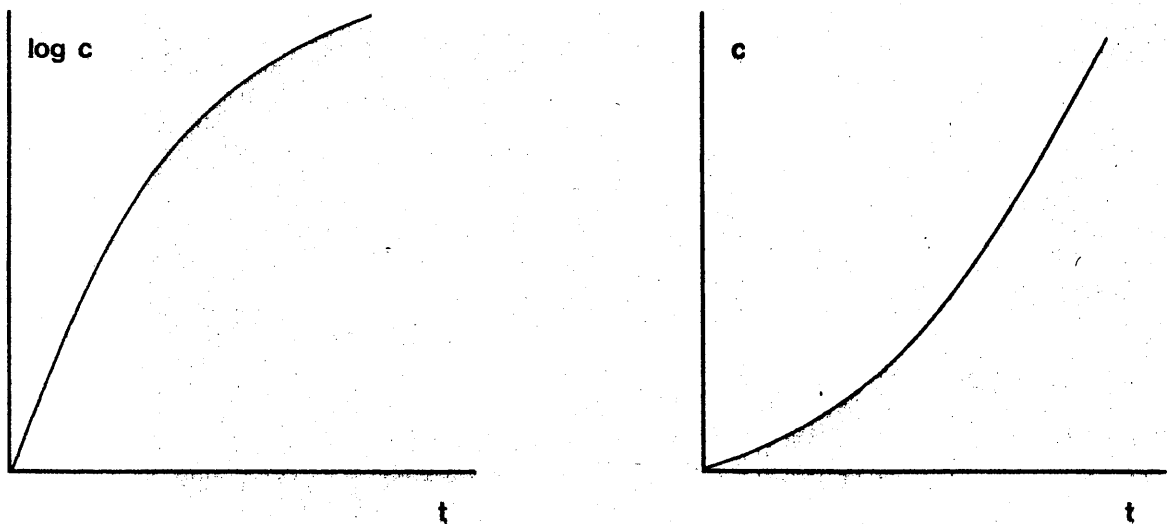
cho la realidad, en un caso por un paso demasiado brusco de la zona en que  $\mu$  es proporcional a  $I_0$  a la zona de  $\mu$  constante y en el otro por una transición demasiado lenta. Según este autor los resultados experimentales se encuentran en una situación intermedia entre el modelo discontinuo y el modelo exponencial.

Un resultado semejante puede deducirse de las curvas de irradiación de Myers (1946) y Phillips y Myers (1954b) como se verá posteriormente en la interpretación de resultados. Tanto los resultados de estos autores como los de Pipes y Koutsoyannis (1962) obtenidos en dispositivos de cultivo continuo, parecen ajustarse mejor a la ecuación exponencial indicada antes.

Por otra parte, Matthern, Kostick y Okada (1969), utilizando muy altas iluminaciones totales, de 25000 a 300000 lúmenes, en el estudio del crecimiento de *Chlorella* 7-11-05, en un dispositivo especial, que incorpora los conceptos básicos del fermentador aerobio para células heterotróficas al estudio de organismos autotróficos a altas intensidades de iluminación, que designan HILIS (high intensity light system), encuentran que la velocidad de crecimiento es función del logaritmo de la iluminación total; teniendo en cuenta que se trata de un aparato continuo (c constante) esto significa que los resultados de estos autores se ajustan a la ecuación exponencial.



Los investigadores que utilizan la técnica del cultivo discontinuo, tales como Winokur (1948), Algéus (1951), Tamiya y col. (1953b) y Sorokin y Krauss (1958), al representar los datos de concentración celular frente al tiempo obtienen gráficos como los que se indican en la siguiente figura



según se realice la representación en coordenadas semilogarítmicas o lineales.

La segunda forma de la figura anterior, corresponde en su parte recta a la zona lineal de crecimiento ya comentada anteriormente, mientras que la porción

recta inicial que se observa en la primera de las dos gráficas se designa como zona exponencial de crecimiento y es interpretada por Sorokin y por Tamiya admitiendo que en esa zona la concentración celular es lo suficientemente baja para que sean despreciables las sombras mutuas entre las células y la intensidad de iluminación pueda considerarse constante.

Tamiya, explica la aparición de las dos zonas características utilizando la ecuación hiperbólica para relacionar la velocidad específica de crecimiento con la intensidad de iluminación local y aplicando la ecuación [2.8] para deducir la velocidad específica de crecimiento media.

Conviene señalar sin embargo, que la explicación dada anteriormente, de Sorokin y Tamiya, sobre la existencia de la zona exponencial de crecimiento no parece consistente con los resultados de este último autor en lo que se refiere a la concentración de biomasa a la que acaba la zona exponencial. Así por ejemplo, para una intensidad de iluminación de 5000 lux, Tamiya indica que la zona exponencial acaba a una concentración celular de 0,5 ml / l de volumen empacado, si se tiene en cuenta que en esta investigación se utiliza una cámara de cultivo plana de 2,8 cm de espesor y que el coeficiente de extinción medido por Tamiya es de 0,41 l / ml cm, puede calcularse aplicando la ley de Beer que la intensidad de iluminación exis

tente en la cámara de cultivo variará desde 5000 lux en la superficie por la que penetra la luz hasta 2800 lux en la superficie por la que sale, variación considerablemente apreciable para que pueda despreciarse.

Información valiosa para llegar a comprender el mecanismo por el que tiene lugar la fotosíntesis suministran los experimentos con luz intermitente, es decir, alternando periodos de iluminación y de oscuridad - sobre la cámara de cultivo. Estos experimentos, Kok (1953), Phillips y Myers (1954b), ponen de manifiesto que la intermitencia determina un mayor aprovechamiento de la energía luminosa incidente, como si las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis fueran considerablemente más rápidas que las reacciones oscuras y la célula fuera capaz de absorber en cortos periodos de tiempo una energía que luego irá consumiendo poco a poco en la biosíntesis.

Los resultados cuantitativos de Phillips y Myers (1954b) sobre iluminación intermitente se considerarán más adelante en la interpretación de resultados. Es interesante, sin embargo, volver a insistir en que esta circunstancia puede permitir obviar en parte el inconveniente de la saturación de luz y que un proceso semejante a la intermitencia consiste en conseguir un grado de mezcla elevado en un cultivo denso, Burlew (1953), Holland (1969).

### 2.3.3 Cultivo sincrónico

En la mayor parte de los trabajos de investigación comentados anteriormente se utilizan poblaciones de células que se encuentran en distinto grado de desarrollo, es decir, que tienen diferentes edades, entendiendo por edad el tiempo transcurrido desde la división anterior. Con objeto de analizar si la velocidad de fotosíntesis y por tanto el crecimiento, cambian durante el curso del ciclo normal de vida de las células es preciso utilizar cultivos sincrónicos en el que la mayor parte de las células tengan la misma edad.

Es evidente que en un cultivo industrial interesa la velocidad media de crecimiento, ya que en un proceso continuo existirán normalmente células de todas las edades posibles de acuerdo con una distribución estadística, sin embargo los cultivos sincrónicos pueden suministrar información muy valiosa para profundizar en el mecanismo y velocidad de la fotosíntesis.

Tamiya y col. (1953a) y Nihei y col. (1954) distinguen dos tipos de células de características diferentes: las llamadas "células oscuras" (dark cells) de pequeño tamaño y ricas en clorofila que manifiestan una gran actividad fotosintética y las "células claras" (light cells). Cuando se suministran nutrientes y luz a las células oscuras aumentan de tamaño hasta convertirse en célu-

las claras, las cuales posteriormente se dividen en un cierto número de células oscuras. La división no implica incremento en masa celular y tiene lugar solo bajo condiciones aerobias, independientemente de que las células se encuentren iluminadas o en la oscuridad.

Según estos autores, el proceso de crecimiento global del alga tiene lugar por la repetición de este cambio mutuo entre los dos tipos de células. De esta manera es posible separar experimentalmente los dos aspectos esenciales del crecimiento: el incremento en masa y el incremento en número de células.

Sin embargo, la mayor parte de la información de que se dispone sobre cultivos sincrónicos de *Chlorella* ha sido suministrada por Sorokin (1960a) y Sorokin y Krauss (1962 y 1965) que utilizan la cepa de alta temperatura de *Chlorella Pyrenoidosa* 7-11-05 y consiguen un cultivo sincrónico por un régimen intermitente luz-oscuridad a 39°C de la siguiente forma: durante 9 horas se ilumina el cultivo con una intensidad de 21500 lux y a continuación durante 15 horas se mantiene en oscuridad total. Estos autores comprueban que después de tres o cuatro ciclos y al final del último periodo de oscuridad las células eran en más del 99% células pequeñas jóvenes, recién divididas.

Los resultados obtenidos indican una -

amplia variación de la actividad metabólica de las células durante su ciclo de vida, aunque esta actividad se refiera al contenido en clorofila, en contra de la hipótesis de Bongers de que la actividad fotosintética durante el desarrollo de las células permanecería constante si se refiriera a los componentes de la misma fotosintéticamente-activos. Utilizando estos cultivos sincrónicos, Sorokin y Krauss estudian la influencia de la intensidad de iluminación y temperatura sobre el crecimiento y sobre la división celular independientemente, los resultados obtenidos indican una mayor sensibilidad de la división celular a altas intensidades de iluminación, este hecho puede ser responsable en parte de la limitación del crecimiento en cultivos asincrónicos sometidos a altas intensidades de iluminación, ya que se inhibe la división celular y las células grandes de edad avanzada tienen una baja actividad metabólica. Esta hipótesis está de acuerdo con las altas velocidades de crecimiento observadas por estos autores en cultivos sincrónicos de células jóvenes y con el hecho de que la intensidad de iluminación correspondiente a la saturación sea considerablemente más alta para los cultivos sincrónicos que para los asincrónicos.

También han trabajado con cultivos sincrónicos de *Chlorella Hase* y Morimura (1971) y Galloway y col. (1974).

#### 2.3.4 Adaptación a los cambios de iluminación

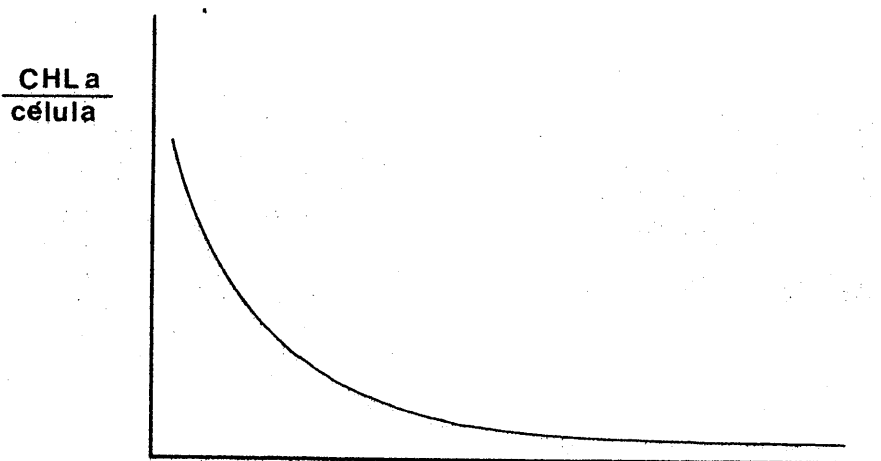
Se entiende por adaptación el ajuste fisiológico a un cambio en las condiciones ambientales. Es bien conocido que las algas unicelulares son capaces de adaptarse a diferentes intensidades de iluminación, normalmente variando la velocidad de síntesis de los pigmentos fotosintéticos.

Myers y Graham (1959) estudian el contenido en clorofila de *Chlorella Ellipsoidea* creciendo bajo diferentes intensidades de iluminación en un aparato de cultivo continuo, sus resultados parecen indicar que el contenido en clorofila es casi inversamente proporcional a la intensidad de iluminación en el intervalo estudiado por estos autores.

Nielsen y Jorgensen (1962) han estudiado la adaptación de *Chlorella* a cambios bruscos de la intensidad de iluminación desde 3 a 30 klux y viceversa, encontrando que esta adaptación es un proceso lento que tiene lugar simultáneamente con el crecimiento y que se verifica por ajuste de la velocidad de síntesis de clorofila. Así, cuando células creciendo bajo una intensidad de iluminación de 3 klux se someten bruscamente a 30 klux el contenido en clorofila por unidad de peso seco disminuye a casi la mitad en las primeras 24 horas, puesto que el peso seco se ha incrementado en este tiempo por un factor de -

3,5 la síntesis de clorofila durante este periodo habrá - sido pequeña. Por el contrario, cuando se cambia bruscamente de 30 klux a 3 klux el contenido en clorofila por unidad de peso seco durante las primeras 24 horas se incrementa por un factor de 2 lo que significa que la producción de clorofila durante este periodo ha sido el doble que durante el crecimiento a 3 klux.

En un trabajo posterior de estos autores (1968), se estudia la adaptación de *Chlorella Pyrenoidosa* a intensidades de iluminación variables entre 0,32 y 21 klux. Los análisis del contenido en clorofila del alga ponen de manifiesto que ésta se adapta a las diferentes intensidades de iluminación variando la cantidad de pigmentos por célula. Por ejemplo, las algas creciendo a 1 klux tienen cerca de 10 veces más clorofila por célula que las que crecen a 21 klux. En la siguiente figura, se indica de manera cualitativa la variación del contenido en clorofila a por célula, en el intervalo de intensidades de iluminación antes indicado, encontrada por estos autores:





debe tenerse presente que el intervalo de intensidades de iluminación explorado por estos autores corresponde a una variación de aproximadamente 70 veces en el valor de I, - mientras que Myers y Graham (1959) varían la intensidad - de iluminación poco más de 4 veces. Es evidente, por tanto, que los resultados de ambos grupos de investigadores son consistentes.

A conclusiones semejantes llega Simmer (1969), sometiendo un cultivo de *Scenedesmus Obliquus* a - cambios bruscos de iluminación y Beale y Appleman (1971)- que encuentran que el contenido en clorofila de *Chlorella* es el factor limitante del crecimiento como ocurre en los cultivos densos, cuando las algas crecen bajo pequeña iluminación e incluso cuando la luz es usada con menor eficacia por inhibición parcial de la fotosíntesis con 3-(p-clorofenil)-1,1 dimetilurea.

### 2.3.5 Influencia de la temperatura en cultivos limitados por la luz

Las ecuaciones anteriormente indicadas para ajustar los datos de las curvas de irradiación tienen la característica común de que la velocidad específica de crecimiento aumenta continuamente con la intensidad de iluminación tendiendo, más o menos rápidamente, a un valor máximo constante  $\mu_m$ . Sin embargo, los resultados experimentales indican que muy altas intensidades de ilumina-

ción pueden inhibir el crecimiento de las algas, un modelo típico que tiene en cuenta este hecho es el propuesto por Steele (1977)

$$\mu = \mu_m \frac{I}{I_m} e^{\left(1 - \frac{I}{I_m}\right)} \quad [2.15]$$

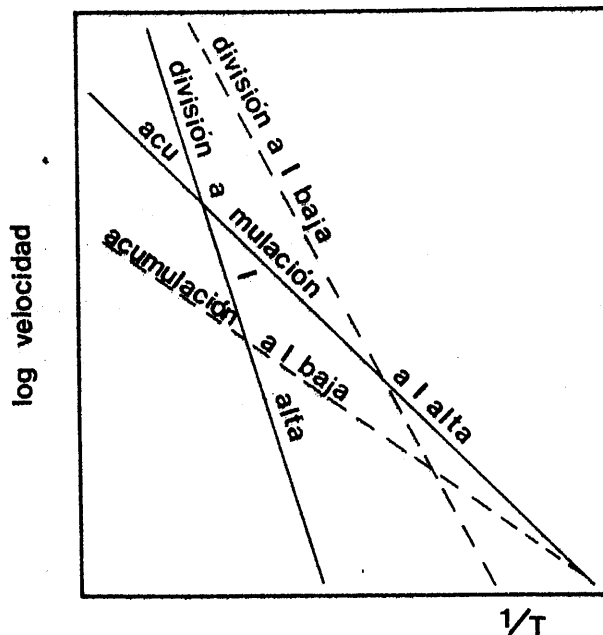
donde  $I_m$  representa la intensidad a la cual la velocidad-específica de crecimiento alcanza su valor máximo.

No obstante, hasta intensidades de iluminación próximas a la luz plena del sol solo se observa de manera apreciable la disminución de la velocidad específica de crecimiento con la intensidad de iluminación, a temperaturas bajas. En efecto, Tamiya y col. (1953b) en sus experimentos con *Chlorella Ellipsoidea* encuentran que a  $7^{\circ}\text{C}$  el crecimiento es disminuido muy apreciablemente al aumentar la intensidad de iluminación por encima de 5000-lux, mientras que a 15 y  $25^{\circ}\text{C}$  no se observa efecto negativo de  $I$  hasta 50000 lux.

Un resultado semejante es observado por Sorokin y Krauss (1962) en el estudio de la influencia combinada de la temperatura y la iluminación sobre el crecimiento de *Chlorella Pyrenoidosa* 7-11-05 en cultivo sincrónico. Estos autores encuentran disminución apreciable de la velocidad específica de crecimiento al aumentar la intensidad de iluminación a las temperaturas de 10, 15 y -

20°C, además la disminución empieza a apreciarse a intensidades más bajas cuanto menor es la temperatura. Sin embargo, a temperaturas superiores a 25°C no se observa este efecto en el mismo intervalo de intensidades de iluminación.

La explicación de estos hechos es difícil en cultivos asincrónicos en los que los resultados observados son consecuencia de la influencia combinada de la iluminación y la temperatura sobre los dos aspectos del crecimiento: la acumulación de material celular y la división. De acuerdo con Sorokin (1960b) el aumento de la intensidad de iluminación favorece la acumulación de material celular, pero sobre todo al aumentar la temperatura hasta su valor óptimo, mientras que perjudica la división celular sobre todo a temperaturas bajas. Estas consideraciones de tipo cualitativo se indican de una manera gráfica en la siguiente figura, tipo Arrhenius



La interacción entre los dos factores que se están considerando:iluminación y temperatura es in dudablemente muy fuerte y el efecto de cualquiera de ellos sobre la velocidad de crecimiento está apreciablemente in fluido por el valor del otro.Por esta razón ha recibido - gran atención por parte de los investigadores, así Halldal y French (1958) proponen un dispositivo experimental en - el que se establecen gradientes cruzados de temperatura e iluminación con el fin de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de diferentes algas;McCombie (1960) estudia las interacciones de estos dos factores en el crecimiento del alga verde Chlamydomonas Reinhardi y Maddux y Jones (1964) para Nitzschia Closterium y Tetraselmis.

### 2.3.6 Cinética y mecanismo de la fotosíntesis

Es bién conocido que la fotosíntesis - implica dos clases de procesos:procesos fotoquímicos y - procesos enzimáticos.La velocidad de los procesos fotoquí micos depende de la absorción de luz por los pigmentos foto sintéticos, y por tanto de la concentración de estos pigmen tos y de la intensidad de iluminación,mientras que la- velocidad de los procesos enzimáticos dependerá de la concent ración de enzimas activas y de la temperatura.

Aunque en la fotosíntesis hay dos fotore acciones y dos sistemas de pigmentos y los procesos enzim áticos son también de gran complejidad,se han propues-

to mecanismos simplificados para tratar de explicar la cinética global de la fotosíntesis, entre los cuales uno de los más sencillos es el propuesto por Lumry y Rieske (1959), que se utiliza más adelante en la interpretación de los resultados.

Usualmente, las investigaciones sobre el mecanismo de la fotosíntesis se llevan a cabo con cloroplastos aislados más que con células y desde el punto de vista del estudio del crecimiento de las algas para su aplicación industrial, el interés de estos mecanismos radica en que pueden suministrar modelos matemáticos para representar el crecimiento, Belyanin y col. (1968), Govindjee y col. (1968), Wren y col. (1972). Por esta razón se utiliza generalmente el mecanismo simplificado de la fotosíntesis en dos etapas, una de carácter fotoquímico y otra de caracter enzimático.

## 2.4 OBJETO DE LA PRESENTE INVESTIGACION

La presente investigación constituye - el primer trabajo en una línea iniciada en el departamento de Química Técnica en 1976, con vistas a estudiar el aprovechamiento industrial de la energía solar mediante al gas unicelulares.

En primer lugar, por tratarse de una línea de investigación nueva, en nuestro departamento, se llevó a cabo un estudio bibliográfico lo más exhaustivo posible sobre el tema, que se ha ido actualizando en los últimos años.

En segundo lugar, era preciso diseñar y montar una instalación de laboratorio que permitiera el - control preciso de las variables de operación, fundamentalmente, en esta primera etapa, de la intensidad de ilumina--ción. Así como poner a punto las técnicas de medida y análisis necesarias.

Puesto que con vistas a su aprovecha-- miento industrial, los cultivos de algas han de ser necesariamente densos por razones económicas, y dada la apreciable atenuación de la intensidad de iluminación en los mismos, la atención se dirigió en primer lugar a la medida de la distribución de las intensidades de iluminación puntales en el medio de cultivo, coeficientes de extinción y co



rrelaciones que permitieran evaluar la intensidad media - de iluminación.

A continuación se trataba de analizar la influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad de crecimiento y recoger información suficiente - sobre la influencia de la agitación o turbulencia con el fin de obviar en parte el problema de saturación de luz.

Finalmente era preciso analizar la influencia de la temperatura en un rango próximo a la temperatura ambiente.

Disponiendo de la instalación de laboratorio para analizar las restantes variables, tales como composición del medio de cultivo y caudal y composición - de la fase gaseosa, junto con la información obtenida hasta el momento se considera posible el diseño y montaje de una instalación planta piloto externa, cuya utilización sería la continuación de este trabajo.

## DESCRIPCION DE LA ANIMACION

### **3. TECNICA EXPERIMENTAL**



que se realice, evaluar la intensidad de la  
inacción.

La metodología de trabajo de análisis  
de la información de la ilustración sobre la  
de crecimiento y mejorar la información suficiente  
y suficiente de la información y turbulencia con  
objetar en base a la prohibición de la

El siguiente documento se puede analizar la  
de la temperatura en un caso concreto a la temperatura  
ambiente.

ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

El análisis de la información de la información  
para analizar las variables variables, tales como  
ción del medio de cultivo y la temperatura y compacidad  
de la muestra, junto con la información obtenida por  
caso se considera prohibido el diseño y desarrollo de  
nuestro plan de trabajo, para la realización de  
continuación de este trabajo.

### 3.1 DESCRIPCION DE LA INSTALACION

La elección del emplazamiento de la - instalación para el estudio cinético del crecimiento estuvo basada en criterios de control de las variables a estudiar. Por ello se utilizó un cuarto oscuro interior donde la temperatura ambiental permanecía practicamente constante a lo largo del año y la iluminación existente solo era artificial. Esto facilitaba las condiciones de termostatación y el que la iluminación incidente sobre las células fuera solo debido a las lámparas colocadas exprofeso.

En la figura 3.1 se ha representado esquemáticamente la instalación. A continuación se describen los elementos que la forman y su funcionamiento.

- a) Aire: El aire procedente de la habitación se introduce en el montaje mediante el compresor -1- SIROCCO mod. C1 con regulador de caudal, pasa a través de un filtro -2- de algodón hidrófobo con objeto de eliminarle impurezas en suspensión, mediante una unión en T colocada en la conducción se permite entrar al aire en una columna estabilizadora -3- conteniendo agua, lo que posibilita conocer su presión de salida y la pérdida de carga originada por la instalación. A continuación se mide el -- caudal mediante el diafragma de vidrio -4- y entra en el depósito -5- donde se mezcla con el dióxido de carbono y se humidifica. La humidificación se realiza a -

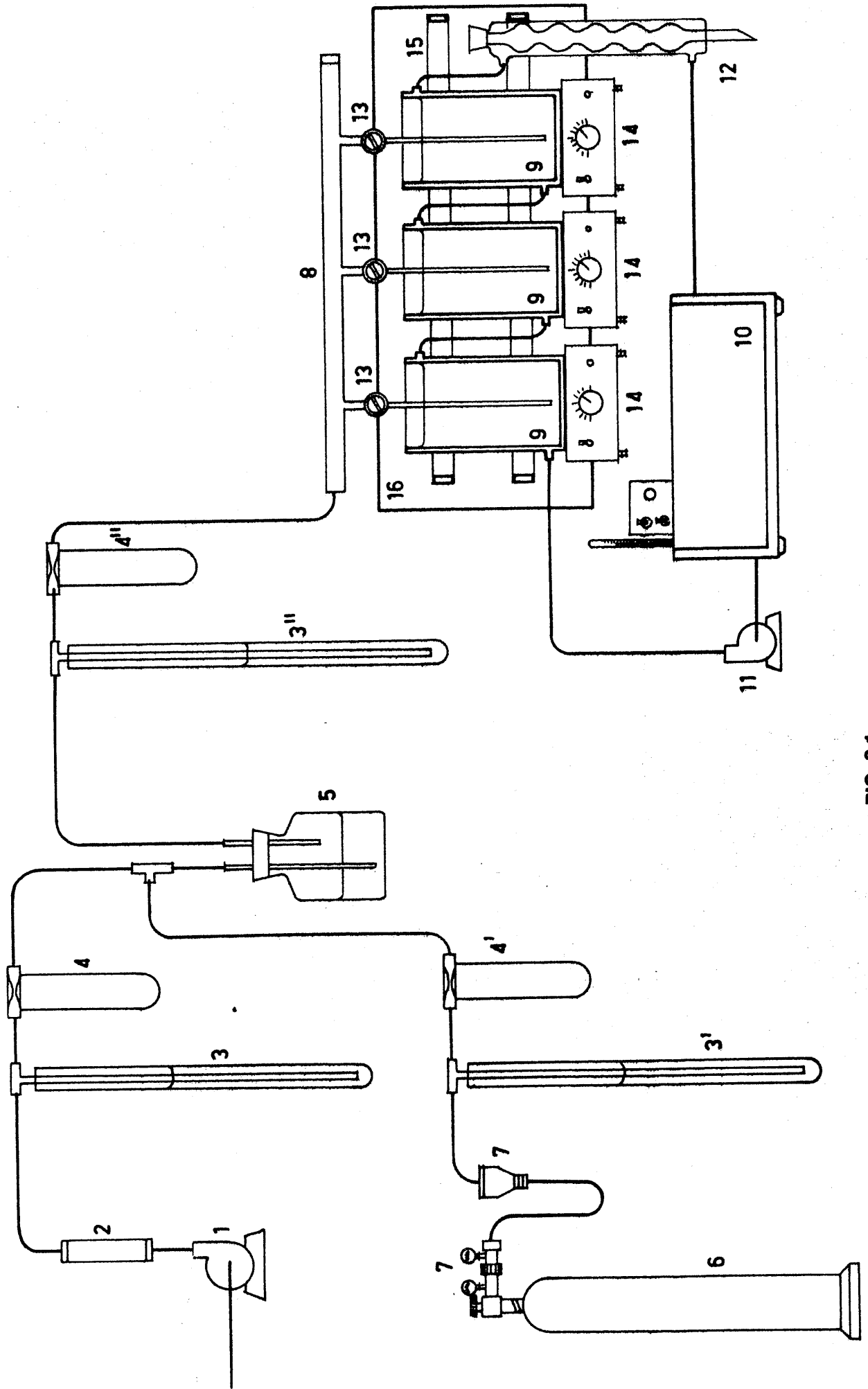


FIG 3.1

fin de evitar en lo posible las pérdidas posteriores - de medio de cultivo debidas al burbujeo en los vasos - de crecimiento.

b) Dióxido de carbono: El dióxido de carbono proviene de - la bala -6- a la que se han conectado dos manorreductores -7- en serie con objeto de conseguir un control fino del caudal, entra en la columna estabilizadora -3'- y a la salida de ésta se mide su caudal mediante el - diafragma -4'- entrando ya en el depósito -5- donde se humidifica haciéndolo burbujear sobre agua y se mezcla con el aire.

c) Mezcla gaseosa: La mezcla gaseosa aire-dióxido de carbono formada sale del depósito -5- pasa por una columna-estabilizadora -3''- y un medidor de caudal -4''-. Es--tas medidas nos proporcionan un mayor control de la fase gaseosa y finalmente se introduce en los vasos de - crecimiento -9- mediante el distribuidor de gases -8--.

De acuerdo con el estudio bibliográfi-  
co realizado se utilizó una mezcla gaseosa con 5% en -  
volumen de  $CO_2$  y con un caudal de 500 ml/l/min, condiciones  
óptimas para el crecimiento de las algas que aseguran  
la no limitación del crecimiento por este nutriente.

d) Fluido termostático: Dado el intervalo de temperaturas

utilizado se empleó agua como fluido termostático. En el baño del termostato -10- HETO mod. 01T623 se mantenía el agua a la temperatura seleccionada para cada experimento.

El agua del baño se hace circular mediante la bomba centrífuga -11- por la camisa de los tres vasos de cultivo que están conectados en serie y retorna al baño -10-.

Cuando se trabaja a temperaturas próximas a la ambiente y a fin de conseguir una mayor estabilidad de la temperatura de trabajo, el agua de retorno es enfriada haciéndola pasar a través de un refrigerante -12- antes de introducirse en el baño termostático -10-.

- e) Distribuidor de gases: Con objeto de conseguir que el caudal de gas en cada uno de los tres vasos de cultivo sea aproximadamente el mismo, se regula la pérdida de carga de las tres ramas del distribuidor -8- con las válvulas -13-.
- f) Vasos de cultivo: El crecimiento ha tenido lugar en tres vasos -9-, idénticos diseñados para este trabajo y consistentes en dos cilindros concéntricos. El cilindro interno va abierto por su parte superior, el cilindro externo va soldado por su parte superior al cilindro in-

terno a fin de formar la camisa, en la que mediante una entrada inferior y una salida superior va a circular - el agua de termostatación.

Las características geométricas de estos cilindros se indican en la siguiente tabla:

| <u>cilindro</u> | <u>diámetro interno</u> | <u>altura</u> |
|-----------------|-------------------------|---------------|
| interno         | 7,5 cm                  | 24 cm         |
| externo         | 9,5 cm                  | 25 cm         |

g) Agitación: La agitación suministrada por el burbujeo de la mezcla gaseosa en el medio de cultivo es reforzada por la acción de tres agitadores magnéticos -14- SELEC TA mod. Agimatic situados debajo de los tres vasos de cultivo.

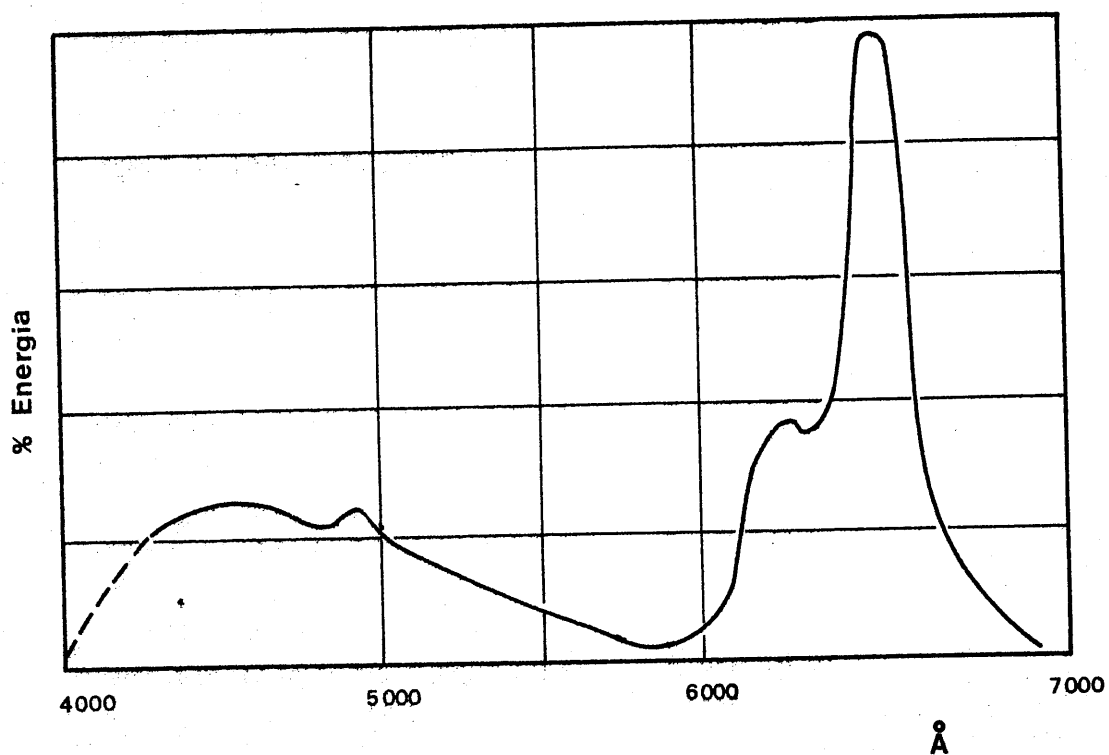
h) Iluminación: La iluminación es proporcionada por dos - lámparas fluorescentes WESTHINGHOUSE PLANT-GRO mod. F 40/GRO especiales para crecimiento, por emitir la mayor parte de su luz a longitudes de onda correspondientes a las zonas roja y azul del espectro.

Las características técnicas de estas lámparas se indican en la siguiente tabla

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| Potencia nominal (vatios) ..... | 40   |
| Longitud nominal (metros) ..... | 1,22 |

Horas de vida, aproximadas ..... 12000

En la figura 3.2 se ha representado un esquema de la distribución espectral de la luz suministrada por estas lámparas.



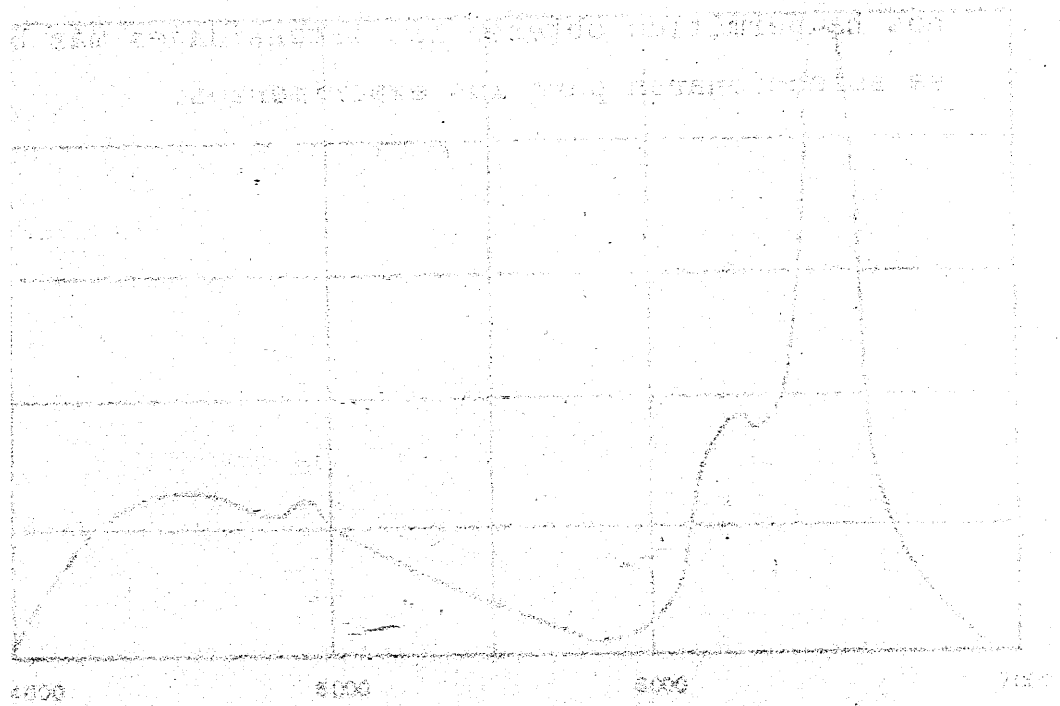
En la instalación, las lámparas van montadas en un panel móvil -16-, lo que permite acercarlas o alejarlas a los vasos de cultivo -9- según la intensidad de iluminación requerida.

Para conseguir intensidades de iluminación bajas se han construido unos paneles de tela metálica de distinta luz de malla enmarcada en madera y pintado el conjunto de negro mate. La interposición de estos paneles entre la fuente luminosa y los vasos de cultivo, bien de uno en uno o formando combinaciones, nos ha permitido obtener las intensidades más bajas que se seleccionaron para los experimentos.



...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...

...  
 ...  
 ...  
 ...  
 ...



### 3.2 PROCEDIMIENTO

- a) Conservación de cultivos stock: El almacenamiento de las algas se lleva a cabo en tubos de ensayo de 100 cc de capacidad, llenos con 20 cc de una disolución conteniendo medio de cultivo y bacto-agar DIFCO al 2% en peso, obtenida calentando hasta comienzos de ebullición. La disolución se esteriliza en un autoclave TD mod. alto durante media hora a  $1,5 \text{ kg/cm}^2$  ( $111^\circ\text{C}$ ) y solidifica por enfriamiento hasta temperatura ambiente. La solidificación se realiza en posición inclinada para aumentar la superficie de inoculación.

El pH del medio de cultivo antes de la esterilización se ajusta a 7 para evitar una posible pérdida del poder gelificante del agar si se esteriliza en medio ácido.

La inoculación se realiza en condiciones estériles mediante asa de platino flameando la boca de los tubos, se sigue la técnica de inoculación en zig-zag.

Las células originales de *Chlorella Pyrenoidosa* fueron suministradas por el Instituto Gregorio Marañón del C.S.I.C.

Los tubos inoculados pasan a la habita

ción de cultivo donde se mantienen a la temperatura ambiente y en régimen de iluminación continua.

La viabilidad de los organismos se mantiene por inoculación a medio fresco periódicamente.

- b) Preparación del medio de cultivo: El medio de cultivo utilizado en este trabajo ha sido el medio A propuesto por Rodríguez-López M. (1964). La composición del medio de cultivo se indica en la tabla 3.1.

El medio de cultivo se prepara a partir de unas disoluciones madres previamente preparadas y que se mantienen en nevera para evitar contaminaciones, salvo la solución D porque precipita en frío. Los constituyentes y concentraciones de estas disoluciones madres se indican en la tabla 3.2.

Un litro de medio de cultivo se preparaba de acuerdo con el siguiente esquema.

|                  |        |
|------------------|--------|
| Solución A ..... | 100 cc |
| Solución B ..... | 10 cc  |
| Solución C ..... | 10 cc  |
| Solución D ..... | 1 cc   |
| Solución E ..... | 1 cc   |
| Solución F ..... | 1 cc   |

TABLA 3.1

| <u>Macronutrientes</u>                               | <u>Concentración, g/l</u>      |
|--|--------------------------------|
| $\text{KNO}_3$                                       | 1,011                          |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 1,631                          |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | 0,078                          |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0,247                          |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$            | 0,015                          |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0,007 (complejado con<br>EDTA) |
| <u>Micronutrientes</u>                               | <u>Concentración, p.p.m.</u>   |
| Mn   | 0,06                           |
| Zn   | 0,07                           |
| Cu   | 0,06                           |
| B  | 0,01                           |
| Mo   | 0,001                          |

TABLA 3.2

| <u>Solución</u> | <u>Nutriente</u>  | <u>Concentración, g/l</u> |
|-----------------|---|---------------------------|
| A               | $\text{KNO}_3$  | 10,111                    |
|                 | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$                | 16,310                    |
|                 | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                 | 0,780                     |
| B               | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                           | 24,650                    |
| C               | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                           | 1,470                     |
| D               | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                           | 7,000                     |
|                 | EDTA  | 9,300                     |
| E               | $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$                           | 0,170                     |
|                 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                           | 0,290                     |
|                 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                           | 0,250                     |
| F               | $\text{H}_3\text{BO}_3$   | 0,061                     |
|                 | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,013                     |

Agua destilada hasta 1000 cc.

El pH del medio se leía mediante un pH metro BECKMAN mod.H-5 y se ajustaba en los experimentos de crecimiento a 6,5.

- c) Precultivo: Antes de dar comienzo los experimentos se cultivan las algas en medio sólido. Para ello y en condiciones estériles se inoculan 10 tubos de medio y se sitúan en la habitación de cultivo a temperatura ambiente e iluminación continua.

La duración de este periodo es de cuatro días para todos los experimentos obteniéndose así cantidad suficiente de biomasa.

- d) Preparación del inóculo líquido: El inóculo líquido del que se parte para cada experimento está formado por una suspensión de las células del precultivo.

Transcurridos los cuatro días señalados y en condiciones no estériles se suspenden las células mediante la adición de medio de cultivo líquido a los tubos del precultivo. La suspensión se consigue agitando suavemente los tubos a fin de no arrastrar partículas de agar y se concentra pasándola sucesivamente por los 10 tubos inoculados. Una vez obtenido el inóculo líquido se determina su concentración y se calcula el vo

lumen necesario para partir en todos los experimentos de crecimiento de concentraciones similares, aproximadamente 0,008 g/l.

- e) Inoculación al medio de cultivo: Preparado el inóculo líquido se procede a la inoculación del medio de cultivo total a utilizar, que en todos los experimentos ha sido de 1500 cc. La inoculación que consiste en el vertido del inóculo concentrado en el medio de cultivo se realiza en un recipiente distinto de los reactores, esto tiene por objeto trabajar en esos momentos con volúmenes grandes a fin de que los errores de pipeteo del inóculo concentrado sean lo más pequeños posibles.

Acabada la inoculación, se agita la nueva suspensión durante unos minutos para que se homogeneice y se divide en tres porciones de 500 cc; cada una de ellas es introducida en un vaso en los que previamente se ha ajustado la temperatura y la intensidad de iluminación incidente. Se regulan los caudales de los componentes de la mezcla gaseosa y finalmente se conectan los agitadores magnéticos situados en la base de los vasos de cultivo.

La duración del periodo de crecimiento varió según los experimentos desde 60 a 288 horas y la frecuencia de toma de muestras desde intervalos de 2 horas a intervalos de 9 a 15 horas.

### 3.3 MEDIDA DE CAUDALES

Para la medida de los caudales de aire, dióxido de carbono y mezcla se utilizaron diafragmas de vidrio conectados a un manómetro diferencial multiplicador de dos líquidos agua y alcohol amílico coloreado con yodo.

El uso de tales manómetros tuvo por objeto el obtener una mayor precisión en el ajuste de los - relativamente bajos caudales de trabajo.

Los diafragmas se calibraron midiendo las diferencias de altura manométrica  $\Delta h$  que originaban el paso de caudales conocidos de aire,  $\text{CO}_2$  y mezcla mediante un medidor de burbuja conectado en serie con la instalación.

Los resultados obtenidos en este calibrado se recogen en la tabla 3.3 donde también se indican los coeficientes de regresión de  $\log Q$  frente a  $\log \Delta h$  y se representan en las figuras 3.3, 3.4 y 3.5.



TABLA 3.3

| <u>CO<sub>2</sub></u> |                  | <u>Aire</u>   |                  | <u>Mezcla</u> |                  |
|-----------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| <u>Δh, mm</u>         | <u>Q, cc/min</u> | <u>Δh, mm</u> | <u>Q, cc/min</u> | <u>Δh, mm</u> | <u>Q, cc/min</u> |
| 11                    | 22               | 7             | 227              | 7             | 293              |
| 21                    | 40               | 47            | 822              | 15            | 586              |
| 29                    | 56               | 87            | 1166             | 29            | 944              |
| 39                    | 62               | 127           | 1453             | 33            | 1078             |
| 46                    | 79               | 167           | 1724             | 43            | 1328             |
| 57                    | 85               | 207           | 1974             | 52            | 1475             |
| 97                    | 132              | 250           | 2143             | 61            | 1661             |
| 126                   | 156              | --            | --               | 68            | 1798             |
| --                    | --               | --            | --               | 77            | 1983             |
| --                    | --               | --            | --               | 87            | 2142             |
| --                    | --               | --            | --               | 95            | 2260             |
| $r^2 = 0,992$         |                  | $r^2 = 0,998$ |                  | $r^2 = 0,997$ |                  |

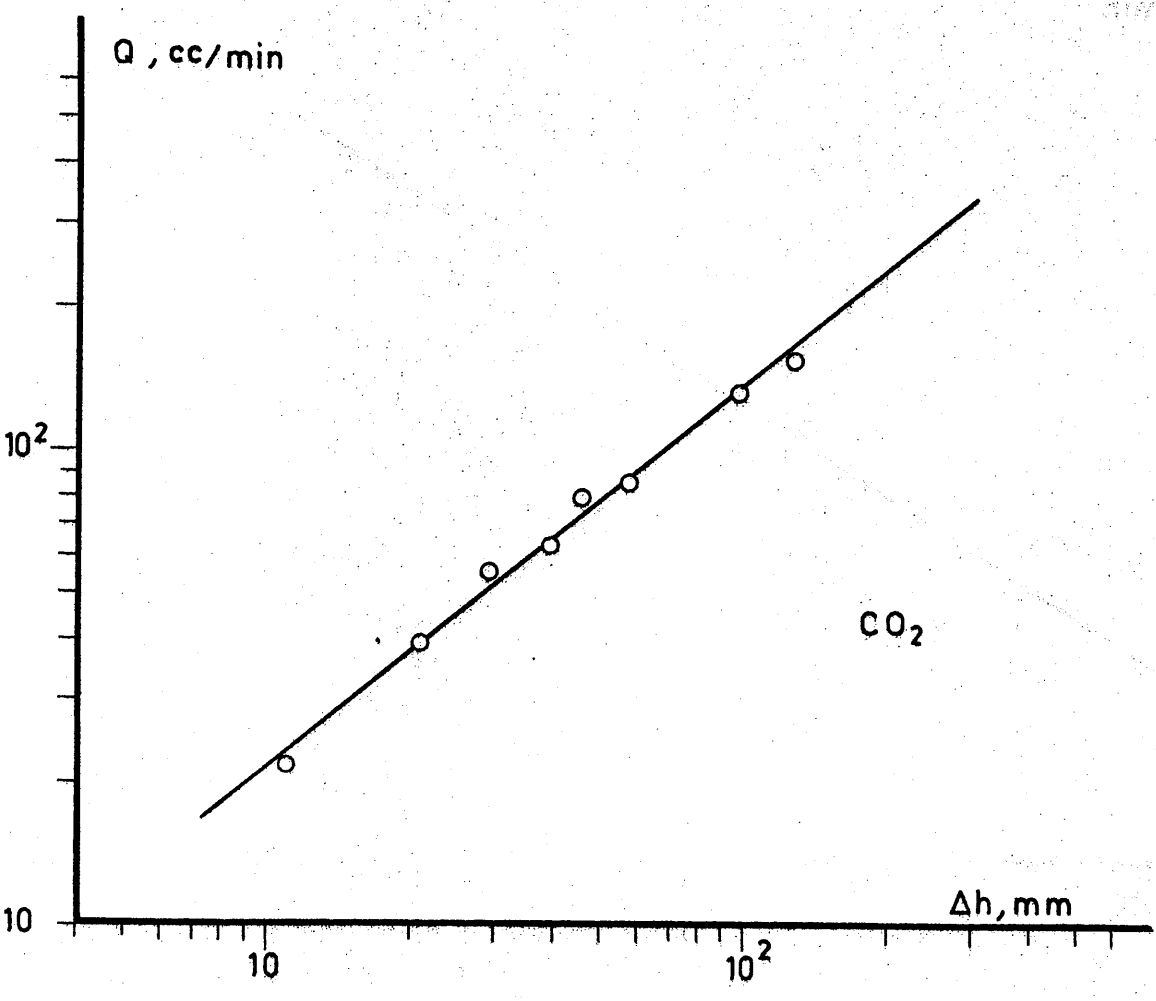


FIG 3.3

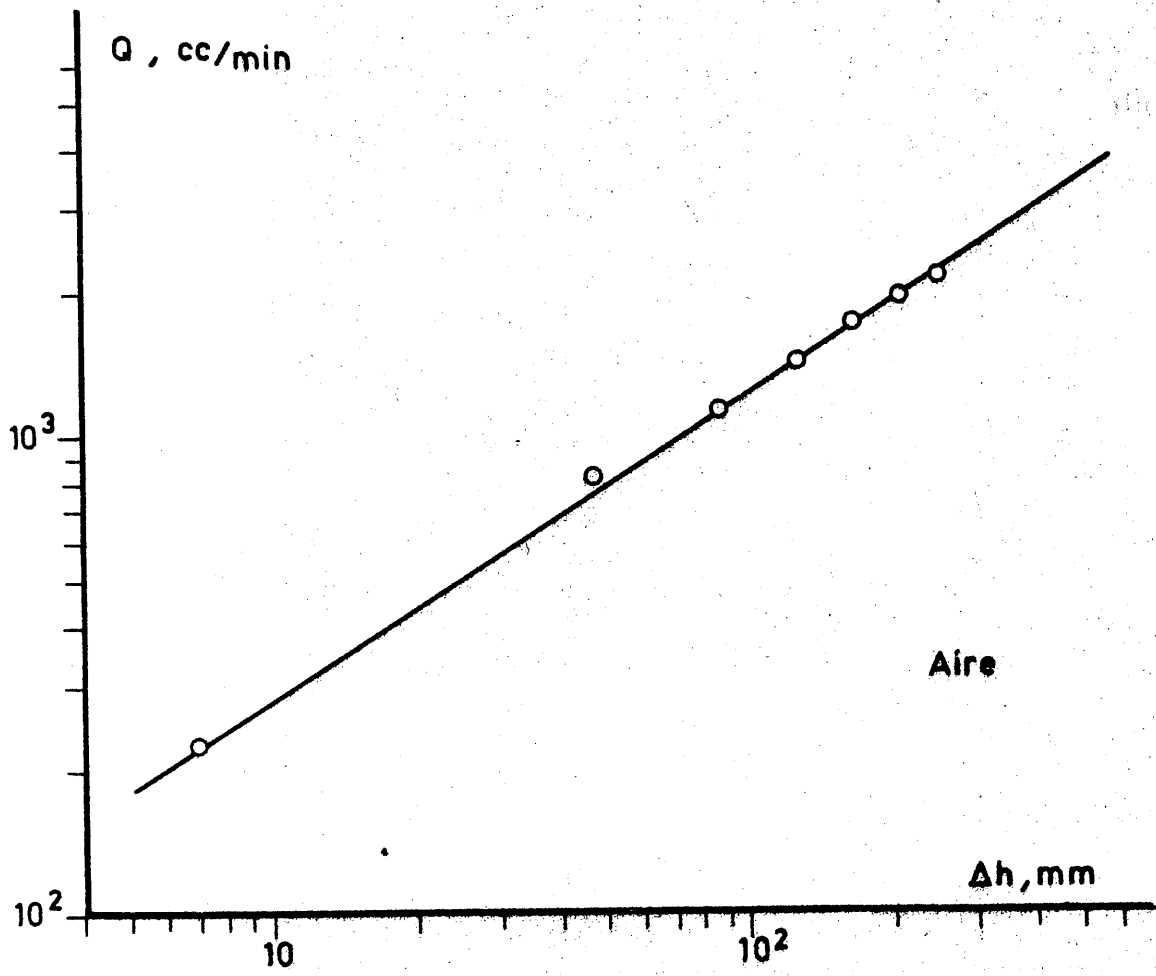


FIG 3.4

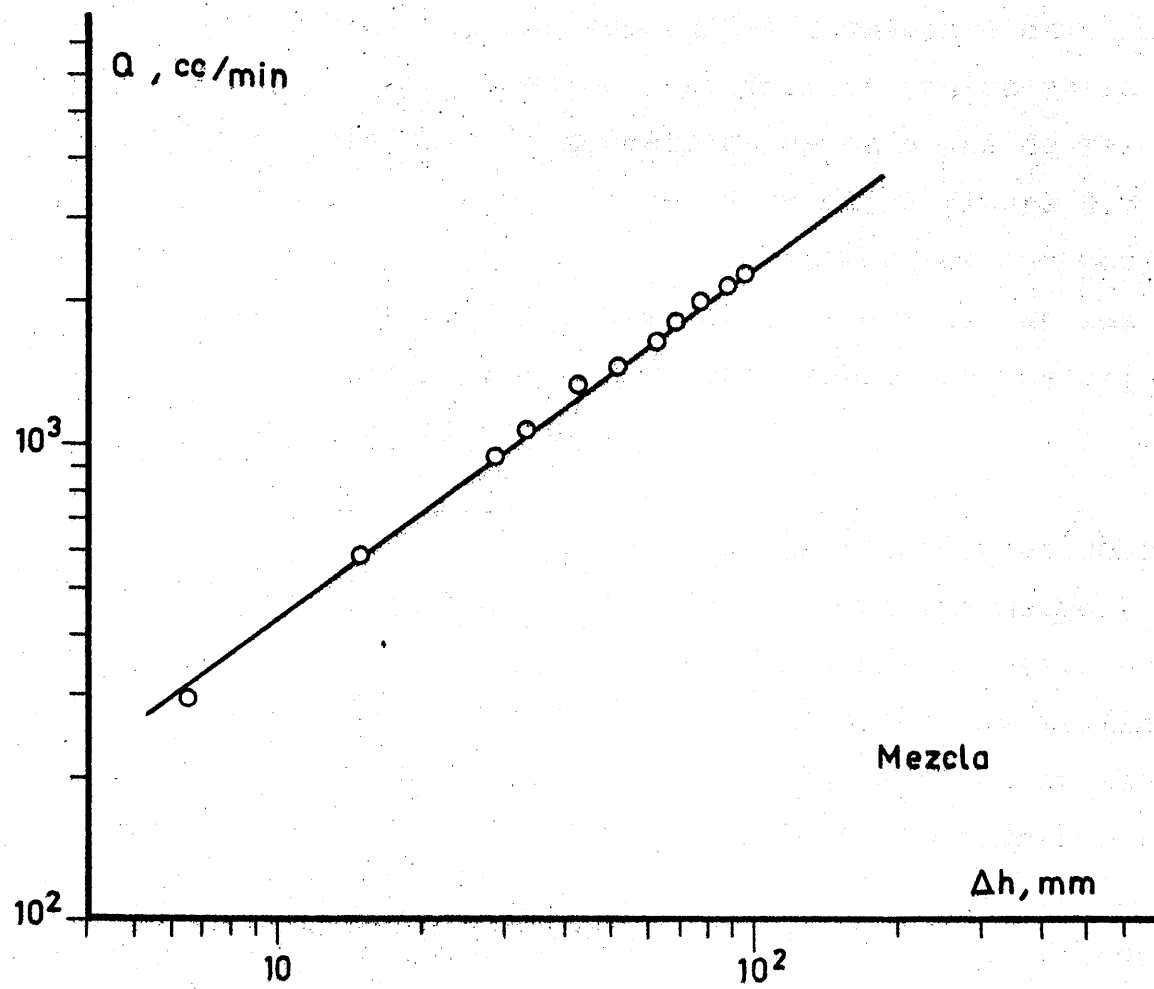
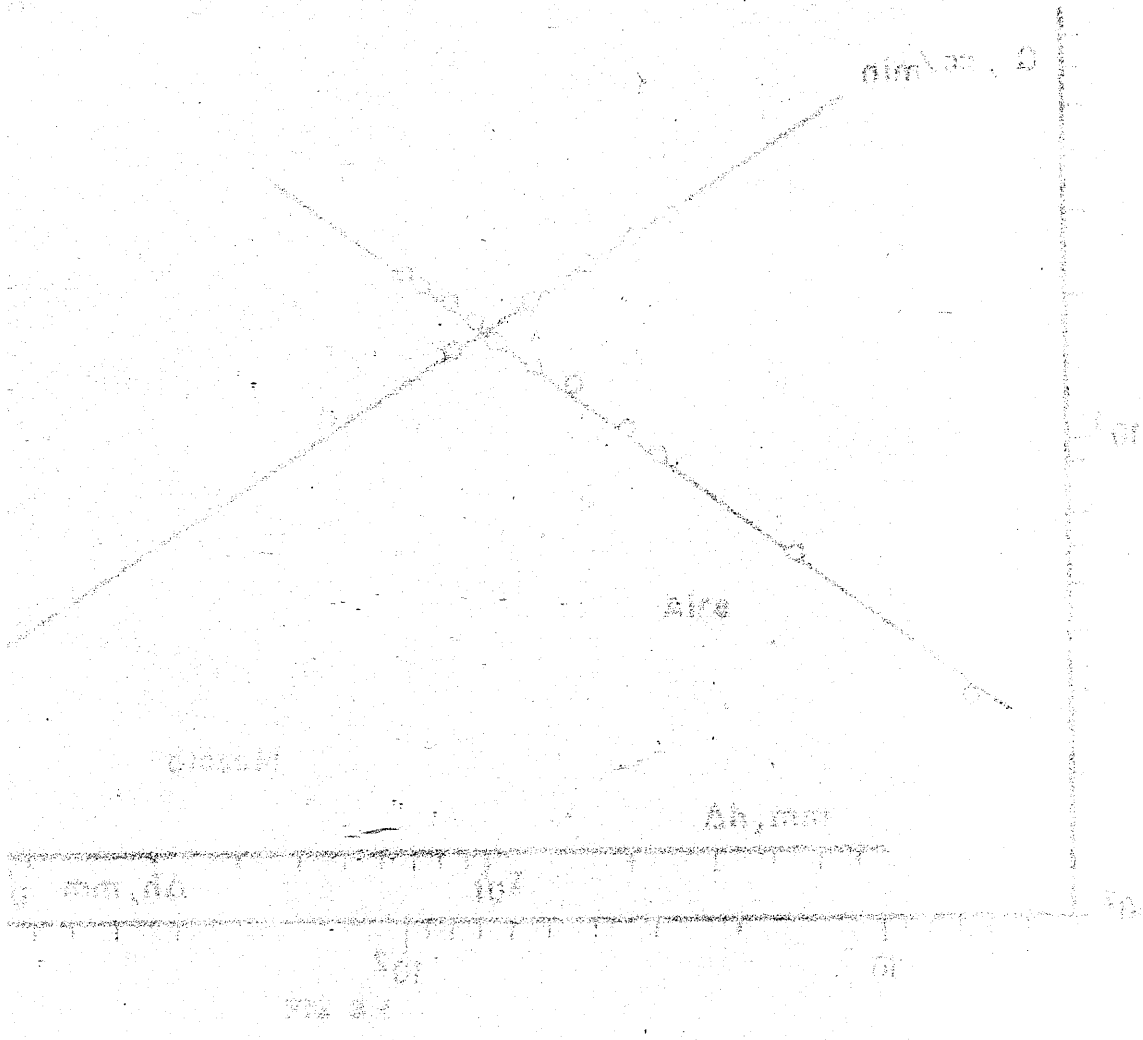


FIG 3.5



### 3.4 DETERMINACION DE LA INTENSIDAD MEDIA DE ILUMINACION EN LOS VASOS DE CULTIVO

Para la medida de las intensidades puntuales de iluminación se preparó un bastidor de lucita, en el que se insertaron nueve fotocélulas L.D.R, que permitía situar éstas a distintas alturas sobre el fondo del recipiente, aunque siempre sumergidas totalmente en el líquido de cultivo. Un esquema del bastidor se indica en la figura 3.6 y la disposición geométrica de cada una de las células dentro de la sección del vaso en la figura 3.7. La división del bastidor en tres piezas móviles que podían utilizarse independientemente, permitía evitar que las fotocélulas anteriores hicieran sombra sobre las posteriores en el momento de la medida.

Cada una de las fotocélulas se calibró previamente contrastándola frente a un luxómetro I.C.E conectado a un polímetro I.C.E de 20  $k\Omega/V$  de resistencia específica, que permitía medir la intensidad de iluminación directamente, en lux y de esta forma hacerla corresponder con la resistencia medida en la fotocélula. Este calibrado se realizó utilizando las mismas lámparas fluorescentes - descritas anteriormente, con el voltaje estabilizado a 220 V y a 10 distancias al foco luminoso distintas, para cada una de las nueve células. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.4 y se han representado en las figuras 3.8, 3.9 y 3.10, en cada una de las cuales aparece la línea

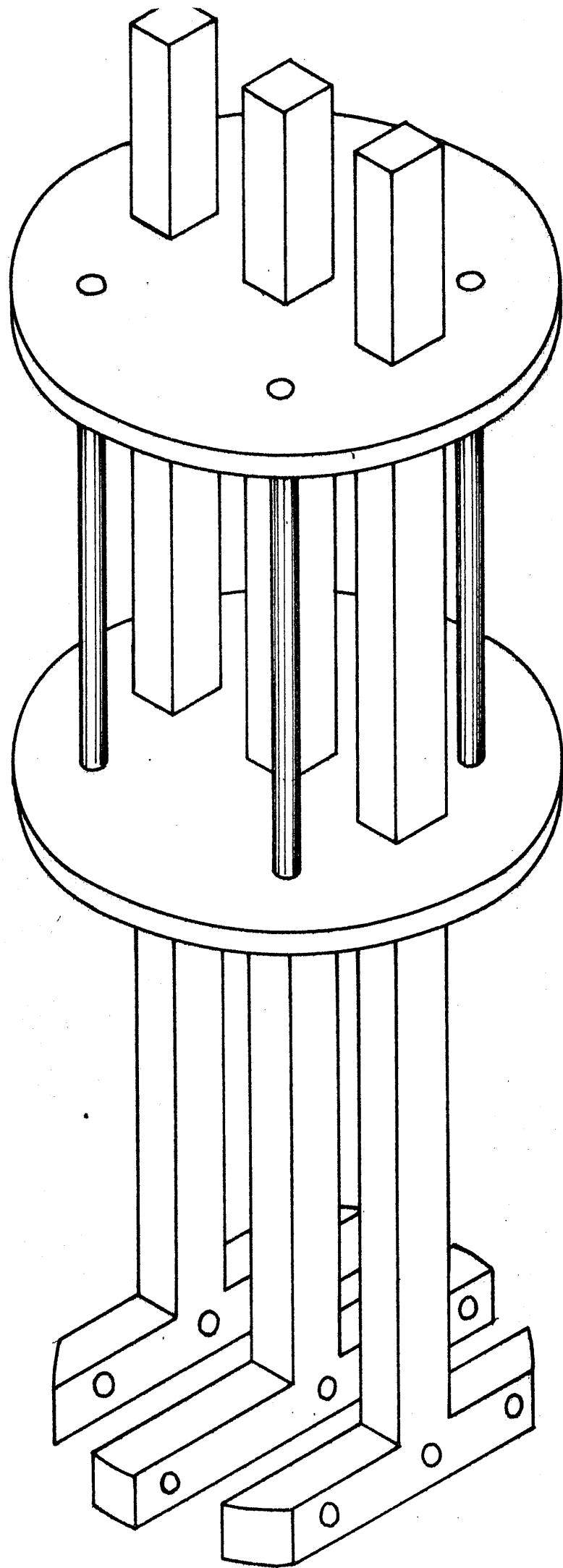


FIG 3.6

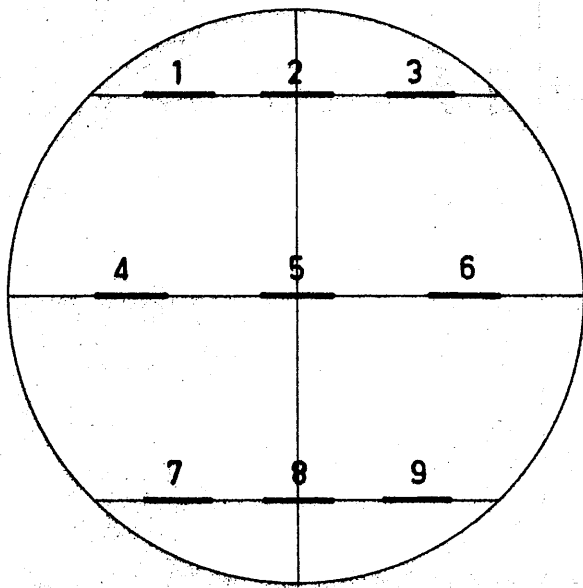


FIG 3.7

0180 0280 0380 0480 0580 0680 0780 0880 0980 1080 1180 1280 1380 1480 1580 1680 1780 1880 1980 2080 2180 2280 2380 2480 2580 2680 2780 2880 2980 3080 3180 3280 3380 3480 3580 3680 3780 3880 3980 4080 4180 4280 4380 4480 4580 4680 4780 4880 4980 5080 5180 5280 5380 5480 5580 5680 5780 5880 5980 6080 6180 6280 6380 6480 6580 6680 6780 6880 6980 7080 7180 7280 7380 7480 7580 7680 7780 7880 7980 8080 8180 8280 8380 8480 8580 8680 8780 8880 8980 9080 9180 9280 9380 9480 9580 9680 9780 9880 9980

0180 0280 0380 0480 0580 0680 0780 0880 0980 1080 1180 1280 1380 1480 1580 1680 1780 1880 1980 2080 2180 2280 2380 2480 2580 2680 2780 2880 2980 3080 3180 3280 3380 3480 3580 3680 3780 3880 3980 4080 4180 4280 4380 4480 4580 4680 4780 4880 4980 5080 5180 5280 5380 5480 5580 5680 5780 5880 5980 6080 6180 6280 6380 6480 6580 6680 6780 6880 6980 7080 7180 7280 7380 7480 7580 7680 7780 7880 7980 8080 8180 8280 8380 8480 8580 8680 8780 8880 8980 9080 9180 9280 9380 9480 9580 9680 9780 9880 9980



TABLA 3.4

Luz PLANT-GRO

Voltaje 220 V

| Distancia | Resistencia Intensidad |     | Resistencias fotocélulas |            |            |            |            |            |            |            |            |
|-----------|------------------------|-----|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|           | luxóm.                 | lux | $\Omega_1$               | $\Omega_2$ | $\Omega_3$ | $\Omega_4$ | $\Omega_5$ | $\Omega_6$ | $\Omega_7$ | $\Omega_8$ | $\Omega_9$ |
| 1         | 850                    | 850 | 186                      | 239        | 281        | 261        | 244        | 202        | 363        | 428        | 377        |
| 2         | 1500                   | 425 | 374                      | 492        | 572        | 534        | 480        | 419        | 765        | 930        | 810        |
| 3         | 2200                   | 260 | 589                      | 778        | 920        | 821        | 767        | 655        | 1232       | 1477       | 1258       |
| 4         | 3100                   | 165 | 854                      | 1126       | 1346       | 1178       | 1097       | 929        | 1870       | 2320       | 1820       |
| 5         | 4000                   | 125 | 1140                     | 1497       | 1792       | 1547       | 1470       | 1255       | 2680       | 3290       | 2640       |
| 6         | 5000                   | 95  | 1468                     | 2010       | 2440       | 2150       | 1889       | 1590       | 3440       | 4370       | 3450       |
| 7         | 6500                   | 70  | 1811                     | 2600       | 3160       | 2730       | 2480       | 2260       | 4610       | 5730       | 4360       |
| 8         | 8000                   | 55  | 2370                     | 3200       | 3890       | 3350       | 3030       | 2800       | 5670       | 7120       | 5390       |
| 9         | 10000                  | 44  | 2840                     | 3830       | 4670       | 4010       | 3660       | 3390       | 6890       | 8670       | 6670       |
| 10        | 12000                  | 35  | 3450                     | 4650       | 5640       | 4810       | 4380       | 4080       | 8150       | 9530       | 7950       |

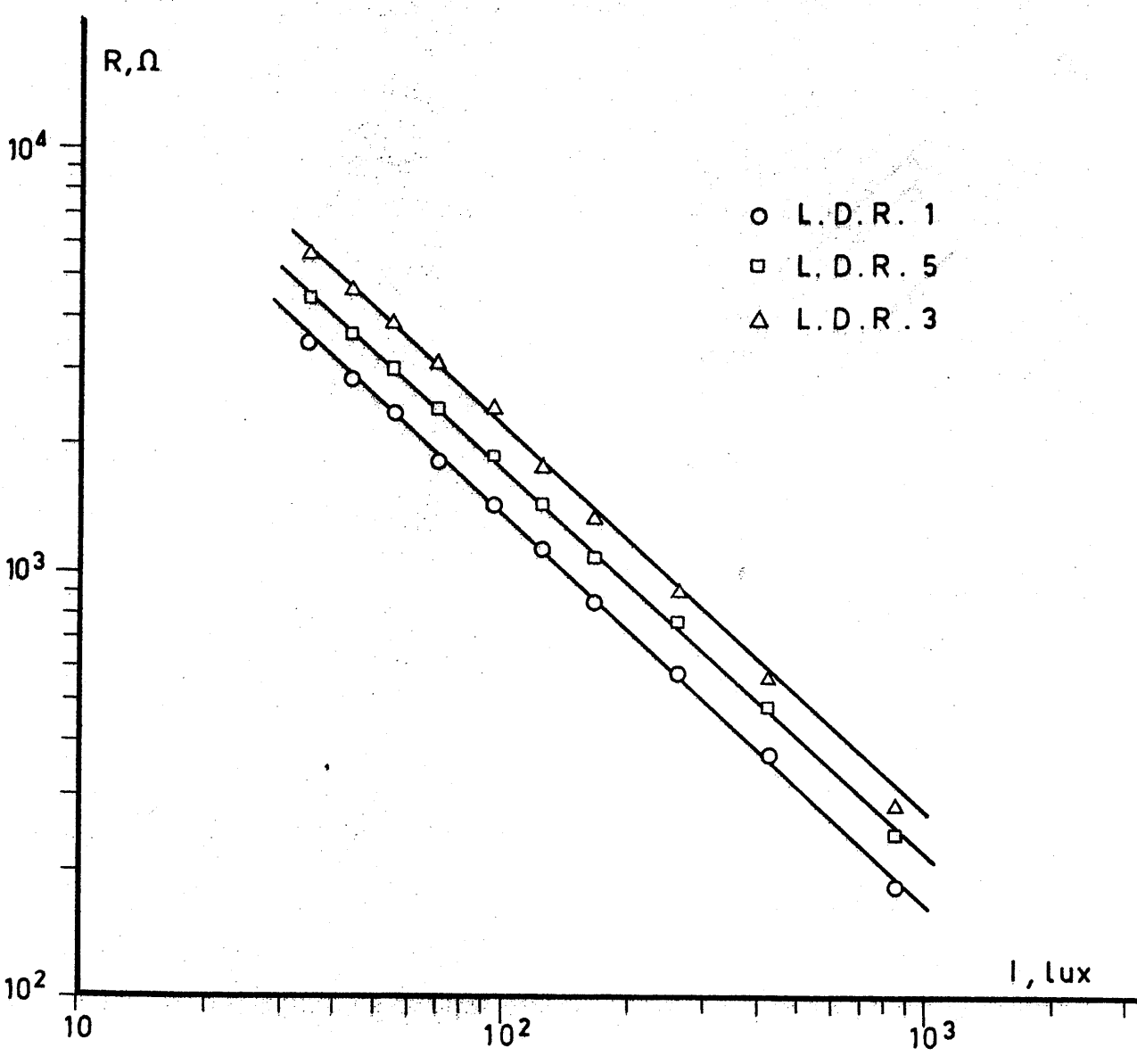


FIG 3.8

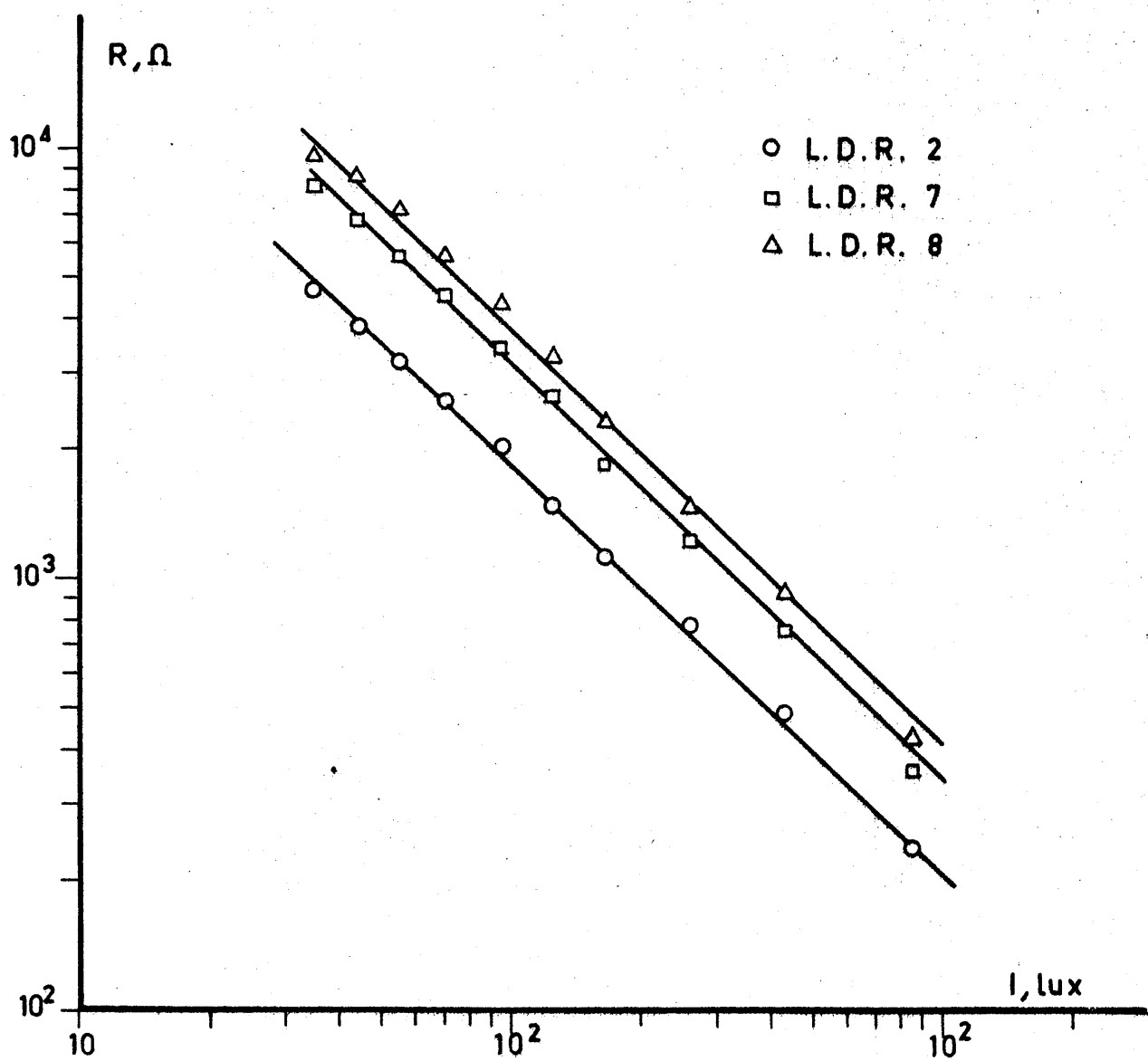


FIG 3.9

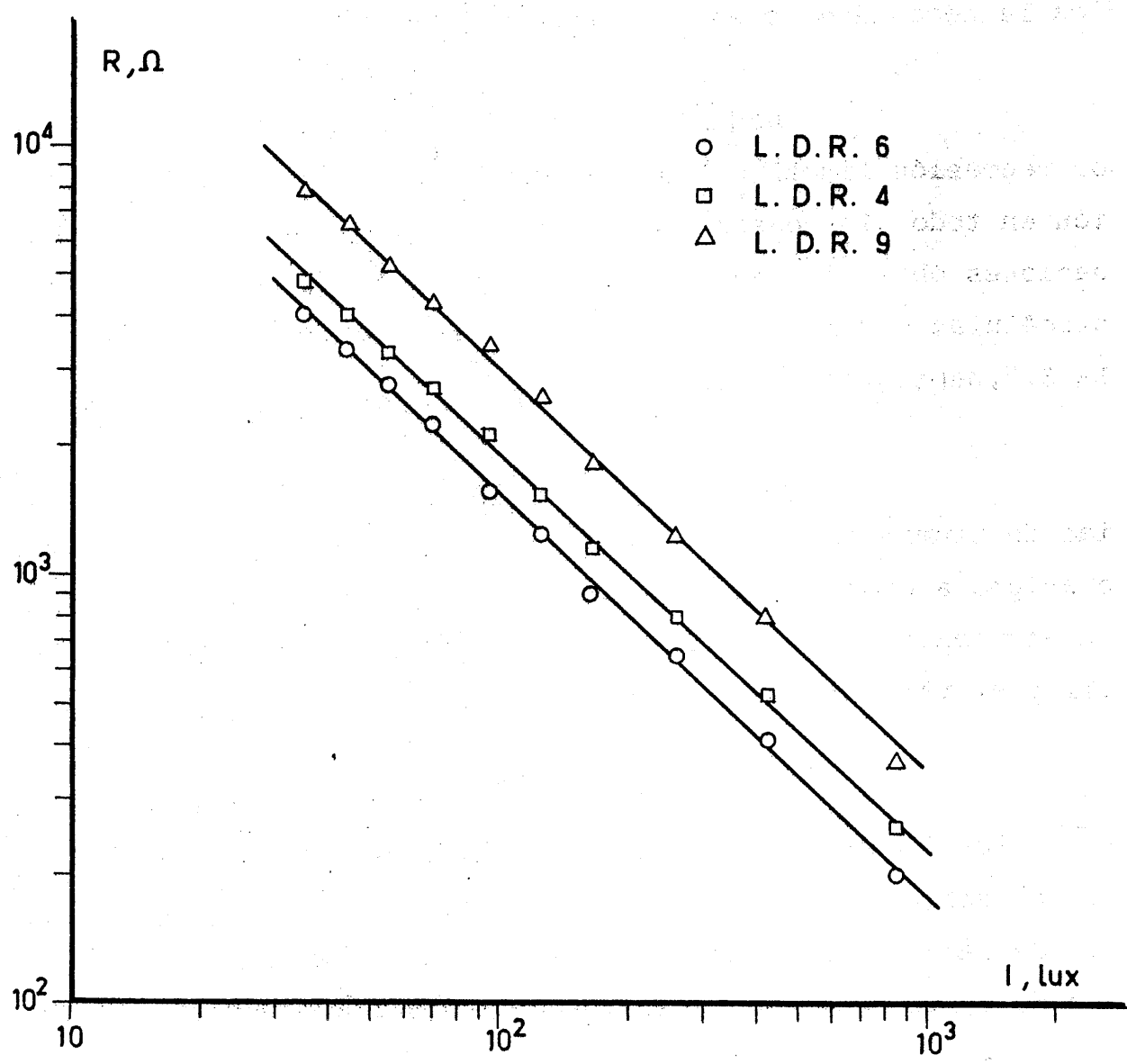


FIG 3.10

de calibrado (recta en papel doble logarítmico) de tres células escogidas arbitrariamente con el fin de que no se superpongan los puntos experimentales. Se observa en estas figuras, que aunque la respuesta de las nueve fotocélulas es muy semejante existen ligeras diferencias entre ellas fundamentalmente en la ordenada en el origen, lo que justifica la necesidad de este calibrado previo.

Las líneas anteriores se han ajustado por regresión lineal estando el coeficiente de correlación en todos los casos comprendido entre 0,998 y 1, las ecuaciones obtenidas que relacionan la resistencia de las fotocélulas con la intensidad de luz se indican en la tabla 3.5, habiéndose utilizado éstas en lo sucesivo.

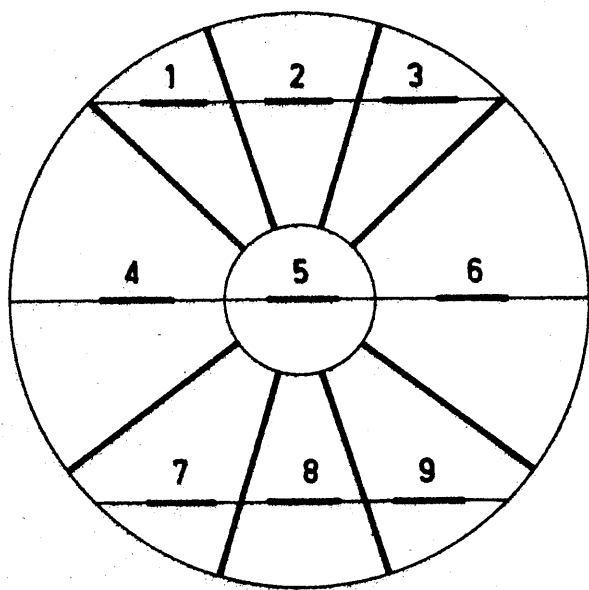
Para el cálculo de las intensidades medias de iluminación en las distintas secciones del vaso se asignó a cada una de las fotocélulas un área de medida, un esquema de esta distribución se indica en la figura 3.11 y el valor de cada área en la tabla 3.6.

Esta distribución se hizo en función de la significación de la medida de cada una de las fotocélulas, debido a su distinta visión del foco luminoso, así como de la influencia del sistema óptico formado por el vaso de cultivo con la camisa de agua de termostatación.

Como ya se ha indicado el diámetro de-

TABLA 3.5

| <u>Fotocélula</u> | <u>Ecuación</u>                    | <u>r<sup>2</sup></u> |
|-------------------|------------------------------------|----------------------|
| nº 1              | $\log I = 5,45 - 1,10 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 2              | $\log I = 5,51 - 1,07 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 3              | $\log I = 5,55 - 1,06 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 4              | $\log I = 5,60 - 1,09 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 5              | $\log I = 5,58 - 1,10 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 6              | $\log I = 5,40 - 1,06 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 7              | $\log I = 5,55 - 1,01 \log \Omega$ | 0,999                |
| nº 8              | $\log I = 5,60 - 1,00 \log \Omega$ | 0,998                |
| nº 9              | $\log I = 5,66 - 1,05 \log \Omega$ | 0,998                |



**FIG 3.11**

TABLA 3.6

Area total = 44,179 cm<sup>2</sup>

Area corona circular = 40,715 cm<sup>2</sup>

| <u>célula</u> | <u>grados</u> | <u>área , cm<sup>2</sup></u> |
|---------------|---------------|------------------------------|
| nº 1          | 28,5          | 3,223                        |
| nº 2          | 33,0          | 3,732                        |
| nº 3          | 28,5          | 3,223                        |
| nº 4          | 82,0          | 9,274                        |
| nº 5          | - -           | 3,464                        |
| nº 6          | 82,0          | 9,274                        |
| nº 7          | 36,5          | 4,128                        |
| nº 8          | 33,0          | 3,732                        |
| nº 9          | 36,5          | 4,128                        |



los vasos de cultivo era de 7,5 cm, al introducir el bastidor con las fotocélulas la distribución de éstas era la siguiente: las células 4, 5 y 6 estaban situadas en el diámetro paralelo al foco luminoso y las 1, 2, 3 y 7, 8, 9 eran simétricas con respecto a este diámetro y situadas a una distancia de 2,6 cm. La distancia entre células era de 0,65 cm salvo las centrales en que la separación era de 0,12 cm.

A la célula centrada en el vaso (nº5) y cuya medida iba a estar influenciada por todo el sistema se le asignó como área de medida el círculo trazado desde su centro y que pasaba por la mitad de la distancia de separación entre las células centrales.

Las células 2 y 8 se limitaron trazando las líneas que unían el centro del sistema con la mitad de la distancia de separación con las células adyacentes.

Las áreas de las células 1 y 3 quedaron fijadas por el área de la fotocélula nº2 y las líneas que unían el centro del sistema con los extremos de la cuerda en la que estaban situadas; las fotocélulas 7 y 9 quedaron delimitadas por la fotocélula nº8 y las líneas trazadas desde el centro al punto medio del arco comprendido entre el diámetro central y los extremos de las líneas de delimitación del área de la célula nº8.

Las áreas de medida de las fotocélulas números 4 y 6 quedaron fijadas por la distribución anterior.

Una vez fijadas estas áreas y conocidas las intensidades puntuales de iluminación se calcularon - las intensidades medias en las distintas secciones del vaso de cultivo mediante aplicación de la expresión siguiente:

$$I_h = \frac{\sum I_i A_i}{A_t} \quad [3.1]$$

por el momento, al respecto, se ha observado que el sistema de control de la actividad eléctrica de las células de la corteza cerebral, en las áreas 4, 5 y 6, se encuentra en un estado de actividad eléctrica que puede ser considerado como un estado de actividad eléctrica de tipo "beta" (oscilaciones de 12-18 Hz) y "gamma" (oscilaciones de 30-40 Hz) y "delta" (oscilaciones de 1-4 Hz) y "theta" (oscilaciones de 5-8 Hz). Estas oscilaciones se encuentran en un estado de actividad eléctrica que puede ser considerado como un estado de actividad eléctrica de tipo "beta" (oscilaciones de 12-18 Hz) y "gamma" (oscilaciones de 30-40 Hz) y "delta" (oscilaciones de 1-4 Hz) y "theta" (oscilaciones de 5-8 Hz).

En el caso de las áreas 1 y 2, se ha observado que el sistema de control de la actividad eléctrica de las células de la corteza cerebral, en las áreas 1 y 2, se encuentra en un estado de actividad eléctrica que puede ser considerado como un estado de actividad eléctrica de tipo "beta" (oscilaciones de 12-18 Hz) y "gamma" (oscilaciones de 30-40 Hz) y "delta" (oscilaciones de 1-4 Hz) y "theta" (oscilaciones de 5-8 Hz).

Las células 1 y 2 se encuentran en un estado de actividad eléctrica que puede ser considerado como un estado de actividad eléctrica de tipo "beta" (oscilaciones de 12-18 Hz) y "gamma" (oscilaciones de 30-40 Hz) y "delta" (oscilaciones de 1-4 Hz) y "theta" (oscilaciones de 5-8 Hz).

Las áreas de las células 1 y 2 se encuentran en un estado de actividad eléctrica que puede ser considerado como un estado de actividad eléctrica de tipo "beta" (oscilaciones de 12-18 Hz) y "gamma" (oscilaciones de 30-40 Hz) y "delta" (oscilaciones de 1-4 Hz) y "theta" (oscilaciones de 5-8 Hz).

### 3.5 MEDIDA DE LA CONCENTRACION CELULAR

Como índice de la concentración celular rápido y fácil de determinar se ha utilizado la D.O de la suspensión medida a 600 nm. La selección de esta longitud de onda basada en el estudio bibliográfico, se confirmó tras la realización del espectro completo de una suspensión del alga utilizada, siendo ésta la longitud de onda a la que la absorbancia era menor. No obstante, el intervalo de concentraciones donde se cumple la ley de Lambert-Beer es pequeño y hay que recurrir a la dilución de las muestras.

En los cálculos cinéticos se utilizó el peso seco expresado en g/l (gramos de algas secas por litro de suspensión).

Para la obtención de este índice se realizó una curva de calibrado D.O-peso seco, curva que se obtuvo midiendo la D.O de suspensiones cuya concentración en peso se conocía tras centrifugación lavado y desecación a 103°C hasta pesada constante.

La D.O a 600 nm se medía mediante un fotolorímetro BAUSCH-LOMB mod. Spectronic 20. Los resultados del calibrado ya comentado se recogen en la tabla 3.7 y se han representado en la figura 3.12. Por regresión lineal se obtiene.

TABLA 3.7

| <u>c, g/l</u> | <u>D.O.</u> |
|---------------|-------------|
| 0,2384        | 0,49        |
| 0,1192        | 0,25        |
| 0,1135        | 0,24        |
| 0,1037        | 0,22        |
| 0,0954        | 0,20        |
| 0,0822        | 0,17        |
| 0,0722        | 0,15        |
| 0,0554        | 0,12        |
| 0,0477        | 0,10        |
| 0,0378        | 0,08        |
| 0,0287        | 0,06        |
| 0,0240        | 0,05        |
| 0,0048        | 0,01        |

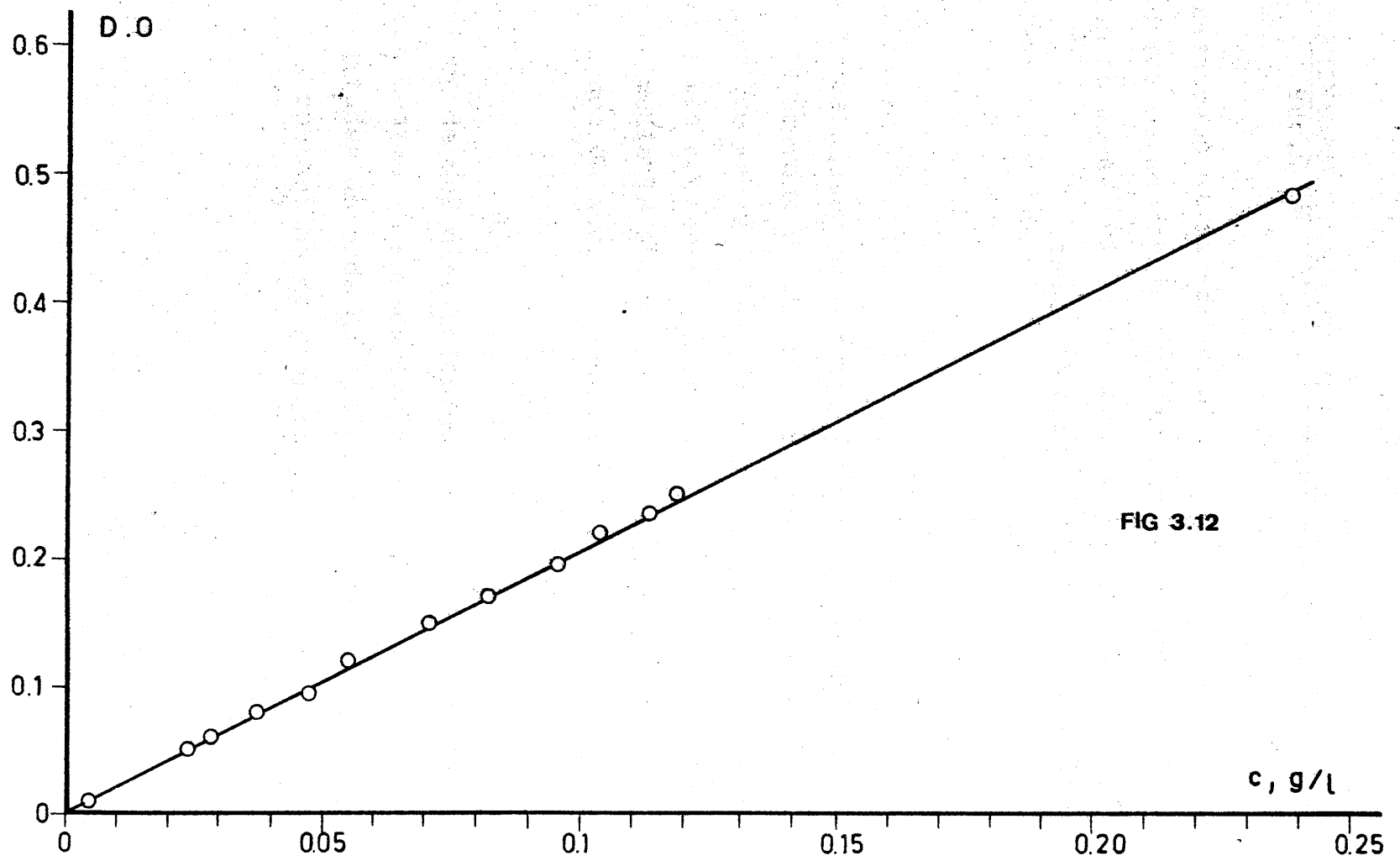


FIG 3.12

$$c = 0,49 \text{ D.O} \quad r^2 = 0,999 \quad [3.2]$$

Para la medida de la concentración celular durante los experimentos cinéticos se tomaban muestras por duplicado de cada uno de los vasos de cultivo, utilizándose el valor medio de ambas.

### 3.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CLOROFILA Y EN PROTEINA BRUTA

El contenido en clorofila de la suspensión de células se determinó según el método de Arnon (1949) modificado en el tiempo de extracción de la misma forma que Wren y Harshman (1972).

En un matraz Erlenmeyer de 100 cc provisto de tapón esmerilado se introducían 0,5 cc de la suspensión de células y se extraía la clorofila por adición de 20 cc de acetona y 4,5 cc de agua. El tiempo total de extracción fué de 72 horas con una agitación de 2 h/día para todas las muestras analizadas. Posteriormente se filtraba y se medía la absorción del filtrado a 652 nm, frente a un blanco de acetona-agua al 80%.

De acuerdo con Mackinney (1941) la densidad óptica de una disolución de clorofila en acetona-agua al 80% medida en una cubeta de 10 mm de paso óptico y a las longitudes de onda de 663 y 645 nm están relacionadas con los contenidos de clorofila a y b, expresados en g/l, mediante las ecuaciones

$$D.O_{663} = 82,04 c_a + 9,27 c_b \quad [3.3]$$

$$D.O_{645} = 16,75 c_a + 45,6 c_b \quad [3.4]$$



Las dos longitudes de onda citadas corresponden como puede verse en la figura 3,13 a los máximos de absorción de la clorofila b y a respectivamente, en esa zona del espectro.

De las ecuaciones [3.3] y [3.4] podría obtenerse el contenido total en clorofila

$$c = c_a + c_b = 0,0202 D.O_{645} + 0,00802 D.O_{663} \quad [3.5]$$

que requeriría la medida de la absorción de la disolución a las dos longitudes de onda indicadas.

Sin embargo, los espectros de absorción de ambos tipos de clorofila se cortan a 652 nm, siendo el coeficiente de absorción específica para ambos de 34,5, a esta longitud de onda, ver figura 3.13. Por tanto la concentración total de clorofila puede obtenerse también mediante la ecuación

$$c = \frac{D.O_{652}}{34,5} \quad [3.6]$$

Teniendo en cuenta, que para la medida se ha diluido la muestra de 0,5 a 25, el contenido en clorofila de la suspensión extraída del medio de cultivo se calculaba mediante la expresión

$$CHL = \frac{D.O_{652} \cdot 50}{34,5} \quad g/l \quad [3.7]$$

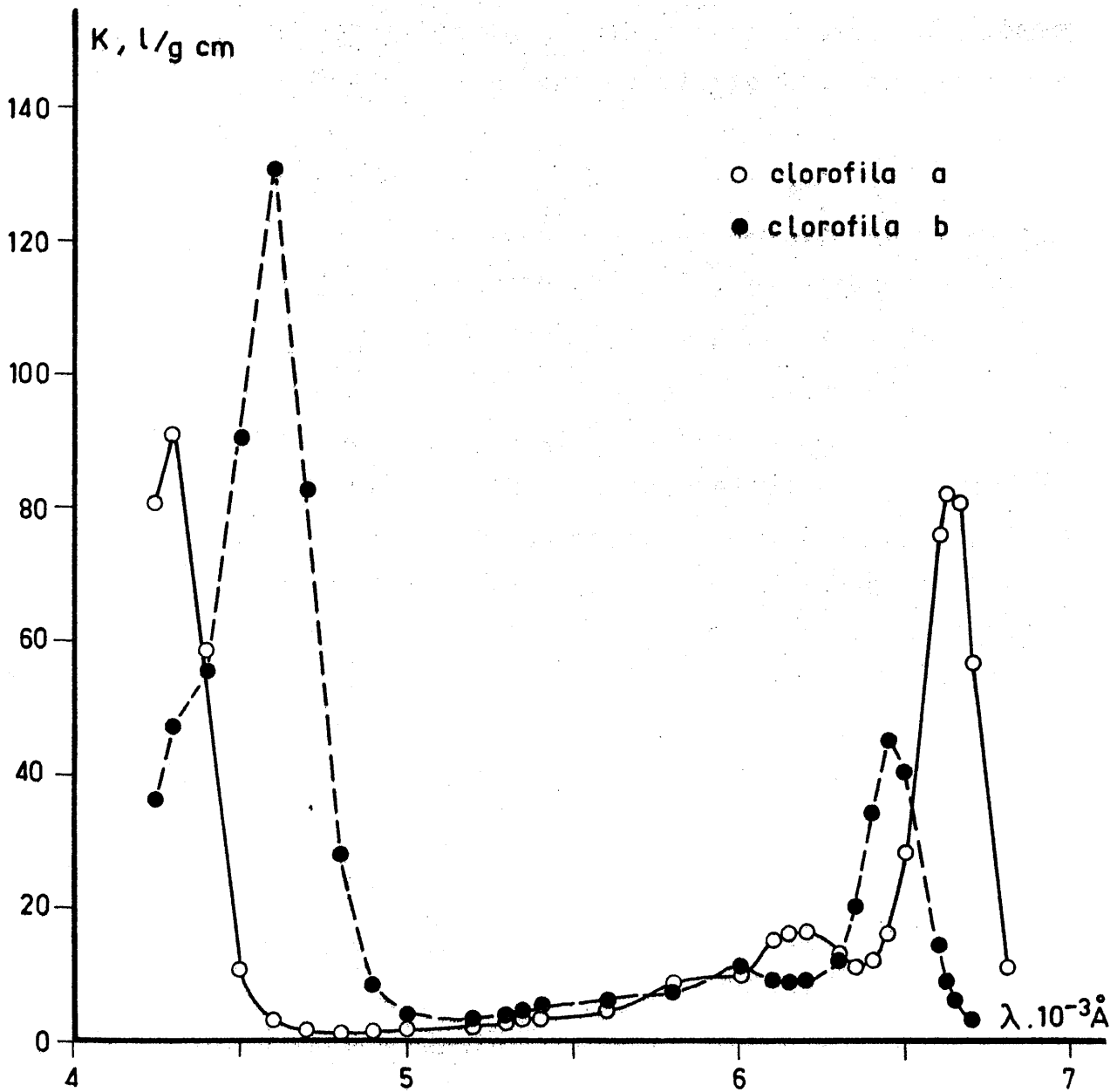


FIG 3.13

Con objeto de poner a punto el análisis del contenido en proteína bruta de las células, se llevó a cabo éste en algunos de los experimentos, utilizando el método semi-micro Kjeldhal, Norma UNE 64011, encontrándose que este contenido oscilaba generalmente entre el 25 y 55% en peso.

### 3.7 MEDIDA DE LAS PROPIEDADES FISICAS DE LA SUSPENSION DE CELULAS

Es evidente, que para el diseño de unidades de cultivo continuo a escala industrial es preciso conocer con precisión la densidad y viscosidad de la suspensión de células y las características de sedimentación de éstas últimas.

La medida de las densidades, en el intervalo de temperaturas de 18 a 35°C y hasta concentraciones celulares de aproximadamente 1 g/l se llevó a cabo mediante tres picnómetros de líquidos, calibrados previamente con agua destilada. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.8, en la que se observa que no existen diferencias significativas entre la densidad del medio de cultivo puro y la de las suspensiones ensayadas.

Para medir la viscosidad se utilizó un viscosímetro CANNON-FENSKE, idóneo para líquidos coloreados cuya constante se determinó previamente con agua destilada. En cada caso se realizaron tres medidas promediándose los tiempos obtenidos. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.9, en la que se observa que la viscosidad aumenta ligeramente con la concentración celular.

Se realizó también un ensayo de sedimentación intermitente en una probeta de 18 cm de altura

TABLA 3.8

Densidades , g/cc

| Temperatura<br>°C | Agua   | Medio de cultivo | Suspensión de células |            |
|-------------------|--------|------------------|-----------------------|------------|
|                   |        |                  | 0,5017 g/l            | 1,0976 g/l |
| 18                | 0,9986 | 1,0027           | 1,0032                | 1,0033     |
| 25                | 0,9971 | 1,0012           | 1,0016                | 1,0006     |
| 30                | 0,9957 | 1,0000           | 0,9997                | 0,9996     |
| 35                | 0,9940 | 0,9980           | 0,9984                | 0,9983     |

TABLA 3.9

Viscosidades , c.p.

| Temperatura<br>°C | Agua   | Medio de cultivo | Suspensión de células |             |
|-------------------|--------|------------------|-----------------------|-------------|
|                   |        |                  | 0,5017 g/ l           | 1,0976 g/ l |
| 18                | 1,0530 | 1,0601           | 1,0736                | 1,0823      |
| 25                | 0,8904 | 0,8974           | 0,9040                | 0,9096      |
| 30                | 0,7975 | 0,8066           | 0,8154                | 0,8224      |
| 35                | 0,7194 | 0,7214           | 0,7288                | 0,7364      |

y 4 cm de diámetro interno a la que se había adosado una escala vertical graduada en mm.

Se inició el experimento con 250 cc de una suspensión de 1,1 g/l perfectamente homogénea, que se había tomado de un vaso de cultivo. Una vez introducida la suspensión en la probeta se fueron tomando medidas de la altura de la interfase, que separa la suspensión del líquido claro sobrenadante a distintos tiempos.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.10, y se han representado en la figura 3.14, en la que se observa que hasta los 4,3 días aproximadamente no se ha alcanzado el punto crítico y por tanto la compresión del sedimento no ha empezado a influir en la velocidad de sedimentación, que durante todo este tiempo permanece constante e igual a 18 mm/día.

La velocidad de sedimentación obtenida es del mismo orden que las indicadas por Davis y col. (1953).

TABLA 3.10

## Ensayo de sedimentación intermitente

| <u>t , d</u> | <u><math>\Delta h</math> , mm</u> | <u>t , d</u> | <u><math>\Delta h</math> , mm</u> |
|--------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0,00         | 0,0                               | 0,42         | 11,0                              |
| 0,02         | 2,0                               | 0,44         | 11,5                              |
| 0,04         | 2,5                               | 0,46         | 12,0                              |
| 0,06         | 3,0                               | 1,13         | 22,5                              |
| 0,08         | 3,5                               | 1,21         | 23,5                              |
| 0,10         | 4,0                               | 1,31         | 25,5                              |
| 0,13         | 4,5                               | 1,46         | 30,5                              |
| 0,15         | 5,0                               | 2,04         | 35,5                              |
| 0,17         | 5,5                               | 2,27         | 38,5                              |
| 0,19         | 6,0                               | 2,46         | 44,5                              |
| 0,21         | 6,5                               | 3,06         | 53,5                              |
| 0,23         | 7,0                               | 3,23         | 59,5                              |
| 0,31         | 8,5                               | 3,40         | 65,5                              |
| 0,33         | 9,0                               | 3,46         | 66,0                              |
| 0,35         | 9,5                               | 4,04         | 73,5                              |
| 0,38         | 10,0                              | 4,27         | 85,0                              |
| 0,40         | 10,5                              | - -          | - -                               |



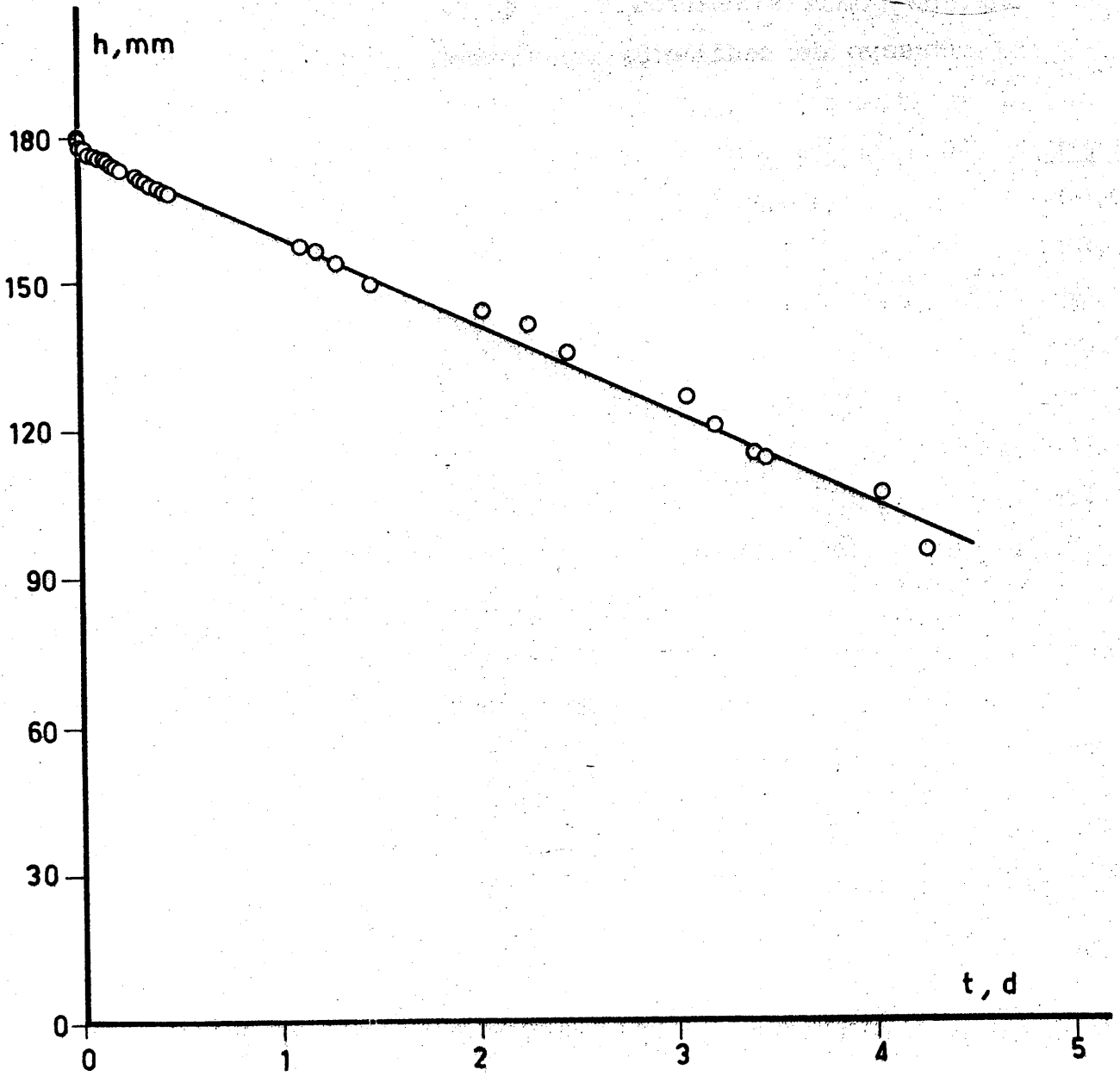
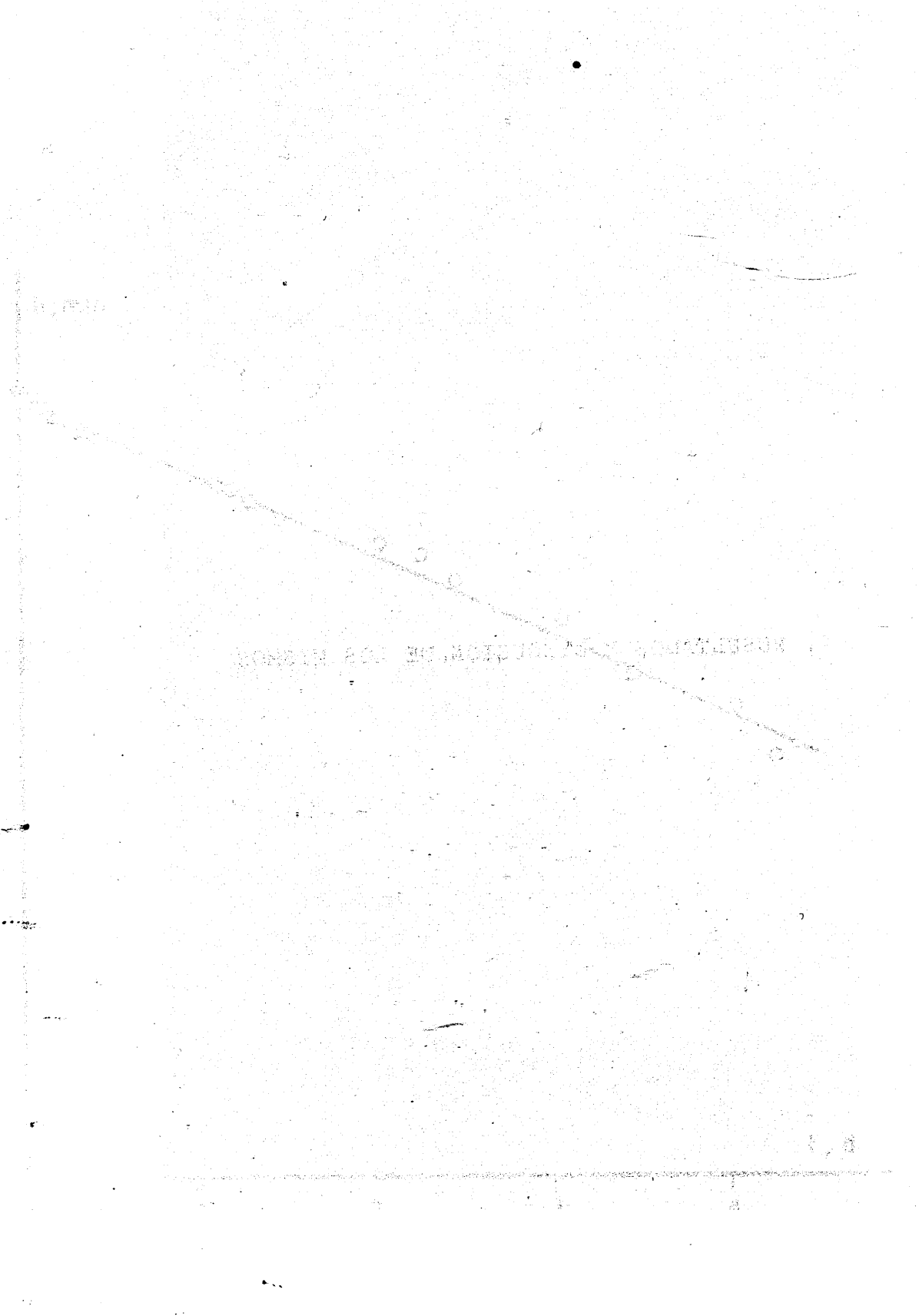


FIG 3.14

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

### **4. RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS MISMOS**



#### 4.1 INTENSIDAD DE ILUMINACION

Con objeto de analizar la influencia de la intensidad de iluminación sobre la cinética del crecimiento del alga *Chlorella Pyrenoidosa*, era preciso, en primer lugar, disponer del coeficiente de extinción y de la intensidad media de iluminación en los vasos de cultivo, en función de la concentración celular y de la intensidad incidente.

##### 4.1.1 Coeficiente de extinción

Para determinar el coeficiente de extinción de las células se realizaron una serie de medidas con las fotocélulas centradas nº 2,5 y 8 situadas a una altura aproximadamente intermedia de 7,20 cm sobre el fondo en el vaso de cultivo  $R_A$ .

Las suspensiones de distinta concentración de biomasa se prepararon a partir de células cosechadas en la fase de crecimiento lineal.

De acuerdo con la ley de Beer la intensidad medida debería variar con la concentración celular en la forma

$$I = I_i e^{-(k_m + k_a c)x} \quad [4.1]$$

donde,  $k_m$  y  $k_a$  representan el coeficiente de extinción - del líquido de cultivo y de las células a concentración - unidad, respectivamente,  $x$  la distancia desde la fotocélula hasta el límite de la fase líquida por el que entra - la luz e  $I_i$  la intensidad de luz incidente a través de - ese límite.

Si se denomina

$$I_o = I_i e^{-k_m x} \quad [4.2]$$

a la intensidad medida cuando se utiliza el líquido de - cultivo sin células y se combinan las dos ecuaciones an - teriores, se obtiene

$$I = I_o e^{-k_a cx} \quad [4.3]$$

Los valores medidos de  $I$  se indican - en la tabla 4.1 y se han representado en la figura 4.1 - de acuerdo con la ecuación [4.3], es decir, en coordenadas semilogarítmicas.

Se observa en esta última figura que la ecuación [4.3] se cumple aceptablemente para la foto - célula nº 2 pero no para las fotocélulas nº 5 y 8, en las que a concentraciones celulares altas la intensidad medi - da es apreciablemente superior a la que correspondería - de acuerdo con la ecuación anterior y este efecto es más

TABLA 4.1Vaso R<sub>A</sub>

Intensidades puntuales de iluminación, lux

| c     | Lectura fotocélula |          |          |
|-------|--------------------|----------|----------|
|       | <u>g/1</u>         | <u>2</u> | <u>5</u> |
| 0,000 | 1728               | 1788     | 1549     |
| 0,012 | 1648               | 1565     | 1267     |
| 0,031 | 1587               | 1371     | 1021     |
| 0,078 | 1381               | 948      | 585      |
| 0,194 | 1026               | 409      | 173      |
| 0,409 | 595                | 108      | 40       |
| 0,682 | 334                | 39       | 14       |

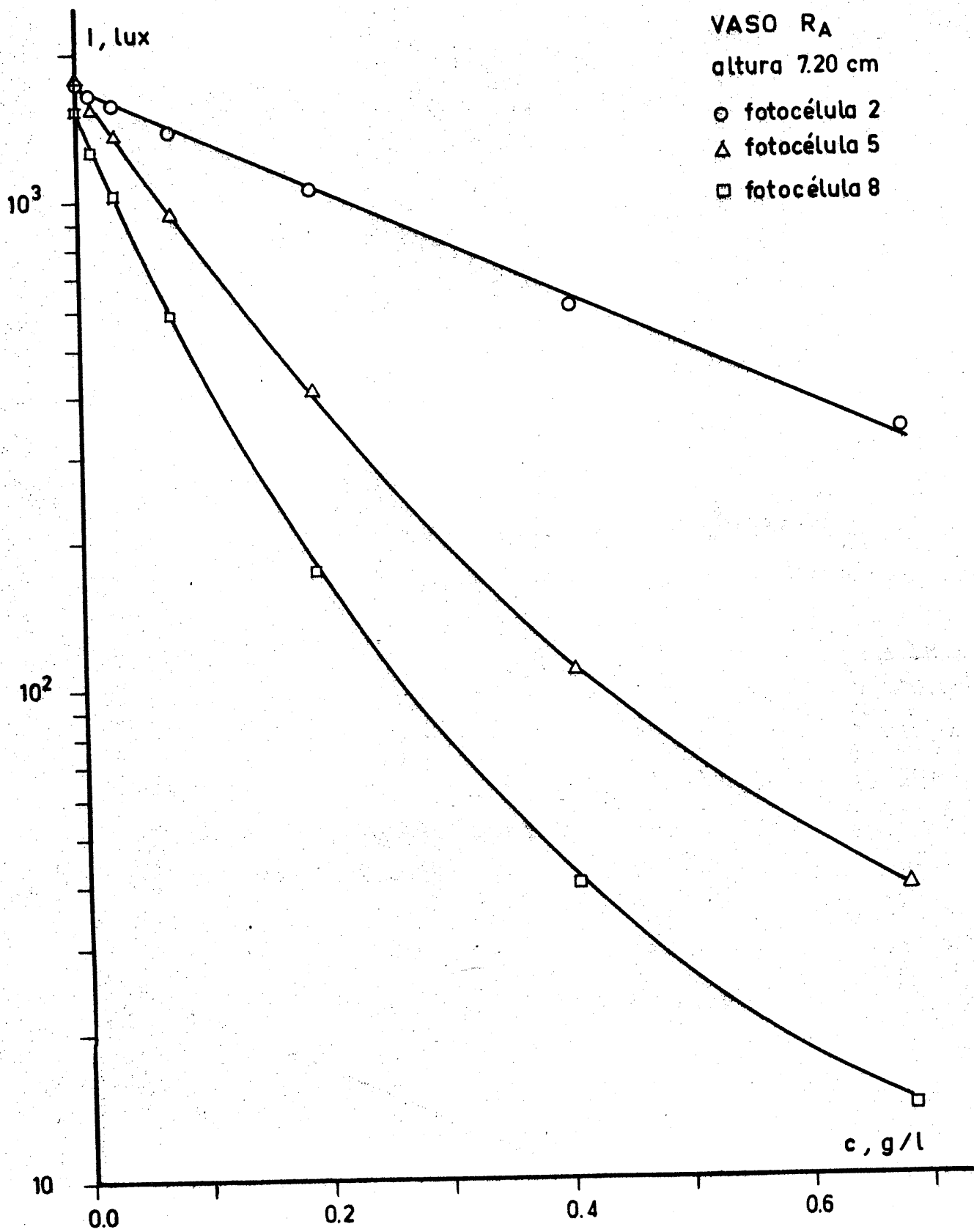


FIG 4.1

acusado en la fotocélula nº8.

Este resultado puede explicarse por la geometría del sistema utilizado, ya que al tratarse de un cilindro iluminado lateralmente aumentará la intensidad luminosa en las zonas más alejadas de la superficie por la que entra la luz, mientras que en el caso de la fotocélula nº 2, muy próxima a esta pared (1,1 cm), la capa de líquido comprendida entre ella y este límite es casi plana.

Una vez comprobado que las lecturas de la fotocélula nº 2 podían ser utilizadas para determinar el coeficiente de extinción, por aplicación de la ley de Beer, se realizaron medidas a tres intensidades de iluminación incidentes en cada uno de los tres vasos de cultivo variando la concentración celular. Los resultados obtenidos se indican en las tablas 4.2 y 4.3 y se han representado en las figuras 4.2, 4.3 y 4.4 para los vasos de cultivo  $R_A$ ,  $R_B$  y  $R_C$  respectivamente.

Se observa en estas figuras que las medidas experimentales se ajustan bien a la ecuación [4.3], resultando para cada vaso rectas aproximadamente paralelas para las tres intensidades de iluminación empleadas. Por regresión lineal se obtienen los valores que se indican en la tabla 4.4 para el producto  $k_a \times$



TABLA 4.2

Intensidades puntuales de iluminación, lux

Fotocélula 2

| <u>c, g/l</u> | <u>R<sub>A</sub></u> | <u>R<sub>B</sub></u> | <u>R<sub>C</sub></u> | <u>c, g/l</u> | <u>R<sub>A</sub></u> | <u>R<sub>B</sub></u> | <u>R<sub>C</sub></u> |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 0,000         | 1372                 | 1623                 | 1700                 | 0,000         | 1728                 | 1982                 | 1929                 |
| 0,020         | 1288                 | 1599                 | 1635                 | 0,012         | 1648                 | 1870                 | 1878                 |
| 0,041         | 1250                 | 1498                 | 1457                 | 0,031         | 1587                 | 1785                 | 1770                 |
| 0,068         | 1242                 | 1329                 | 1312                 | 0,078         | 1381                 | 1587                 | 1575                 |
| 0,227         | 800                  | 836                  | 857                  | 0,194         | 1026                 | 1170                 | 1157                 |
| 0,453         | 445                  | 481                  | 470                  | 0,409         | 595                  | 645                  | 637                  |
| 0,648         | 285                  | 272                  | 299                  | 0,682         | 334                  | 275                  | 350                  |

TABLA 4.3

Intensidades puntuales de iluminación, lux

Fotocélula 2

| <u>c, g/l</u> | <u>R<sub>A</sub></u> | <u>R<sub>B</sub></u> | <u>R<sub>C</sub></u> |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 0,000         | 2563                 | 2899                 | 3017                 |
| 0,022         | 2344                 | 2656                 | 2937                 |
| 0,045         | 2181                 | 2563                 | 2721                 |
| 0,064         | 2097                 | 2319                 | 2593                 |
| 0,214         | 1363                 | 1575                 | 1687                 |
| 0,428         | 762                  | 861                  | 911                  |
| 0,612         | 483                  | 542                  | 568                  |

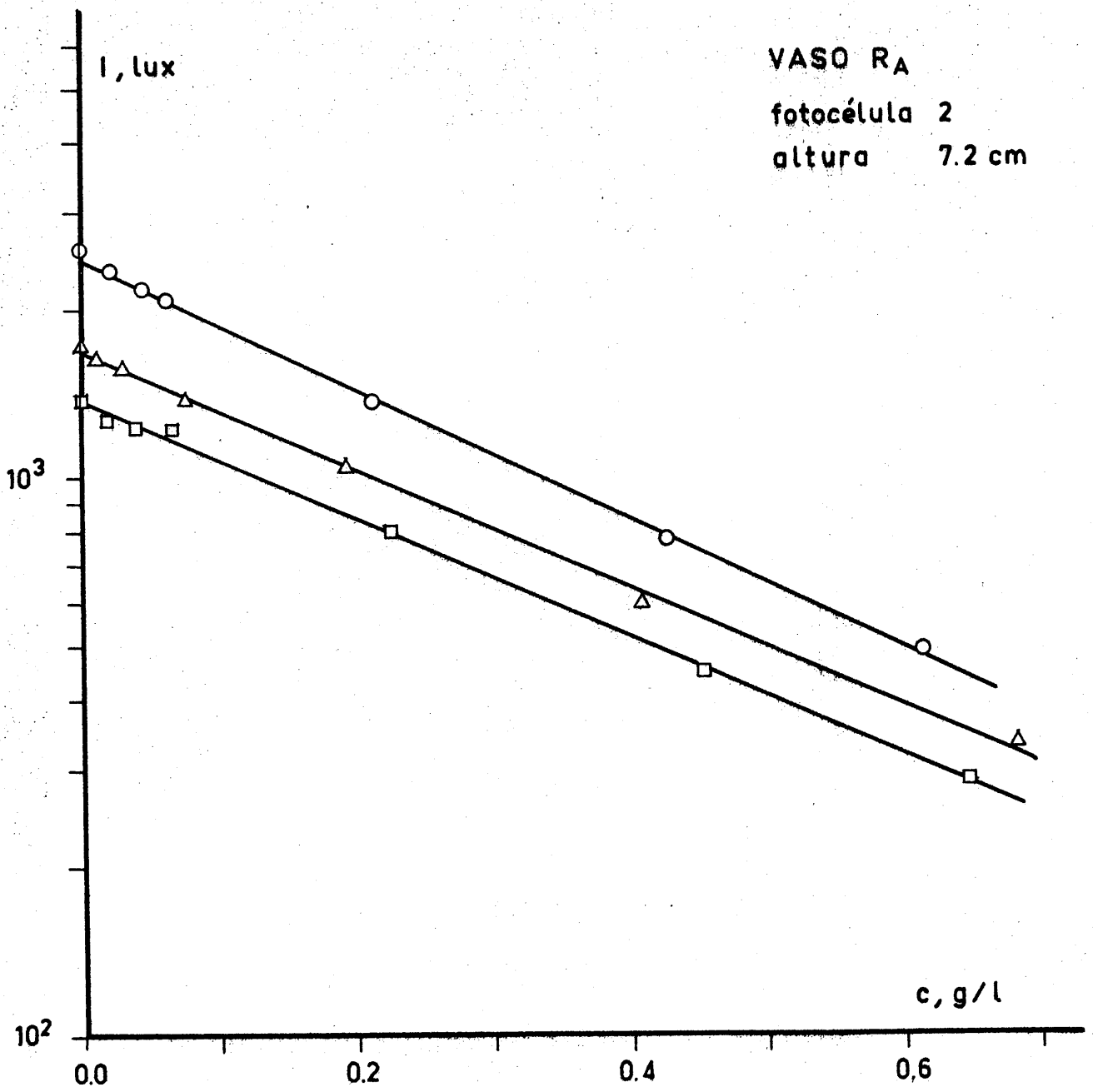


FIG 4.2

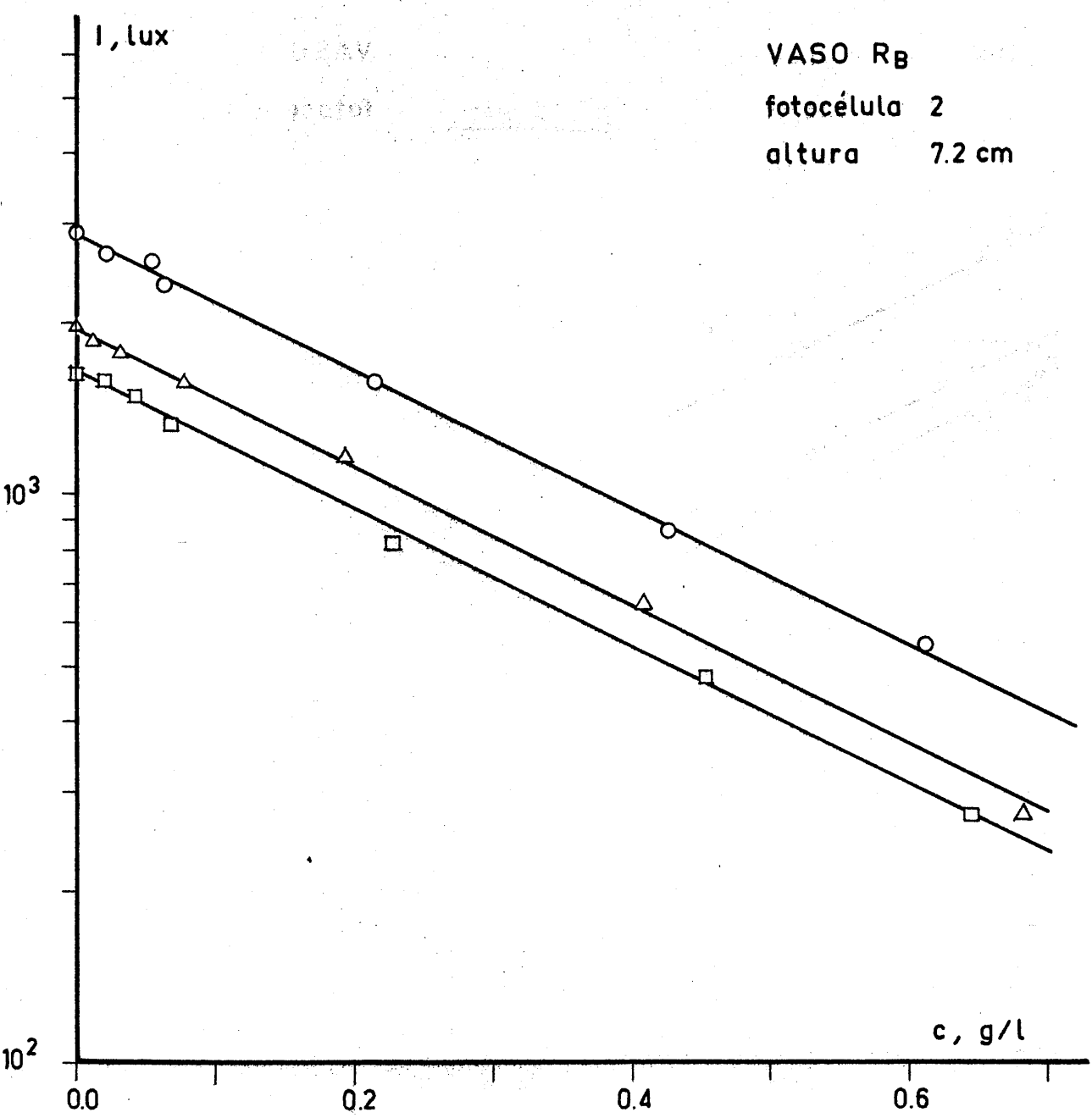


FIG 4.3

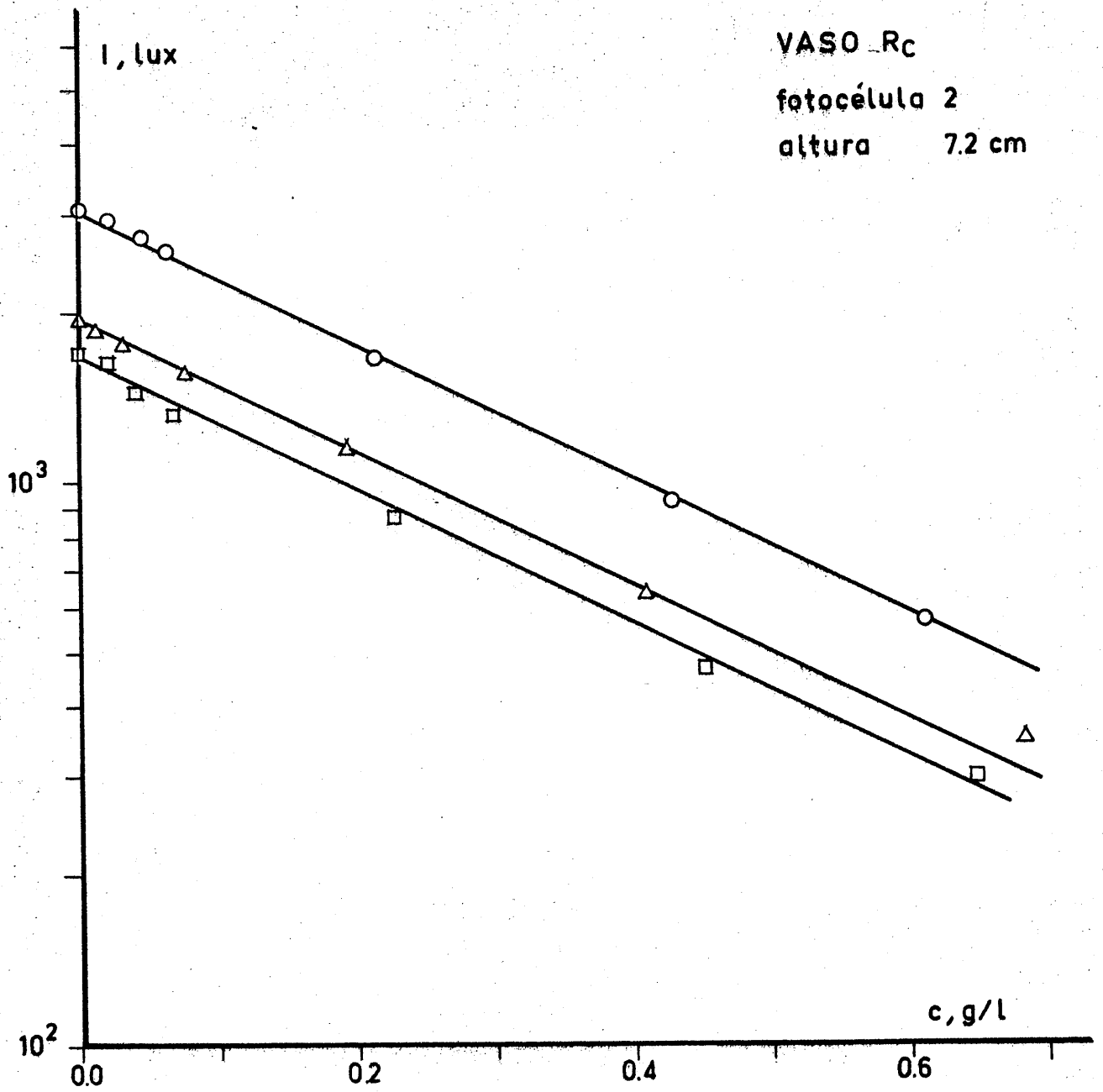


FIG 4.4

TABLA 4.4

| <u>Vaso de cultivo</u> | <u>I<sub>o</sub> , lux</u> | <u>k<sub>a</sub> x , l/g</u> | <u>r<sup>2</sup></u> |
|------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub>         | 1390                       | 2,46                         | 0,998                |
| R <sub>A</sub>         | 1685                       | 2,43                         | 0,998                |
| R <sub>A</sub>         | 2490                       | 2,72                         | 0,999                |
| —                      |                            |                              |                      |
| R <sub>B</sub>         | 1640                       | 2,76                         | 0,998                |
| R <sub>B</sub>         | 1980                       | 2,85                         | 0,999                |
| R <sub>B</sub>         | 2840                       | 2,74                         | 0,999                |
| —                      |                            |                              |                      |
| R <sub>C</sub>         | 1645                       | 2,69                         | 0,997                |
| R <sub>C</sub>         | 1910                       | 2,54                         | 0,998                |
| R <sub>C</sub>         | 3070                       | 2,78                         | 0,999                |

Los resultados indicados en esta tabla ponen de manifiesto que el valor de  $k_a x$  es practicamente constante, independiente de la intensidad de iluminación incidente y del vaso de cultivo empleado, como sería de esperar. Teniendo en cuenta el valor de  $x$  y utilizando el valor medio del producto  $k_a x$  que resulta de la tabla anterior, se obtiene

$$k_a = \frac{2,66 \text{ l/g}}{1,1 \text{ cm}} = 2,42 \text{ l/g cm}$$

Es interesante comparar este resultado con el obtenido por Myers (1953) a partir de los datos de Emerson y Lewis (1943). Estos autores utilizan una capa plana de 1,4 cm de espesor a una sola concentración celular de 0,24 g/l y aplican la ley de Beer para la atenuación de tres longitudes de onda diferentes, sus resultados son

|                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| $\lambda = 4400 \text{ \AA}$ | $k_a = 1,9 \text{ l/g cm}$ |
| $\lambda = 5600 \text{ \AA}$ | $k_a = 0,4 \text{ l/g cm}$ |
| $\lambda = 6800 \text{ \AA}$ | $k_a = 1,5 \text{ l/g cm}$ |

Por otra parte Tamiya y col. (1953b) empleando también células de la fase lineal de crecimiento pequeñas y ricas en clorofila miden el coeficiente de extinción a diferentes longitudes de onda obteniendo los -

resultados que se indican en la figura 4.5.

Como se ha indicado en la Técnica Experimental, las lámparas fluorescentes empleadas en esta investigación emiten el mayor porcentaje de la energía - alrededor de 4500 y 6800 Å, por lo que considerando fundamentalmente estas dos longitudes de onda el valor que se sería de esperar para esta investigación de acuerdo con - los datos de Myers sería aproximadamente de 1,7 l/g cm y a partir de los datos de Tamiya de 2,4 l/g cm

Puede observarse que este último valor coincide muy aceptablemente con el obtenido en esta investigación, aunque el valor de Myers es algo más pequeño.

#### 4.1.2 Intensidad media de iluminación

Por el procedimiento descrito en la - Técnica Experimental se midió la variación de la intensidad puntual de iluminación, tanto con la posición como -- con la concentración celular. Para ello se realizaron medidas sobre secciones situadas a 5 alturas distintas sobre el fondo de los vasos y a 7 concentraciones de biomasa distribuidas regularmente en el intervalo estudiado - en los experimentos cinéticos.

En todos los casos las células utili-



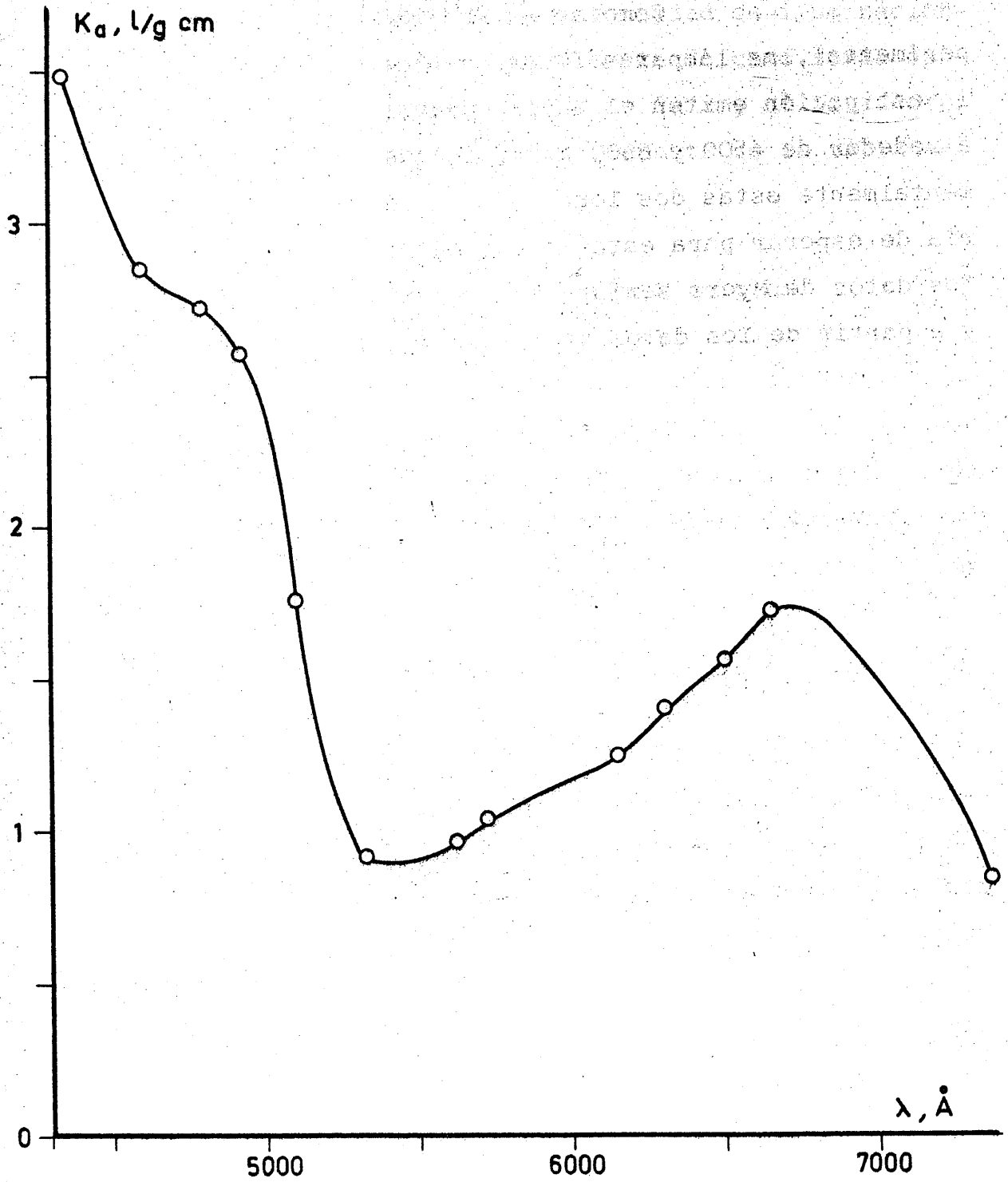


FIG 4.5

zadas fueron cosechadas en el periodo lineal de crecimiento, es decir, se trataba de células pequeñas ricas en clorofila; y el programa experimental anteriormente indicado se repitió para cuatro intensidades de iluminación incidentes conseguidas variando la posición relativa de los vasos de cultivo y las lámparas fluorescentes o modificando el voltaje aplicado a estas últimas.

Las alturas de las secciones en las que se realizaron las medidas de la intensidad puntual de iluminación fueron: 3,85; 5,40; 7,20; 9,10 y 10,65 cm, de manera que la menor de ellas permitía el funcionamiento correcto del agitador magnético a fin de mantener uniforme la concentración celular .

A partir de las medidas puntuales, a cada altura se determinó la intensidad media por sección de la forma indicada en la Técnica Experimental, que se han designado por  $I_1, I_2, I_3, I_4$  e  $I_5$  de abajo a arriba.

Conocidas las intensidades medias de iluminación a las 5 alturas indicadas se calculó la intensidad media en todo el vaso por integración gráfica a partir de la representación de los 5 valores anteriores frente a la altura. Después de los primeros cálculos se comprobó que este método era equivalente a utilizar la expresión

$$I_m = \frac{I_1 \cdot 4,63 + I_2 \cdot 1,67 + I_3 \cdot 1,85 + I_4 \cdot 1,73 + I_5 \cdot 1,42}{11,3} \quad [4.4]$$

donde los valores numéricos del numerador representan la altura asignada a cada sección y 11,3 cm es la altura total de los 500 cc de medio de cultivo que se utilizaron en todos los experimentos.

Los valores obtenidos por este método para las cuatro intensidades de iluminación incidentes utilizadas se indican en las tablas 4.5 a 4.8.

Si las cámaras de cultivo utilizadas hubieran sido rectangulares y con iluminación normal por una de sus caras, es evidente que como han demostrado las medidas realizadas con la fotocélula nº 2, se cumpliría la ley de Beer en todo el vaso y la intensidad de iluminación existente a cualquier profundidad,  $x$ , a partir de la cara iluminada vendría dada por la ecuación [4.3]

$$I(x) = I_0 e^{-k_a cx} \quad [4.5]$$

Para obtener la intensidad media de iluminación en una cámara rectangular de espesor  $L$ , bastaría realizar la integral

$$I_m = \frac{1}{L} \int_0^L I(x) dx \quad [4.6]$$

TABLA 4.5

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,000 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 920                  | 915                  | 905                  | 917                  | 1046                 | 932                  |
| R <sub>B</sub> | 1179                 | 1169                 | 1166                 | 1184                 | 1348                 | 1198                 |
| R <sub>C</sub> | 1135                 | 1241                 | 1234                 | 1126                 | 1286                 | 1184                 |

TABLA 4.5 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,025 \text{ g/l}$

| Vaso  | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$ | 770                     | 764                     | 754                     | 768                     | 862                     | 778                     |
| $R_B$ | 922                     | 918                     | 915                     | 941                     | 1065                    | 941                     |
| $R_C$ | 985                     | 978                     | 965                     | 1000                    | 1131                    | 1001                    |

$c = 0,049 \text{ g/l}$

| Vaso  | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$ | 859                     | 719                     | 715                     | 718                     | 799                     | 785                     |
| $R_B$ | 872                     | 865                     | 860                     | 874                     | 985                     | 883                     |
| $R_C$ | 868                     | 851                     | 848                     | 863                     | 955                     | 872                     |

TABLA 4.5 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,069 \text{ g/l}$

| Vaso  | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$ | 621                     | 616                     | 622                     | 631                     | 685                     | 630                     |
| $R_B$ | 783                     | 771                     | 762                     | 758                     | 798                     | 776                     |
| $R_C$ | 703                     | 694                     | 696                     | 700                     | 786                     | 710                     |

$c = 0,231 \text{ g/l}$

| Vaso  | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$ | 302                     | 301                     | 297                     | 294                     | 310                     | 301                     |
| $R_B$ | 369                     | 351                     | 354                     | 360                     | 380                     | 364                     |
| $R_C$ | 367                     | 359                     | 356                     | 354                     | 384                     | 364                     |

TABLA 4.5 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,462 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| R <sub>A</sub> | 140                     | 142                     | 141                     | 137                     | 141                     | 140                     |
| R <sub>B</sub> | 171                     | 156                     | 152                     | 158                     | 167                     | 163                     |
| R <sub>C</sub> | 184                     | 183                     | 178                     | 173                     | 185                     | 181                     |

$c = 0,660 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| R <sub>A</sub> | 86                      | 87                      | 87                      | 84                      | 87                      | 86                      |
| R <sub>B</sub> | 107                     | 88                      | 105                     | 98                      | 106                     | 102                     |
| R <sub>C</sub> | 119                     | 118                     | 116                     | 112                     | 118                     | 117                     |

TABLA 4.6

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,000 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1244                 | 1244                 | 1235                 | 1246                 | 1408                 | 1263                 |
| R <sub>B</sub> | 1510                 | 1496                 | 1495                 | 1511                 | 1698                 | 1530                 |
| R <sub>C</sub> | 1549                 | 1543                 | 1530                 | 1536                 | 1745                 | 1568                 |



TABLA 4.6 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,020 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1075                 | 1082                 | 1075                 | 1090                 | 1217                 | 1096                 |
| R <sub>B</sub> | 1351                 | 1344                 | 1341                 | 1355                 | 1511                 | 1369                 |
| R <sub>C</sub> | 1386                 | 1375                 | 1364                 | 1377                 | 1545                 | 1399                 |

$c = 0,041 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 968                  | 967                  | 961                  | 968                  | 1069                 | 979                  |
| R <sub>B</sub> | 1167                 | 1165                 | 1163                 | 1175                 | 1294                 | 1183                 |
| R <sub>C</sub> | 1150                 | 1141                 | 1138                 | 1149                 | 1290                 | 1164                 |

TABLA 4.6 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,068 \text{ g/l}$

| Vaso           | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_m$ |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R <sub>A</sub> | 856   | 850   | 850   | 855   | 934   | 864   |
| R <sub>B</sub> | 938   | 931   | 925   | 936   | 1024  | 946   |
| R <sub>C</sub> | 928   | 926   | 921   | 921   | 1030  | 938   |

$c = 0,227 \text{ g/l}$

| Vaso           | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_m$ |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R <sub>A</sub> | 396   | 396   | 391   | 388   | 407   | 396   |
| R <sub>B</sub> | 438   | 414   | 422   | 420   | 448   | 430   |
| R <sub>C</sub> | 436   | 429   | 428   | 422   | 448   | 433   |

TABLA 4.6 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,453 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| R <sub>A</sub> | 194                     | 192                     | 190                     | 187                     | 191                     | 192                     |
| R <sub>B</sub> | 207                     | 205                     | 204                     | 200                     | 211                     | 205                     |
| R <sub>C</sub> | 204                     | 204                     | 201                     | 196                     | 199                     | 202                     |

$c = 0,648 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| R <sub>A</sub> | 118                     | 118                     | 113                     | 113                     | 116                     | 116                     |
| R <sub>B</sub> | 122                     | 111                     | 116                     | 123                     | 127                     | 120                     |
| R <sub>C</sub> | 125                     | 124                     | 122                     | 121                     | 123                     | 123                     |

TABLA 4.7

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,000 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1639                 | 1613                 | 1594                 | 1616                 | 1832                 | 1648                 |
| R <sub>B</sub> | 1852                 | 1835                 | 1835                 | 1853                 | 2098                 | 1878                 |
| R <sub>C</sub> | 1823                 | 1807                 | 1790                 | 1848                 | 2079                 | 1851                 |

TABLA 4.7 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,012 \text{ g/l}$

| Vaso           | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1438                 | 1429                 | 1420                 | 1437                 | 1465                 | 1437                 |
| R <sub>B</sub> | 1645                 | 1637                 | 1629                 | 1646                 | 1733                 | 1652                 |
| R <sub>C</sub> | 1668                 | 1655                 | 1630                 | 1636                 | 1878                 | 1681                 |

$c = 0,031 \text{ g/l}$

| Vaso           | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1284                 | 1270                 | 1267                 | 1271                 | 1334                 | 1284                 |
| R <sub>B</sub> | 1461                 | 1449                 | 1443                 | 1453                 | 1530                 | 1464                 |
| R <sub>C</sub> | 1465                 | 1454                 | 1473                 | 1460                 | 1501                 | 1468                 |

TABLA 4.7 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,078 \text{ g/l}$

| Vaso           | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_m$ |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R <sub>A</sub> | 973   | 955   | 947   | 955   | 1002  | 967   |
| R <sub>B</sub> | 1096  | 1085  | 1085  | 1082  | 1152  | 1097  |
| R <sub>C</sub> | 1107  | 1092  | 1076  | 1075  | 1160  | 1101  |

$c = 0,194 \text{ g/l}$

| Vaso           | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_m$ |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R <sub>A</sub> | 557   | 549   | 537   | 535   | 567   | 551   |
| R <sub>B</sub> | 629   | 620   | 617   | 602   | 658   | 625   |
| R <sub>C</sub> | 649   | 639   | 628   | 623   | 688   | 645   |

TABLA 4.7 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,409 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 261                  | 259                  | 255                  | 250                  | 262                  | 258                  |
| R <sub>B</sub> | 266                  | 271                  | 281                  | 276                  | 281                  | 272                  |
| R <sub>C</sub> | 286                  | 282                  | 279                  | 276                  | 300                  | 284                  |

$c = 0,682 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 151                  | 144                  | 142                  | 136                  | 140                  | 145                  |
| R <sub>B</sub> | 148                  | 140                  | 127                  | 137                  | 144                  | 141                  |
| R <sub>C</sub> | 158                  | 160                  | 153                  | 153                  | 163                  | 157                  |

TABLA 4.8

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,000 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 2202                 | 2183                 | 2143                 | 2121                 | 2278                 | 2187                 |
| R <sub>B</sub> | 2509                 | 2494                 | 2438                 | 2421                 | 2577                 | 2490                 |
| R <sub>C</sub> | 2646                 | 2623                 | 2536                 | 2496                 | 2671                 | 2605                 |



TABLA 4.8 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,022 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u> | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$       | 1875                    | 1866                    | 1812                    | 1775                    | 1900                    | 1851                    |
| $R_B$       | 2128                    | 2105                    | 2069                    | 2037                    | 2162                    | 2105                    |
| $R_C$       | 2363                    | 2352                    | 2259                    | 2183                    | 2270                    | 2305                    |

$c = 0,045 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u> | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_m</math></u> |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$       | 1593                    | 1586                    | 1537                    | 1497                    | 1584                    | 1567                    |
| $R_B$       | 1827                    | 1810                    | 1772                    | 1703                    | 1801                    | 1793                    |
| $R_C$       | 2011                    | 2002                    | 1915                    | 1821                    | 1893                    | 1950                    |

TABLA 4.8 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,064 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1435                 | 1428                 | 1384                 | 1335                 | 1401                 | 1406                 |
| R <sub>B</sub> | 1618                 | 1588                 | 1547                 | 1503                 | 1565                 | 1577                 |
| R <sub>C</sub> | 1796                 | 1779                 | 1704                 | 1612                 | 1664                 | 1734                 |

$c = 0,214 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 682                  | 679                  | 657                  | 607                  | 600                  | 656                  |
| R <sub>B</sub> | 778                  | 782                  | 758                  | 702                  | 674                  | 751                  |
| R <sub>C</sub> | 879                  | 868                  | 816                  | 737                  | 705                  | 823                  |

TABLA 4.8 (cont.)

Intensidad media de iluminación, lux

$c = 0,428 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 330                  | 328                  | 318                  | 289                  | 274                  | 314                  |
| R <sub>B</sub> | 356                  | 373                  | 360                  | 326                  | 304                  | 348                  |
| R <sub>C</sub> | 412                  | 411                  | 387                  | 342                  | 320                  | 386                  |

$c = 0,612 \text{ g/l}$

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>m</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 212                  | 210                  | 197                  | 177                  | 165                  | 196                  |
| R <sub>B</sub> | 229                  | 232                  | 223                  | 199                  | 176                  | 217                  |
| R <sub>C</sub> | 255                  | 248                  | 240                  | 209                  | 189                  | 236                  |

sustituyendo [4.5] en [4.6] e integrando

$$I_m = \frac{I_o}{k_a Lc} ( 1 - e^{-k_a Lc} ) \quad [4.7]$$

Cabe pensar, que la ecuación [4.7] puede ser aplicable a un vaso de cultivo de cualquier forma representando entonces L una longitud característica o recorrido de la luz a través del medio de cultivo.

Por esta razón, se ha reagrupado la ecuación [4.7] en la forma

$$\frac{I_m}{I_o} = \frac{1}{\alpha c} ( 1 - e^{-\alpha c} ) \quad [4.8]$$

englobando en  $\alpha$  el producto  $k_a L$ , y se ha utilizado para ajustar las medidas experimentales por regresión no lineal, utilizando un método iterativo en el que se supone el valor de  $\alpha$  y se tantea hasta hacer mínima la desviación standard entre los valores calculados por [4.8] y los experimentales.

Los valores calculados de  $I_m / I_o$  para cada concentración celular y cada vaso de cultivo, a partir de las tablas 4.5 a 4.8 se indican en las tablas 4.9 a 4.12, y los valores de  $\alpha$  obtenidos por el método de cálculo indicado, para cada vaso y cada intensidad de iluminación incidente se encuentran en la tabla 4.13.

TABLA 4.9

|                                    | $I_o = 932 \text{ lux}$           | $I_o = 1198 \text{ lux}$          | $I_o = 1184 \text{ lux}$          |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <u><math>c, \text{ g/l}</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_A</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_B</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_C</math></u> |
| 0,000                              | 1,000                             | 1,000                             | 1,000                             |
| 0,025                              | 0,835                             | 0,785                             | 0,845                             |
| 0,049                              | 0,842                             | 0,737                             | 0,736                             |
| 0,069                              | 0,676                             | 0,648                             | 0,600                             |
| 0,231                              | 0,323                             | 0,304                             | 0,307                             |
| 0,462                              | 0,150                             | 0,136                             | 0,153                             |
| 0,660                              | 0,092                             | 0,085                             | 0,099                             |

TABLA 4.10

|                                    | $I_o = 1263 \text{ lux}$          | $I_o = 1530 \text{ lux}$          | $I_o = 1568 \text{ lux}$          |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <u><math>c, \text{ g/l}</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_A</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_B</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_C</math></u> |
| 0,000                              | 1,000                             | 1,000                             | 1,000                             |
| 0,020                              | 0,868                             | 0,895                             | 0,892                             |
| 0,041                              | 0,775                             | 0,773                             | 0,742                             |
| 0,068                              | 0,684                             | 0,618                             | 0,598                             |
| 0,227                              | 0,314                             | 0,281                             | 0,276                             |
| 0,453                              | 0,152                             | 0,134                             | 0,129                             |
| 0,648                              | 0,092                             | 0,078                             | 0,078                             |

TABLA 4.11

|                                    | $I_o = 1648 \text{ lux}$          | $I_o = 1878 \text{ lux}$          | $I_o = 1851 \text{ lux}$          |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <u><math>c, \text{ g/l}</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_A</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_B</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_C</math></u> |
| 0,000                              | 1,000                             | 1,000                             | 1,000                             |
| 0,012                              | 0,872                             | 0,880                             | 0,908                             |
| 0,031                              | 0,779                             | 0,780                             | 0,793                             |
| 0,078                              | 0,587                             | 0,584                             | 0,595                             |
| 0,194                              | 0,334                             | 0,333                             | 0,348                             |
| 0,409                              | 0,157                             | 0,145                             | 0,153                             |
| 0,682                              | 0,088                             | 0,075                             | 0,085                             |

TABLA 4.12

|                                    | $I_o = 2187 \text{ lux}$          | $I_o = 2490 \text{ lux}$          | $I_o = 2605 \text{ lux}$          |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <u><math>c, \text{ g/l}</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_A</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_B</math></u> | <u><math>(I_m / I_o)_C</math></u> |
| 0,000                              | 1,000                             | 1,000                             | 1,000                             |
| 0,022                              | 0,846                             | 0,845                             | 0,885                             |
| 0,045                              | 0,717                             | 0,720                             | 0,749                             |
| 0,064                              | 0,643                             | 0,633                             | 0,666                             |
| 0,214                              | 0,300                             | 0,302                             | 0,316                             |
| 0,428                              | 0,144                             | 0,140                             | 0,148                             |
| 0,612                              | 0,090                             | 0,087                             | 0,091                             |



TABLA 4.13

| <u>Vaso de cultivo</u> | <u>I<sub>o</sub> , lux</u> | <u><math>\alpha</math> , l / g</u> | <u>s</u> |
|------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------|
| R <sub>A</sub>         | 932                        | 13,2                               | 0,0193   |
| R <sub>B</sub>         | 1198                       | 14,4                               | 0,0297   |
| R <sub>C</sub>         | 1184                       | 14,4                               | 0,0193   |
| R <sub>A</sub>         | 1263                       | 13,3                               | 0,0176   |
| R <sub>B</sub>         | 1530                       | 14,9                               | 0,0224   |
| R <sub>C</sub>         | 1568                       | 15,8                               | 0,0199   |
| R <sub>A</sub>         | 1648                       | 15,5                               | 0,0213   |
| R <sub>B</sub>         | 1878                       | 15,7                               | 0,0202   |
| R <sub>C</sub>         | 1851                       | 14,8                               | 0,0132   |
| R <sub>A</sub>         | 2187                       | 15,4                               | 0,0095   |
| R <sub>B</sub>         | 2490                       | 15,6                               | 0,0108   |
| R <sub>C</sub>         | 2605                       | 14,0                               | 0,0183   |

Se observa en esta última tabla que - el valor de  $\alpha$  parece no depender de la posición del vaso ni de la intensidad de iluminación incidente, sino que permanece practicamente constante oscilando en el intervalo de 13 a 16 l/g. El valor medio de  $\alpha$  obtenido ha resultado ser de 14,7 l/g, lo que teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción obtenido anteriormente conduce a una longitud característica o recorrido medio de la luz en el vaso de cultivo de 6 cm, valor que está de acuerdo con el tamaño de éstos (diámetro interior: 7,5 cm). Es decir, que la intensidad media de iluminación en los vasos de cultivo utilizados en esta investigación es equivalente a la que habría en una cámara de cultivo paralelepípedica de 6 cm de espesor en la que penetrara la misma intensidad incidente por una de sus caras.

Utilizando el valor de  $\alpha$  obtenido en la ecuación [4.8]

$$\frac{I_m}{I_o} = \frac{1}{14,7 c} ( 1 - e^{-14,7 c} ) \quad [4.9]$$

ecuación que se ha representado en la figura 4.6 junto con los resultados experimentales. Se observa en esta figura que la ecuación [4.9] ajusta bien las medidas de intensidad media de iluminación realizadas, por lo que se ha utilizado en los cálculos sucesivos para evaluar ésta.

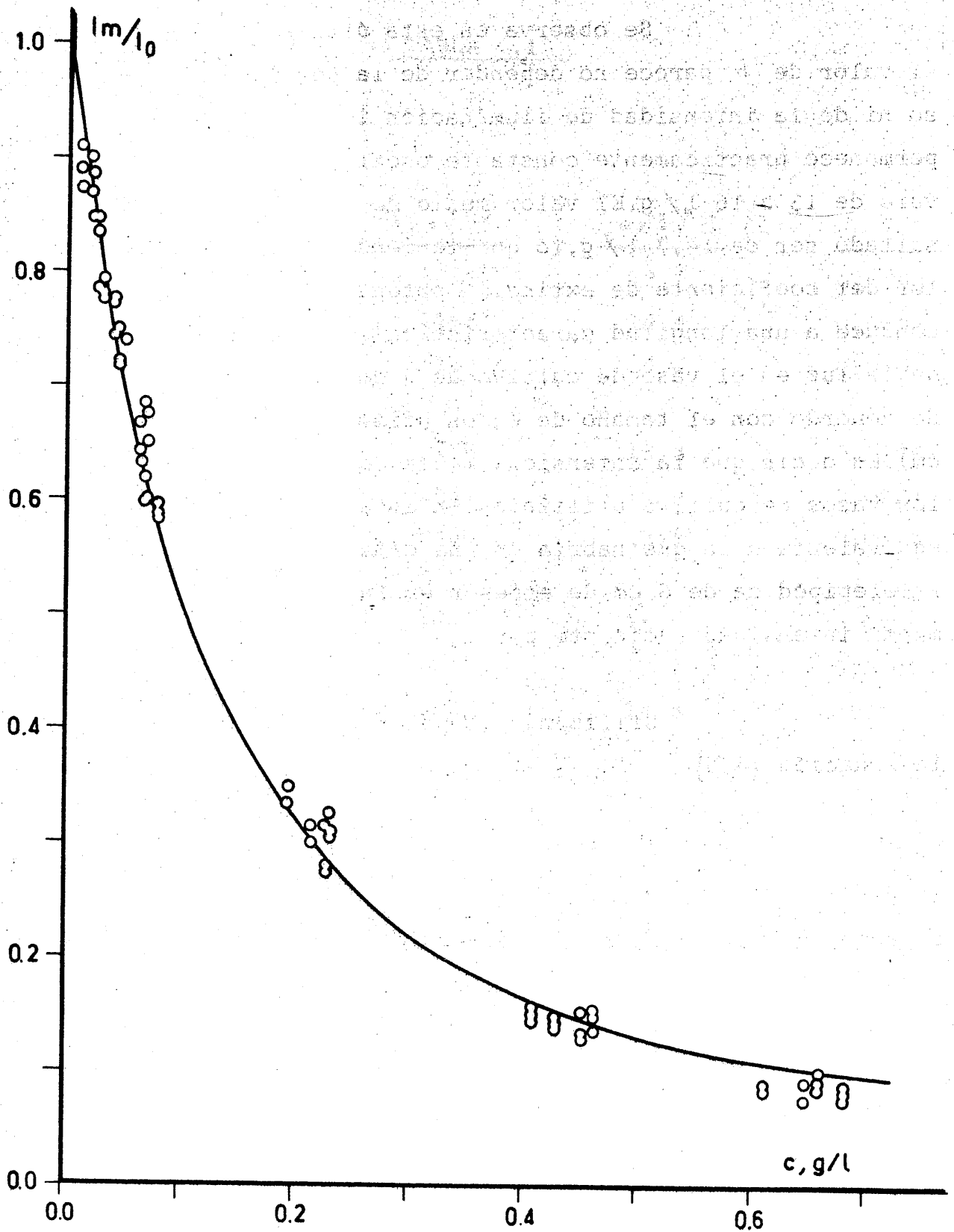


FIG 4.6

#### 4.2 INFLUENCIA DEL GRADO DE MEZCLA

Si las células estuvieran fijas en una misma posición dentro del vaso de cultivo, siendo a pesar de ello uniforme la concentración de biomasa, y el crecimiento estuviera limitado por la iluminación, la velocidad específica media de crecimiento en todo el vaso vendría dada por

$$\bar{\mu} = \frac{1}{V} \int_V \mu(I) \, dV \quad [4.10]$$

donde  $\mu(I)$  sería la velocidad específica de crecimiento local función, evidentemente, de la iluminación local, Tamiya y col. (1953b).

Por el contrario, si la agitación del vaso de cultivo es intensa y por tanto el grado de mezcla, las células pasarían por todas las posiciones del vaso de cultivo con relativa rapidez y podrían comportarse como si estuvieran sometidas a una iluminación uniforme dada por la intensidad media de iluminación en el vaso de cultivo, Rieske y col. (1949).

$$\bar{\mu} = \mu(I_m) \quad [4.11]$$

Es evidente que la situación real estará comprendida entre estos dos casos límites y se aproximará más a uno u otro extremo dependiendo de la veloci

dad de adaptación de la maquinaria fotosintética de las células a intensidades de iluminación cambiantes y del grado de agitación del medio de cultivo.

Con objeto de comprobar cual de estos dos modelos límites se aproxima más a la realidad en las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación, se realizaron tres experimentos cinéticos variando la velocidad del agitador,  $M - 1$  a  $M - 3$ , a  $30^{\circ}\text{C}$  y con una intensidad de iluminación inicial,  $I_0$ , de unos 500 lux --- aproximadamente.

Los valores medios de la intensidad de iluminación en cada sección, así como los medios totales para cada uno de los vasos, se indican en la tabla 4.14 y los resultados obtenidos de la concentración de biomasa a distintos tiempos, para cada uno de estos experimentos, en las tablas 4.15 a 4.17.

En las figuras 4.7 y 4.8 se ha representado la concentración de biomasa frente al tiempo para estos experimentos, en la primera en coordenadas semi-logarítmicas y en la segunda en coordenadas lineales. Estas dos representaciones ponen claramente de manifiesto la existencia de los periodos exponencial y lineal de crecimiento indicados en la bibliografía, pero no aparecen diferencias sensibles por el grado de agitación del medio de cultivo, lo que indica que la situación real se encuen

TABLA 4.14

Experimentos M - 1, M - 2, M - 3  
Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 477                  | 471                  | 455                  | 454                  | 532                  | 482                  |
| R <sub>B</sub> | 493                  | 487                  | 480                  | 512                  | 580                  | 504                  |
| R <sub>C</sub> | 480                  | 480                  | 460                  | 464                  | 535                  | 481                  |

TABLA 4.15

Experimento M - 1

Cinética del crecimiento, 1400 r.p.m.

| <u>t, h</u> | <u>c, g/l</u> |
|-------------|---------------|
| 0,00        | 0,0086        |
| 7,00        | 0,0135        |
| 22,00       | 0,0269        |
| 26,00       | 0,0306        |
| 31,00       | 0,0380        |
| 46,00       | 0,0710        |
| 50,00       | 0,0808        |
| 55,00       | 0,0980        |
| 70,00       | 0,1556        |
| 74,00       | 0,1666        |
| 79,00       | 0,1813        |
| 94,00       | 0,2401        |
| 98,00       | 0,2548        |
| 103,00      | 0,2646        |
| 118,25      | 0,3381        |

TABLA 4.16

Experimento M - 2

Cinética del crecimiento, 1200 r.p.m.

| <u>t, h</u> | <u>c, g/l</u> |
|-------------|---------------|
| 0,00        | 0,0086        |
| 7,00        | 0,0135        |
| 22,00       | 0,0269        |
| 26,00       | 0,0306        |
| 31,00       | 0,0380        |
| 46,00       | 0,0735        |
| 50,00       | 0,0833        |
| 55,00       | 0,0992        |
| 70,00       | 0,1605        |
| 74,00       | 0,1666        |
| 79,00       | 0,1860        |
| 94,00       | 0,2401        |
| 98,00       | 0,2597        |
| 103,00      | 0,2744        |
| 118,25      | 0,3479        |



TABLA 4.17

Experimento M - 3

Cinética del crecimiento, 1100 r.p.m.

| <u>t, h</u> | <u>c, g/l</u> |
|-------------|---------------|
| 0,00        | 0,0086        |
| 7,00        | 0,0135        |
| 22,00       | 0,0269        |
| 26,00       | 0,0306        |
| 31,00       | 0,0404        |
| 46,00       | 0,0747        |
| 50,00       | 0,0870        |
| 55,00       | 0,1053        |
| 70,00       | 0,1666        |
| 74,00       | 0,1764        |
| 79,00       | 0,1960        |
| 94,00       | 0,2548        |
| 98,00       | 0,2793        |
| 103,00      | 0,2940        |
| 118,25      | 0,3724        |

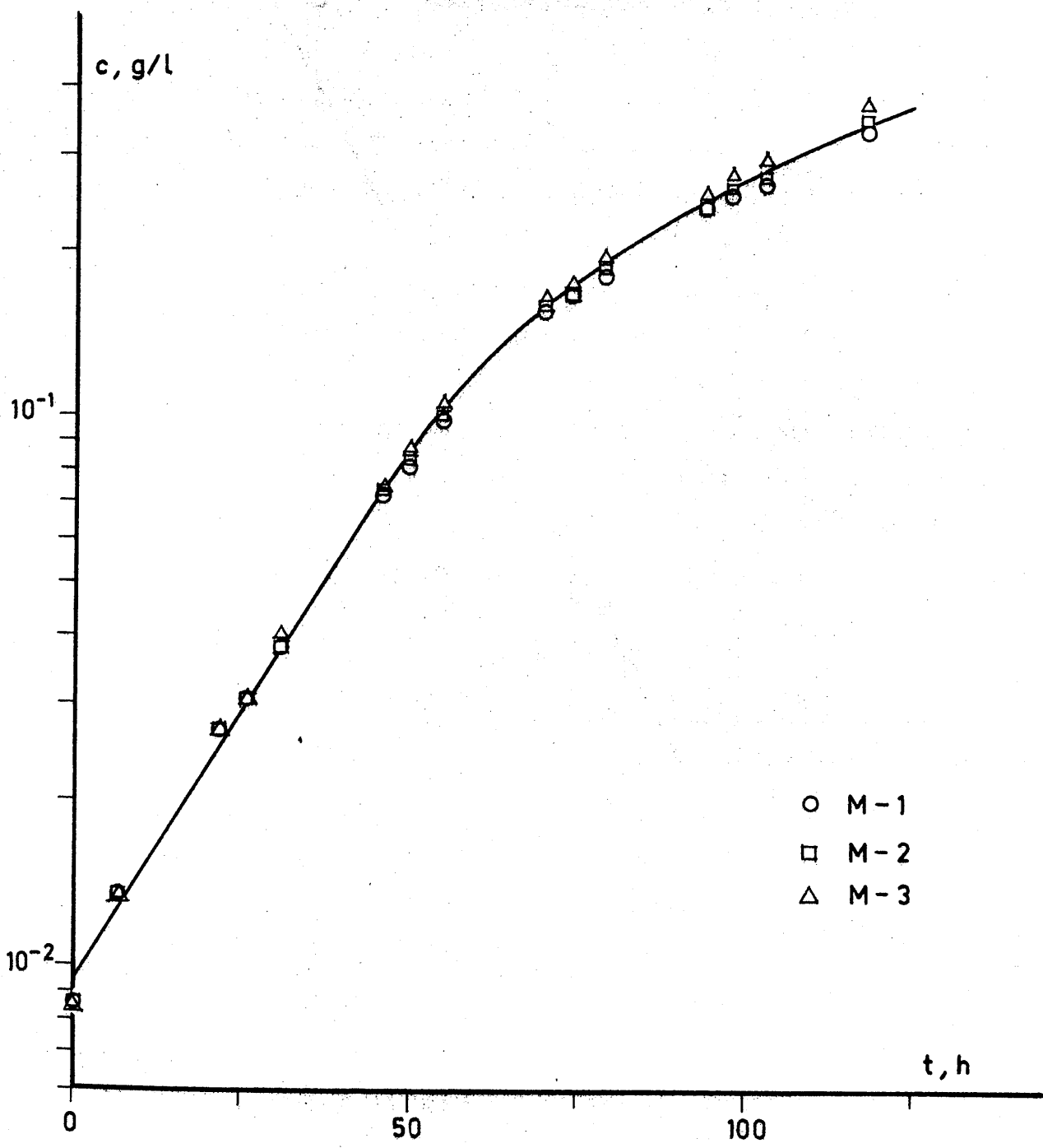
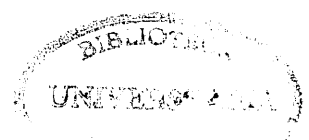


FIG 4.7



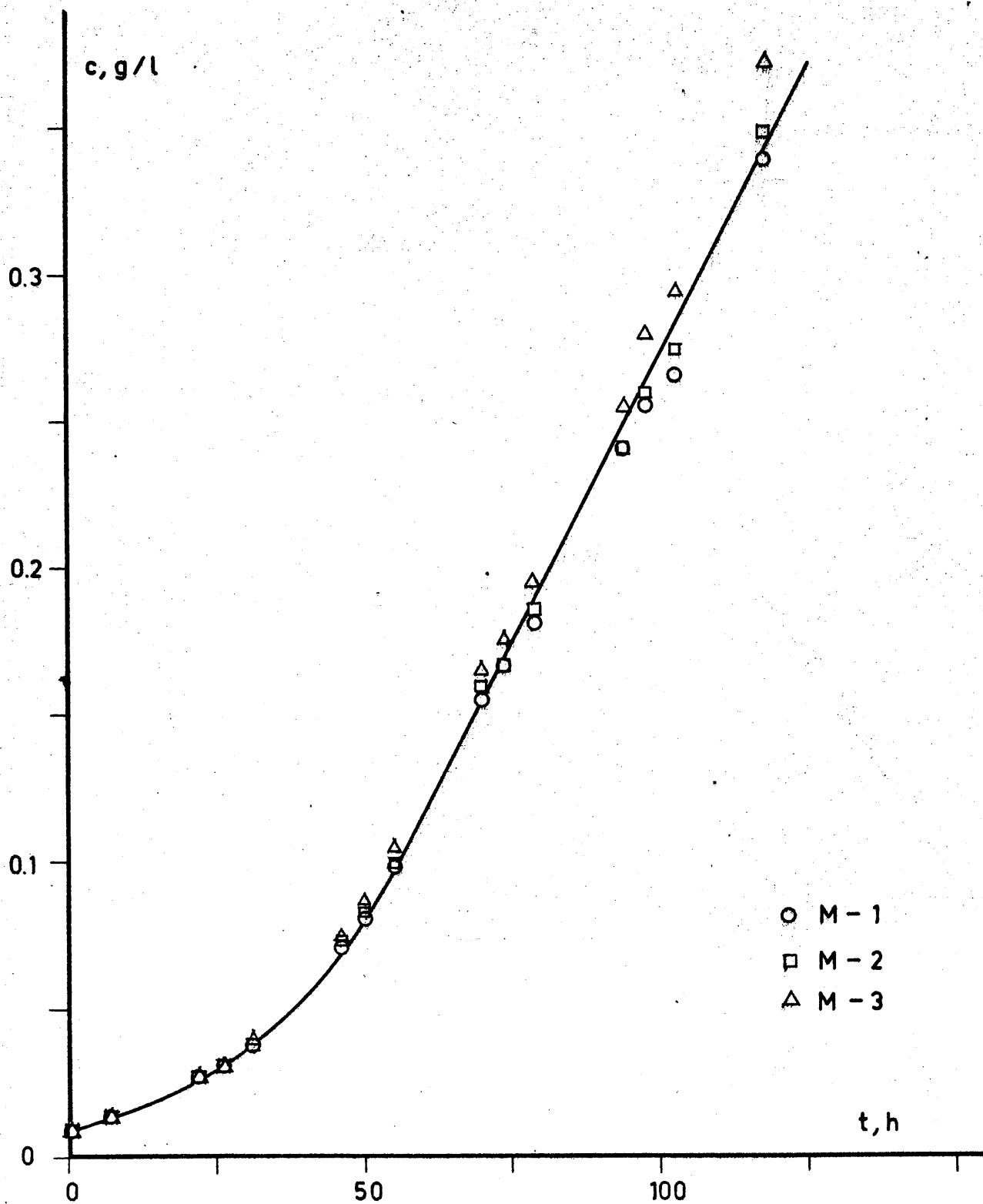


FIG 4.8

tra más próxima a la ecuación [4.11] que a la ecuación [4.10].

Es interesante destacar que Tamiya y col. (1953b) utilizan la ecuación [4.10] para explicar la aparición de los periodos exponencial y lineal de crecimiento, suponiendo una influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad específica de crecimiento - que responde a la ecuación de Monod. Aunque los resultados de Tamiya fueron obtenidos en una cámara plana de 2, 8 cm de espesor, sin agitación mecánica, parece lógico suponer que el simple burbujeo del gas en la misma determine un grado de agitación próximo a la mezcla perfecta lo que significa de acuerdo con los resultados de esta investigación que la situación real en sus experimentos debería estar más próxima a lo previsto por la ecuación [4.11].

En el mismo sentido, pueden interpretarse los experimentos con luz intermitente, comentados en la introducción de esta memoria. En efecto, cuando se hacen crecer las células en una cámara de cultivo de muy pequeño espesor y a bajas concentraciones de biomasa, de manera que la intensidad de iluminación sea prácticamente uniforme e igual a  $I_0$  por evitarse las sombras mutuas entre las células, y se somete la suspensión a iluminación intermitente, la situación es semejante a la de un cultivo de espesor y concentración de biomasa apreciable sometido a iluminación continua y agitado.

Los resultados obtenidos por Kok (1953) y los de Phillips y Myers (1954b) ponen de manifiesto que cuando se utiliza iluminación intermitente el comportamiento de las células es intermedio entre lo previsto por las ecuaciones [4.10] y [4.11] aproximándose a esta última al disminuir los tiempos de flash.

Es evidente que tiempos de flash pequeños en iluminación intermitente son equivalentes a altos grados de agitación en cultivos de espesor o concentración de biomasa apreciable. Para los experimentos de luz intermitente la ecuación equivalente a la [4.10] sería

$$\bar{\mu} = \frac{1}{t_f + t_d} \mu(I_o) t_f \quad [4.12]$$

mientras que la ecuación equivalente a la [4.11] sería la misma

$$\bar{\mu} = \mu(I_m) \quad [4.11]$$

donde

$$I_m = I_o \frac{t_f}{t_f + t_d} \quad [4.13]$$

Los autores anteriormente citados encuentran en todos los casos que las velocidades específicas medias de crecimiento son superiores a lo previsto -

por la ecuación [4.12] e inferiores a lo previsto por la ecuación [4.11] aunque se aproximan a esta última al disminuir los tiempos de flash haciéndose prácticamente iguales para tiempos de flash del orden de 1 ms.

Por ejemplo, a partir de los resultados de Myers se obtiene la curva de saturación que se indica en la figura 4.9, si se consideran los cuatro experimentos realizados por Myers con un valor del tiempo fraccional

$$\frac{t_f}{t_f + t_d} = 0,1$$

las velocidades específicas de crecimiento medias medidas experimentalmente son

| $t_f$ , ms | $\bar{\mu}$ , h <sup>-1</sup> |
|------------|-------------------------------|
| 66,70      | 0,0225                        |
| 16,70      | 0,0492                        |
| 4,17       | 0,0638                        |
| 1,04       | 0,0767                        |

La intensidad de iluminación usada en los flash fué de 59000 lux, a la que de acuerdo con la figura 4.9 le corresponde una velocidad específica de crecimiento de 0,0875 h<sup>-1</sup>. Por tanto utilizando la ecuación [4.12] el valor de  $\bar{\mu}$  esperado sería

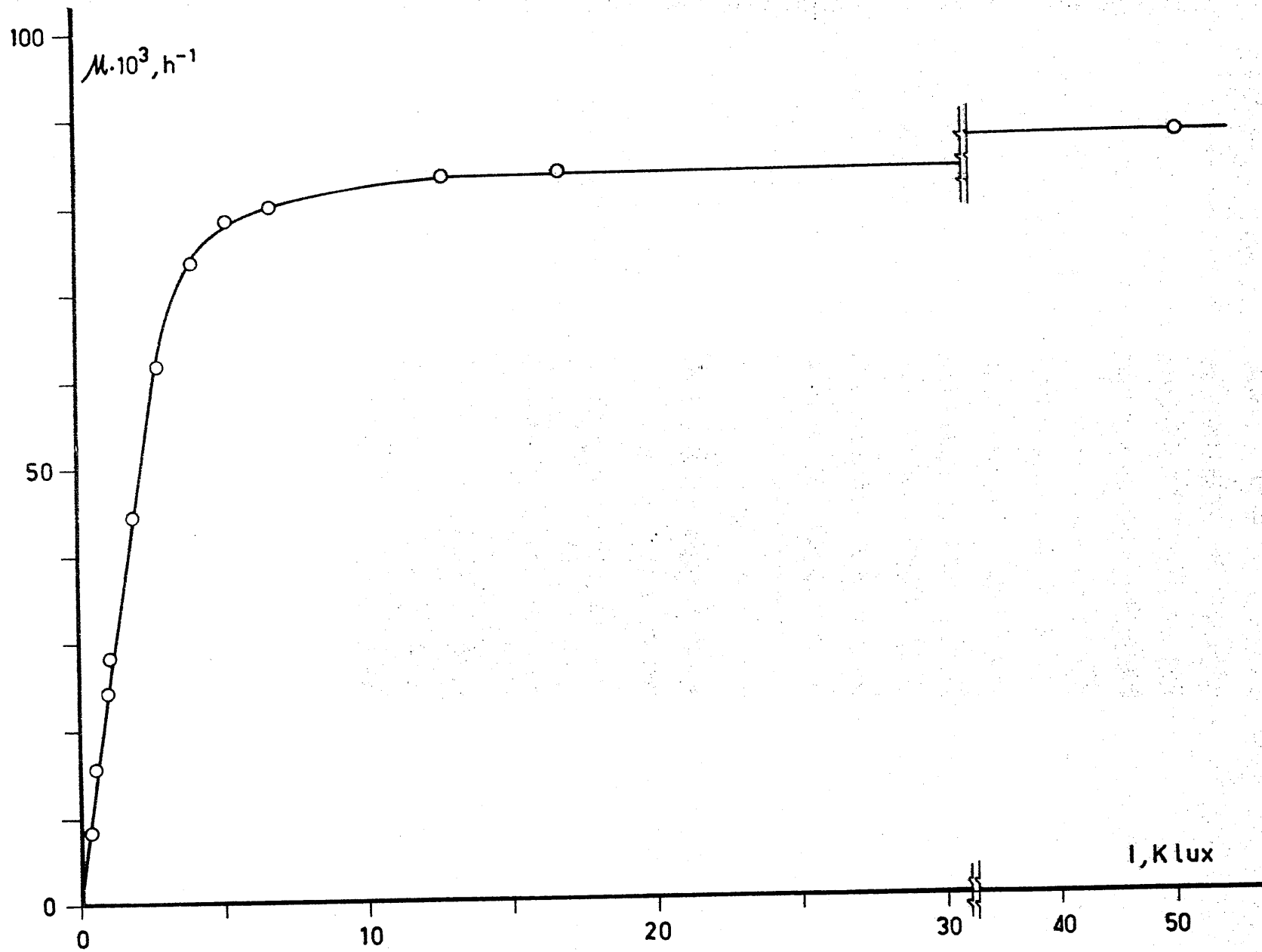


FIG 4.9

$$\bar{\mu} = 0,1 \cdot 0,0875 = 0,00875 \text{ h}^{-1}$$

Si se promedia en el tiempo la intensidad de iluminación, ecuación [4.13]

$$I_m = 59000 \cdot 0,1 = 5900 \text{ lux}$$

con lo que el valor de  $\bar{\mu}$  esperado de acuerdo con [4.11] sería el que se obtiene de la figura 4.9 para esta última iluminación,  $0,0790 \text{ h}^{-1}$ .

Es evidente que los valores de  $\mu$  medidos experimentalmente ponen claramente de manifiesto - lo que se indicó anteriormente. También se deduce de estos resultados que para intensidades de iluminación correspondientes a la primera zona lineal de la figura 4.9 ambos modelos conducen al mismo resultado, sin embargo para intensidades de iluminación superiores a  $I_s$  la turbulencia (equivalente a la intermitencia) permite un mayor aprovechamiento de la energía luminosa.



El presente informe se refiere a los resultados de la investigación  
realizada en el laboratorio de Física y Química de la Universidad de  
Sevilla, durante el curso 1963-64.

Sevilla, a 15 de Mayo de 1964.

El presente informe tiene como objeto exponer los resultados  
obtenidos en el curso de la investigación llevada a cabo en el  
laboratorio de Física y Química de la Universidad de Sevilla.

En el presente informe se exponen los resultados obtenidos  
en el curso de la investigación llevada a cabo en el laboratorio  
de Física y Química de la Universidad de Sevilla. Los resultados  
obtenidos se exponen en el presente informe. Los resultados  
obtenidos se exponen en el presente informe. Los resultados  
obtenidos se exponen en el presente informe. Los resultados  
obtenidos se exponen en el presente informe.

#### 4.3 INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE ILUMINACION

Para estudiar la influencia de la intensidad de iluminación sobre la cinética del crecimiento de *Chlorella Pyrenoidosa* se realizaron una serie de experimentos, de C - 1 a C - 7, a 30°C y en las condiciones ya indicadas en la Técnica Experimental.

La intensidad de iluminación,  $I_0$ , se varió entre 250 y 2500 lux aproximadamente, mediante la utilización de mallas metálicas de diferentes luces que se interponían entre los tubos fluorescentes y los vasos de cultivo. En cada experimento se seguía la cinética del crecimiento independientemente en los tres vasos de cultivo:  $R_A$ ,  $R_B$  y  $R_C$ , cuya posición se ajustó procurando que los valores de  $I_0$  fueran prácticamente los mismos.

La duración de los experimentos fue tal que permitía tener un número suficiente de puntos experimentales tanto de la zona exponencial como de la zona lineal de crecimiento, por lo que varió desde 275 horas para la intensidad de iluminación más baja hasta 96 horas para la más alta. Algunos de estos experimentos se prolongaron por más tiempo después de centrifugar el medio de cultivo, separar las células y resuspenderlas en medio fresco, con objeto de evitar cualquier limitación del crecimiento por déficit de algún nutriente o acumulación de productos tóxicos del metabolismo, si bien esta

última hipótesis ha sido descartada generalmente por los investigadores, como se ha indicado en la Introducción de esta memoria. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que en los periodos de tiempo indicados anteriormente no se producía ningún efecto limitante del crecimiento más que el que se pretendía estudiar, ya que en ningún caso se producía un incremento de la velocidad de crecimiento después de la primera centrifugación.

Por otra parte, un cálculo aproximado pone de manifiesto también que el medio de cultivo utilizado posee un potencial de nutrientes superior al consumido para la biomasa producida.

En efecto de acuerdo con los resultados de Zarnowski (1972) que estudia comparativamente los consumos de nutrientes en 16 medios de cultivo para *Chlorella*, entre los cuales está el utilizado en esta investigación, para producir 1 gramo de biomasa se consumen como media, las siguientes cantidades de nutrientes esenciales (dejando aparte de momento el  $\text{CO}_2$  y el agua)

|   |       |         |
|---|-------|---------|
| N | ..... | 65,5 mg |
| P | ..... | 25,9 mg |
| K | ..... | 27,6 mg |

la más alta concentración de biomasa alcanzada antes de la primera centrifugación, de los experimentos que se es-

tán comentando, corresponde al C - 7 y fué de 1,37 g/l , que teniendo en cuenta que el volumen de medio de cultivo fué de medio litro debería implicar un consumo de

N ..... 44,7 mg

P ..... 17,7 mg

K ..... 18,2 mg

apreciablemente inferior a las disponibilidades del medio de cultivo usado, que de acuerdo con su composición - indicada en la parte 3 de esta memoria, contiene por cada 500 cc

N ..... 70 mg

P ..... 78,5 mg

K ..... 195 mg

Los resultados obtenidos en estos experimentos se encuentran en las tablas 4.18 a 4.31. Para cada uno de ellos, se indican en una primera tabla las concentraciones de biomasa medidas a distintos tiempos en cada uno de los tres vasos así como el valor medio de las mismas y en una segunda tabla se indican las medidas de intensidad de iluminación correspondientes al principio - del experimento, es decir, a los vasos de cultivo con el medio fresco antes de introducir el inóculo.

Los valores de la concentración de -

TABLA 4.18

Experimento C - 1

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0089                    | 0,0089                    | 0,0089                    | 0,0089                    |
| 9,00        | 0,0119                    | 0,0119                    | 0,0119                    | 0,0119                    |
| 24,00       | 0,0171                    | 0,0171                    | 0,0179                    | 0,0174                    |
| 33,00       | 0,0210                    | 0,0211                    | 0,0220                    | 0,0214                    |
| 49,50       | 0,0293                    | 0,0301                    | 0,0301                    | 0,0298                    |
| 57,00       | 0,0320                    | 0,0331                    | 0,0350                    | 0,0334                    |
| 72,00       | 0,0422                    | 0,0450                    | 0,0450                    | 0,0441                    |
| 81,00       | 0,0522                    | 0,0552                    | 0,0572                    | 0,0549                    |
| 96,00       | 0,0670                    | 0,0690                    | 0,0710                    | 0,0690                    |
| 105,00      | 0,0812                    | 0,0884                    | 0,0916                    | 0,0871                    |
| 107,00      | 0,0836                    | 0,0920                    | 0,0956                    | 0,0904                    |
| 116,00      | 0,0984                    | 0,1024                    | 0,1084                    | 0,1031                    |
| 131,00      | 0,1180                    | 0,1252                    | 0,1320                    | 0,1251                    |
| 140,00      | 0,1340                    | 0,1360                    | 0,1480                    | 0,1393                    |
| 156,50      | 0,1688                    | 0,1728                    | 0,1840                    | 0,1752                    |
| 164,00      | 0,1824                    | 0,1888                    | 0,2000                    | 0,1904                    |
| 179,00      | 0,2160                    | 0,2288                    | 0,2424                    | 0,2291                    |
| 188,00      | 0,2288                    | 0,2472                    | 0,2488                    | 0,2416                    |
| 203,00      | 0,2624                    | 0,2960                    | 0,2888                    | 0,2824                    |
| 212,00      | 0,2848                    | 0,3144                    | 0,3144                    | 0,3045                    |
| 227,00      | 0,3136                    | 0,3520                    | 0,3360                    | 0,3339                    |
| 236,00      | 0,3376                    | 0,3824                    | 0,3680                    | 0,3627                    |
| 259,50      | 0,3856                    | 0,4720                    | 0,4208                    | 0,4261                    |
| 275,50      | 0,4336                    | 0,5376                    | 0,4576                    | 0,4763                    |

TABLA 4.19

Experimento C - 1

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 243                  | 241                  | 235                  | 233                  | 260                  | 242                  |
| R <sub>B</sub> | 258                  | 258                  | 255                  | 254                  | 291                  | 261                  |
| R <sub>C</sub> | 251                  | 249                  | 244                  | 246                  | 282                  | 253                  |

$$(I_o)_m = 252$$

TABLA 4.20

Experimento C - 2

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0089                    | 0,0089                    | 0,0089                    | 0,0089                    |
| 9,00        | 0,0126                    | 0,0126                    | 0,0126                    | 0,0126                    |
| 24,00       | 0,0261                    | 0,0290                    | 0,0270                    | 0,0274                    |
| 33,00       | 0,0330                    | 0,0379                    | 0,0345                    | 0,0351                    |
| 48,00       | 0,0610                    | 0,0764                    | 0,0680                    | 0,0685                    |
| 57,00       | 0,0768                    | 0,1080                    | 0,0920                    | 0,0923                    |
| 72,00       | 0,1256                    | 0,1688                    | 0,1408                    | 0,1451                    |
| 81,00       | 0,1440                    | 0,1912                    | 0,1656                    | 0,1669                    |
| 96,00       | 0,1888                    | 0,2528                    | 0,2208                    | 0,2208                    |
| 105,00      | 0,2128                    | 0,2920                    | 0,2560                    | 0,2536                    |
| 120,00      | 0,2512                    | 0,3456                    | 0,2976                    | 0,2981                    |
| 129,00      | 0,2656                    | 0,3824                    | 0,3200                    | 0,3227                    |
| 144,00      | 0,3248                    | 0,4688                    | 0,3936                    | 0,3957                    |
| 153,00      | 0,3680                    | 0,5008                    | 0,4320                    | 0,4336                    |

TABLA 4.21

Experimento C - 2

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 458                  | 453                  | 443                  | 446                  | 504                  | 459                  |
| R <sub>B</sub> | 525                  | 520                  | 512                  | 512                  | 579                  | 527                  |
| R <sub>C</sub> | 493                  | 488                  | 480                  | 483                  | 555                  | 497                  |

$$(I_o)_m = 494$$



TABLA 4.22

Experimento C - 3

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0078                    | 0,0078                    | 0,0078                    | 0,0078                    |
| 7,75        | 0,0122                    | 0,0122                    | 0,0122                    | 0,0122                    |
| 22,25       | 0,0269                    | 0,0269                    | 0,0220                    | 0,0253                    |
| 31,25       | 0,0380                    | 0,0380                    | 0,0318                    | 0,0359                    |
| 48,25       | 0,0906                    | 0,0931                    | 0,0661                    | 0,0833                    |
| 55,25       | 0,1237                    | 0,1249                    | 0,0882                    | 0,1123                    |
| 70,25       | 0,1935                    | 0,1984                    | 0,1494                    | 0,1804                    |
| 79,25       | 0,2327                    | 0,2499                    | 0,1911                    | 0,2246                    |
| 94,25       | 0,3234                    | 0,3381                    | 0,2695                    | 0,3103                    |
| 103,25      | 0,3626                    | 0,3920                    | 0,3234                    | 0,3593                    |
| 118,75      | 0,4655                    | 0,4949                    | 0,4214                    | 0,4606                    |
| 127,75      | 0,5047                    | 0,5488                    | 0,4557                    | 0,5031                    |
| 151,75      | 0,6174                    | 0,6860                    | 0,5782                    | 0,6272                    |
| 166,25      | 0,7350                    | 0,8185                    | 0,6762                    | 0,7432                    |

TABLA 4.23

Experimento C - 3

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 725                  | 719                  | 706                  | 743                  | 742                  | 726                  |
| R <sub>B</sub> | 769                  | 764                  | 751                  | 747                  | 814                  | 768                  |
| R <sub>C</sub> | 717                  | 709                  | 701                  | 718                  | 818                  | 726                  |

$$(I_o)_m = 740$$

TABLA 4.24

Experimento C - 4

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0100                    | 0,0100                    | 0,0100                    | 0,0100                    |
| 9,00        | 0,0245                    | 0,0245                    | 0,0245                    | 0,0245                    |
| 24,00       | 0,0698                    | 0,0759                    | 0,0698                    | 0,0718                    |
| 33,00       | 0,1029                    | 0,1274                    | 0,1029                    | 0,1111                    |
| 49,00       | 0,2572                    | 0,3332                    | 0,2866                    | 0,2923                    |
| 57,00       | 0,3332                    | 0,4067                    | 0,3430                    | 0,3610                    |
| 72,00       | 0,4704                    | 0,5880                    | 0,4900                    | 0,5161                    |
| 81,00       | 0,5292                    | 0,6762                    | 0,5782                    | 0,5945                    |
| 96,00       | 0,7154                    | 0,8722                    | 0,7252                    | 0,7709                    |

TABLA 4.25

Experimento C - 4

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1060                 | 1049                 | 1033                 | 1053                 | 1172                 | 1067                 |
| R <sub>B</sub> | 1185                 | 1170                 | 1161                 | 1183                 | 1330                 | 1197                 |
| R <sub>C</sub> | 1107                 | 1091                 | 1080                 | 1106                 | 1269                 | 1120                 |

$$(I_o)_m = 1128$$

TABLA 4.26

Experimento C - 5

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    |
| 6,75        | 0,0171                    | 0,0171                    | 0,0171                    | 0,0171                    |
| 22,75       | 0,0514                    | 0,0576                    | 0,0539                    | 0,0543                    |
| 31,58       | 0,0931                    | 0,1151                    | 0,1041                    | 0,1041                    |
| 46,00       | 0,2254                    | 0,2744                    | 0,2646                    | 0,2548                    |
| 54,75       | 0,3185                    | 0,3724                    | 0,3626                    | 0,3512                    |
| 71,25       | 0,4606                    | 0,5586                    | 0,5586                    | 0,5259                    |
| 78,75       | 0,5488                    | 0,6566                    | 0,6566                    | 0,6207                    |
| 94,75       | 0,7350                    | 0,8428                    | 0,8526                    | 0,8101                    |
| 102,75      | 0,8134                    | 0,9604                    | 0,9702                    | 0,9147                    |
| 119,00      | 0,9996                    | 1,1564                    | 1,1858                    | 1,1139                    |

TABLA 4.27

Experimento C - 5

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1190                 | 1167                 | 1145                 | 1184                 | 1309                 | 1193                 |
| R <sub>B</sub> | 1223                 | 1203                 | 1183                 | 1235                 | 1359                 | 1232                 |
| R <sub>C</sub> | 1174                 | 1152                 | 1120                 | 1110                 | 1209                 | 1157                 |

$$(I_0)_m = 1194$$

TABLA 4.28

Experimento C - 6

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0083                    | 0,0083                    | 0,0083                    | 0,0083                    |
| 9,00        | 0,0186                    | 0,0191                    | 0,0183                    | 0,0187                    |
| 24,00       | 0,0544                    | 0,0500                    | 0,0522                    | 0,0522                    |
| 33,00       | 0,1400                    | 0,1504                    | 0,1480                    | 0,1461                    |
| 48,00       | 0,3296                    | 0,3408                    | 0,3328                    | 0,3344                    |
| 57,00       | 0,3888                    | 0,4496                    | 0,4688                    | 0,4357                    |
| 72,00       | 0,6112                    | 0,6208                    | 0,7168                    | 0,6496                    |
| 81,00       | 0,7456                    | 0,7872                    | 0,8128                    | 0,7819                    |
| 96,00       | 0,9280                    | 1,0432                    | 1,0048                    | 0,9920                    |

TABLA 4.29

Experimento C - 6  
Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1637                 | 1620                 | 1588                 | 1604                 | 1752                 | 1636                 |
| R <sub>B</sub> | 1752                 | 1741                 | 1714                 | 1739                 | 1857                 | 1755                 |
| R <sub>C</sub> | 1690                 | 1660                 | 1624                 | 1641                 | 1738                 | 1673                 |

$$(I_0)_m = 1688$$



TABLA 4.30

Experimento C - 7

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0111                    | 0,0111                    | 0,0111                    | 0,0111                    |
| 9,00        | 0,0306                    | 0,0306                    | 0,0294                    | 0,0302                    |
| 24,00       | 0,0980                    | 0,0955                    | 0,0980                    | 0,0972                    |
| 49,50       | 0,4704                    | 0,5292                    | 0,5194                    | 0,5063                    |
| 57,50       | 0,6174                    | 0,6958                    | 0,6860                    | 0,6664                    |
| 72,00       | 0,8428                    | 0,9800                    | 0,9604                    | 0,9277                    |
| 81,25       | 0,9800                    | 1,1760                    | 1,1564                    | 1,1041                    |
| 96,00       | 1,2152                    | 1,4307                    | 1,4503                    | 1,3654                    |

TABLA 4.31

Experimento C - 7

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 2294                 | 2296                 | 2222                 | 2251                 | 2457                 | 2296                 |
| R <sub>B</sub> | 2539                 | 2498                 | 2443                 | 2446                 | 2640                 | 2516                 |
| R <sub>C</sub> | 2440                 | 2416                 | 2351                 | 2331                 | 2532                 | 2417                 |

$$(I_o)_m = 2410$$

biomasa en función del tiempo para el experimento C - 1 correspondiente a 250 lux aproximadamente, se han representado en la figura 4.10, en la que se observa claramente que a partir de las 130 horas el crecimiento se hace lineal. También se aprecia en esta figura que los resultados obtenidos en los tres vasos de cultivo son semejantes.

Análogas conclusiones pueden deducirse de la figura 4.11 en la que se ha realizado la misma representación anterior en coordenadas semilogarítmicas, se aprecia bien la zona exponencial de crecimiento que corresponde aproximadamente a las 120 primeras horas y no se observan diferencias sensibles entre los resultados obtenidos en los tres vasos de cultivo. Por esta razón, se trabajará en lo sucesivo con los valores medios de los tres vasos y con la intensidad media inicial.

En las figuras 4.12 y 4.13 se ha realizado la misma representación que en las dos figuras anteriores con los valores medios para los tres vasos de la concentración de biomasa en función del tiempo y para los siete experimentos comentados cuyos resultados primarios se indican en las tablas anteriores. En estas figuras, se observa claramente la existencia de las zonas exponencial y lineal de crecimiento en todos estos experimentos, así como que la velocidad específica de crecimiento correspondiente a la zona exponencial y la velocidad-

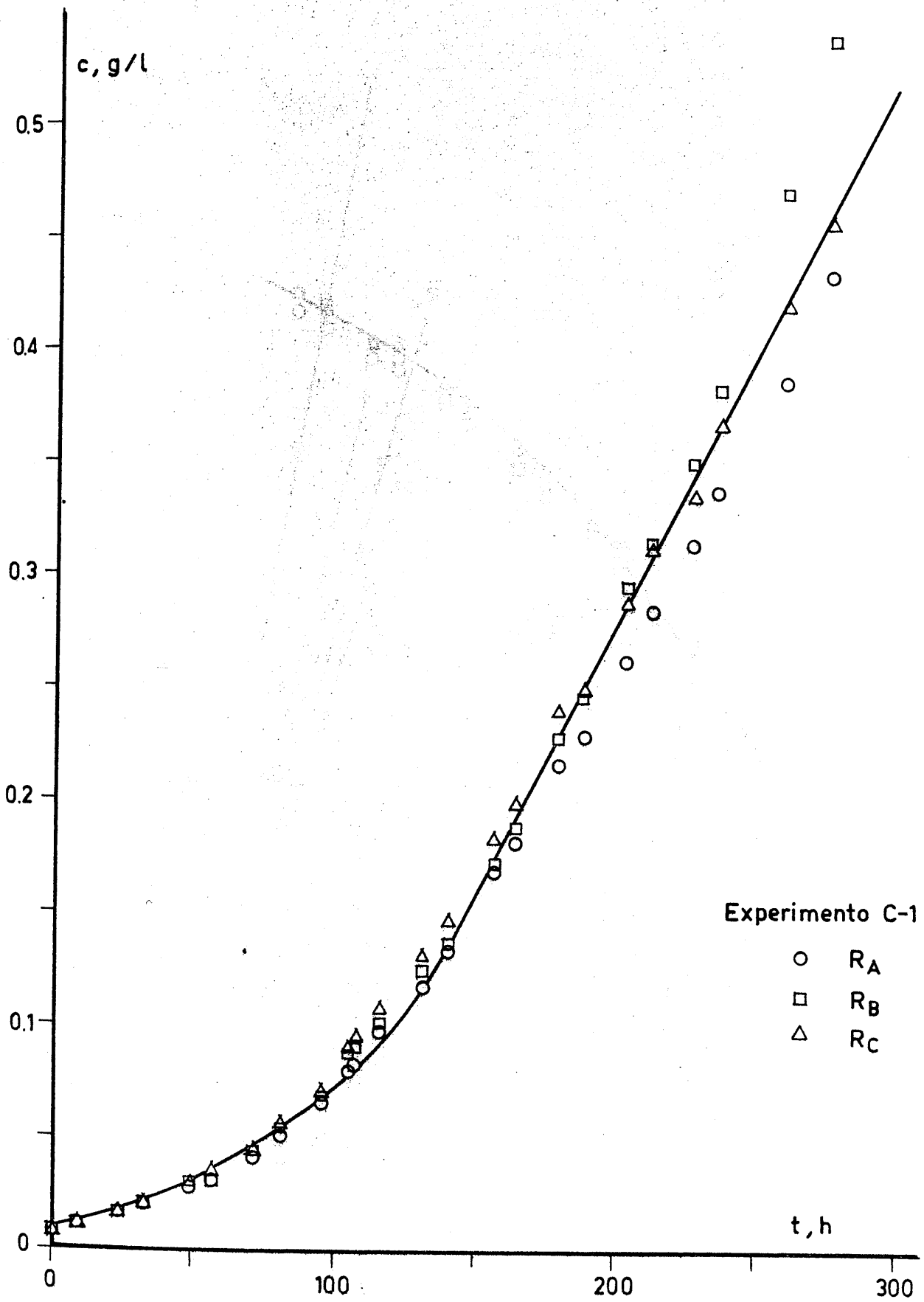


FIG 4.10

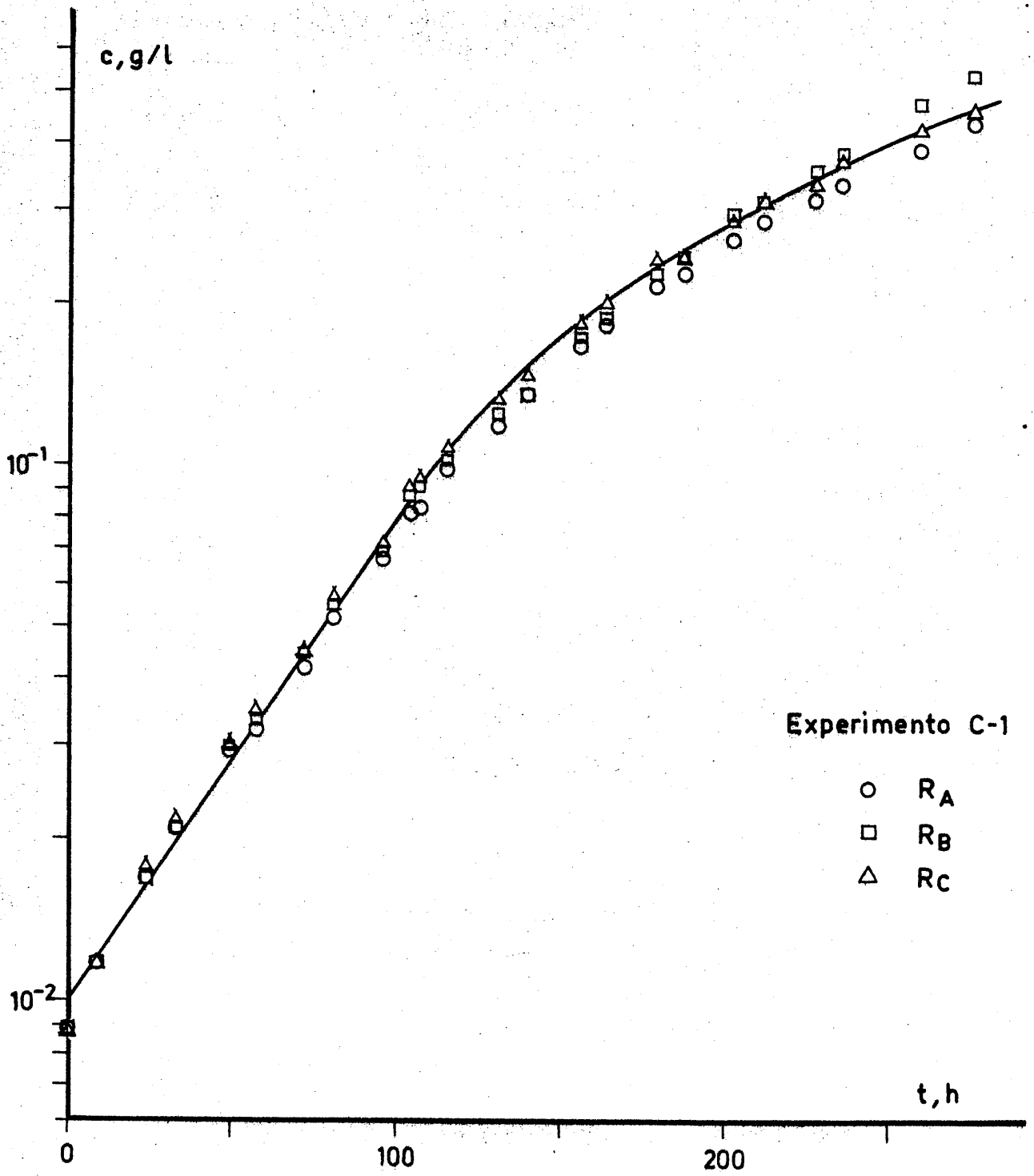


FIG 4.11

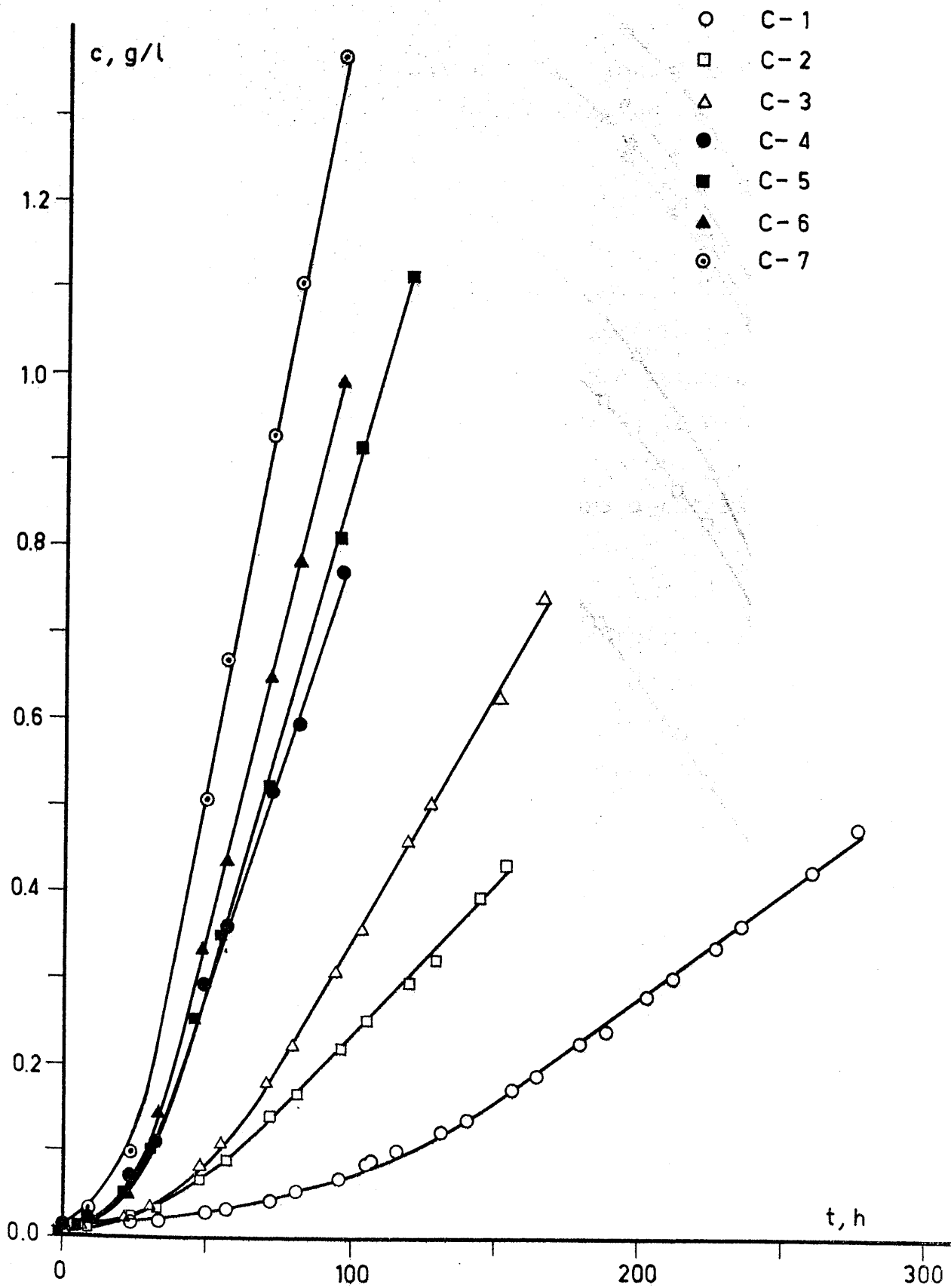


FIG 4.12

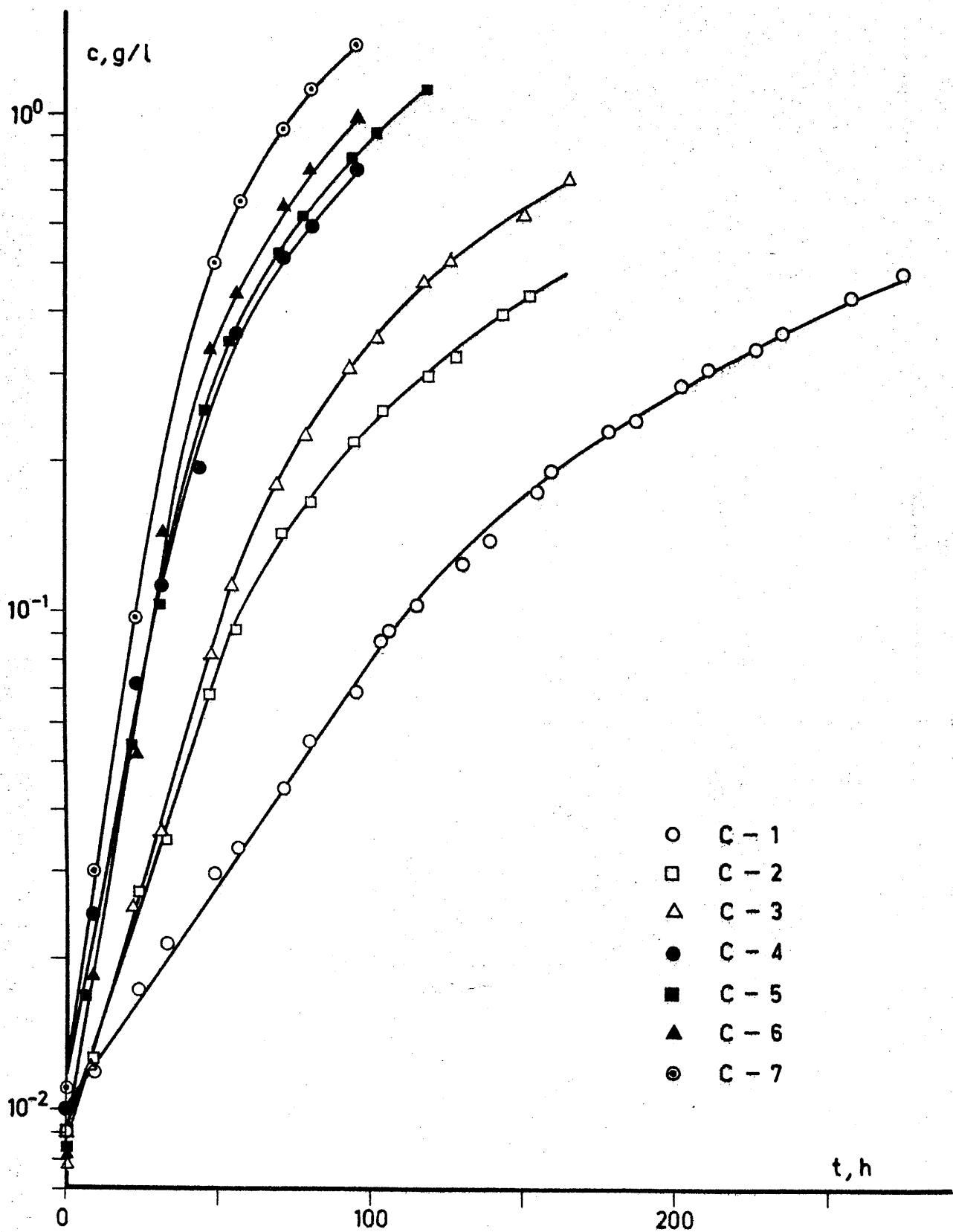


FIG 4.13

de crecimiento correspondiente a la zona lineal aumentan con la intensidad inicial de iluminación.

No obstante esta última conclusión es evidente en la figura 4.12 en lo que se refiere a la velocidad de crecimiento en la zona lineal, pero en la figura 4.13 parece observarse un claro aumento de la velocidad específica de crecimiento en los experimentos correspondientes a las cuatro intensidades de iluminación iniciales más bajas, si bien la diferencia entre las tres últimas es más pequeña como si empezara a notarse un efecto de saturación de luz.

Con el fin de cuantificar estas observaciones se hacía necesario el ajuste de los datos concentración de biomasa-tiempo a algún tipo de función que permitiera su tratamiento matemático posterior.

Evidentemente la solución más inmediata es aprovechar la existencia de las dos zonas indicadas y ajustar los datos del primer periodo exponencial a la ecuación

$$\ln c = \mu t + b \quad [4.14]$$

y los correspondientes al segundo periodo, lineal, a la ecuación



$$c = pt + b' \quad [4.15]$$

obteniéndose de esta manera los valores de  $\mu$  y de  $p$  para cada experimento que deberán ser función del factor limitante del crecimiento, es decir, de la intensidad de iluminación.

Una dificultad evidente en este tipo de tratamiento de los datos experimentales, consiste en decidir los datos a utilizar en cada uno de los dos ajustes anteriores, ya que el paso de la zona exponencial a la lineal se produce como es lógico de una forma suave.

Esta dificultad podía obviarse en parte por un método iterativo en el que se hacía una distribución inicial de los puntos experimentales por observación de las figuras anteriores, determinando por regresión lineal los valores de los parámetros  $\mu$  y  $b$  de la ecuación [4.14] correspondiente a la zona exponencial y los de los parámetros  $p$  y  $b'$  de la ecuación [4.15] correspondiente a la zona lineal.

Una vez realizado este cálculo previo, resolviendo el sistema formado por las dos ecuaciones citadas podía determinarse el momento  $(c_x, t_x)$  en que pasa de una zona a otra, si bien este método implica un cambio más brusco del observado experimentalmente.

La solución simultánea de las ecuaciones [4.14] y [4.15] conduce a la expresión

$$\ln c_x - \frac{\mu}{p} c_x + \frac{\mu b'}{p} - b = 0 \quad [4.16]$$

que en los resultados de la mayor parte de los experimentos no tenía solución porque las dos líneas representadas por las ecuaciones [4.14] y [4.15] no se cortaban - siendo la expresión anterior siempre negativa, figura 4.14.

No obstante el punto en que ambas líneas se encuentran más próximas vendrá dado por el máximo de la ecuación [4.16] que conduce a

$$c_x = \frac{p}{\mu} \quad [4.17]$$

El resultado de este cálculo coincidía prácticamente, en la mayor parte de los casos, con el límite de separación escogido a priori por observación visual de las figuras 4.12 y 4.13.

Es evidente, sin embargo que el tratamiento anterior adolece del defecto de que al considerar separadamente ambas zonas los valores obtenidos a concentraciones de biomasa apreciables no influyen para nada en el cálculo de  $\mu$  y análogamente los valores iniciales no influyen en el cálculo de  $p$ . Por otra parte, es también

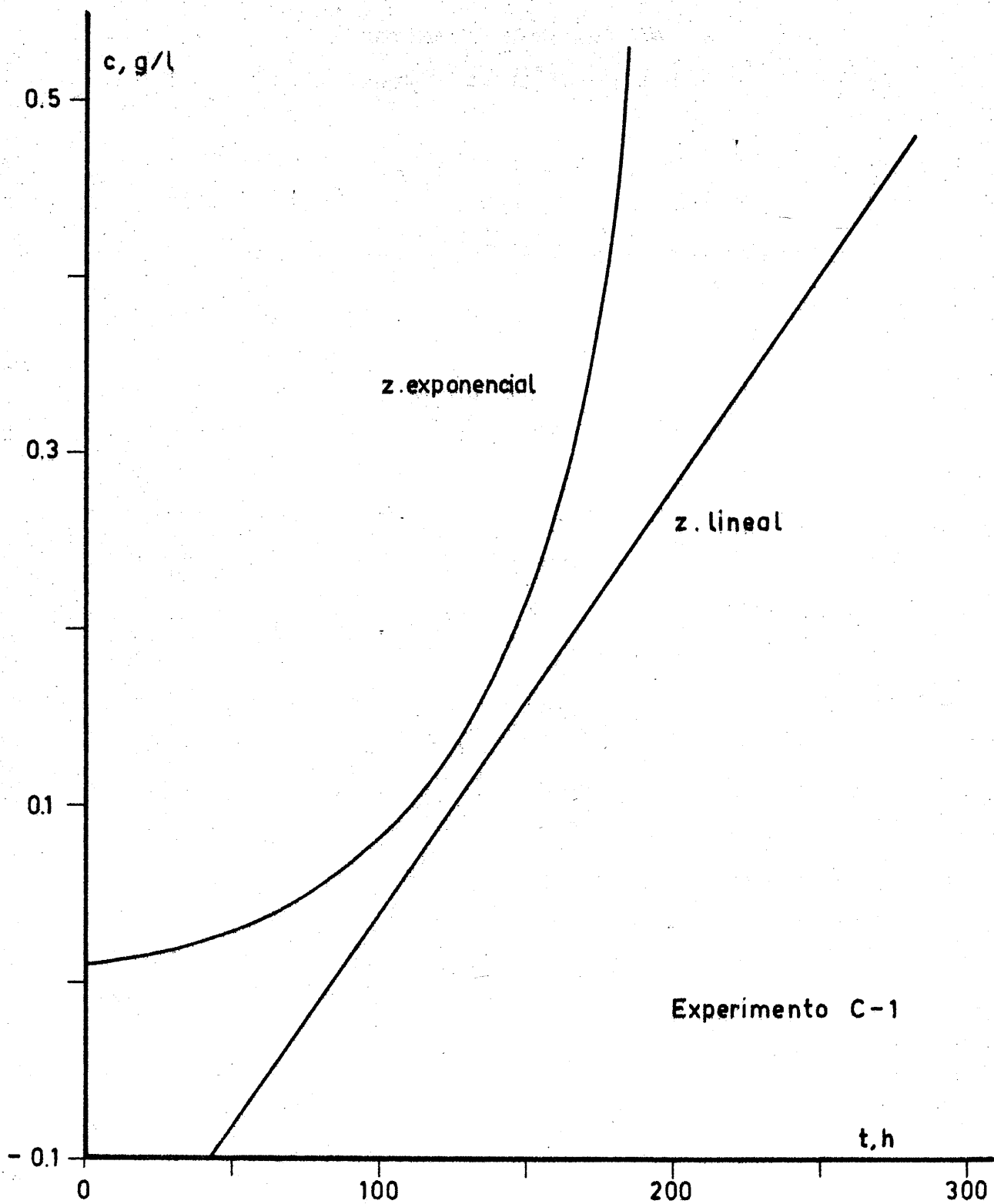


FIG 4.14

evidente que la transición de una zona a otra se produce suavemente de una forma continua y no bruscamente al valor  $c_x$  de la concentración de biomasa.

Por estas razones se trató de ajustar conjuntamente todos los puntos experimentales de cada experimento a una función del tipo

$$c = f(t) \quad [4.18]$$

que cumpliera la condición de reducirse a una exponencial a bajos valores de  $c$ , ecuación [4.14], y a una lineal a  $c$  altas, ecuación [4.15].

Teniendo en cuenta estas consideraciones y las expresiones más usuales de la cinética bioquímica, la función más idónea podría ser

$$\frac{dc}{dt} = \frac{p - \mu c}{p + \mu c} \quad [4.19]$$

que cumple los dos límites anteriormente indicados.

Separando variables en la ecuación [4.19] e integrando se obtiene

$$\frac{1}{\mu} \ln c + \frac{1}{p} c + b'' = t \quad [4.20]$$

Esta última ecuación se ha utilizado

para ajustar todos los puntos de cada experimento por regresión no lineal, Wentworth (1965).

Los resultados obtenidos en el tratamiento independiente, de las zonas exponencial y lineal, se indican en la tabla 4.32, y los correspondientes al -- tratamiento conjunto de ambas zonas en la 4.33.

La comparación de estas dos tablas pone de manifiesto que si bién los valores de p son del -- mismo orden, aunque ligeramente mayores los correspondientes al tratamiento conjunto, la diferencia entre los valores obtenidos para la velocidad específica de crecimiento en la zona exponencial es muy apreciable.

Teniendo en cuenta los buenos coeficientes de correlación, obtenidos en el tratamiento independiente, para el ajuste de los primeros puntos experimentales a la ecuación [4.14] y el hecho de que el criterio utilizado en la regresión no lineal del tratamiento conjunto, fué hacer mínima la desviación standard, entre -- los valores de c calculados y los experimentales, lo que disminuye de una forma muy apreciable la influencia de -- los puntos correspondientes a la zona exponencial, se deidió utilizar los datos del tratamiento independiente -- ya que a pesar de las limitaciones anteriormente indicadas, implican un menor grado de manipulación matemática -- de los mismos y por tanto representan más fielmente los

TABLA 4.32

| <u>Exp.</u> | <u>I<sub>0</sub></u><br><u>lux</u> | <u>μ</u><br><u>h<sup>-1</sup></u> | <u>r<sup>2</sup></u> | <u>P</u><br><u>g/l h</u> | <u>r<sup>2</sup></u> | <u>C<sub>x</sub></u><br><u>g/l</u> |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------------|
| C - 1       | 252                                | 0,0205                            | 0,995                | 0,00241                  | 0,995                | 0,1170                             |
| C - 2       | 494                                | 0,0427                            | 0,995                | 0,00348                  | 0,995                | 0,0815                             |
| C - 3       | 740                                | 0,0478                            | 0,999                | 0,00577                  | 0,998                | 0,1207                             |
| C - 4       | 1128                               | 0,0727                            | 0,985                | 0,0101                   | 0,997                | 0,1389                             |
| C - 5       | 1194                               | 0,0777                            | 0,996                | 0,0118                   | 0,999                | 0,1519                             |
| C - 6       | 1688                               | 0,0837                            | 0,990                | 0,0139                   | 0,999                | 0,1661                             |
| C - 7       | 2410                               | 0,0891                            | 0,990                | 0,0184                   | 0,999                | 0,2065                             |

TABLA 4.33

| <u>Exp.</u> | <u>I<sub>o</sub></u><br><u>lux</u> | <u>μ</u><br><u>h<sup>-1</sup></u> | <u>P</u><br><u>g/l.h</u> |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| C - 1       | 252                                | 0,0267                            | 0,0037                   |
| C - 2       | 494                                | 0,0728                            | 0,0044                   |
| C - 3       | 740                                | 0,0858                            | 0,0070                   |
| C - 4       | 1128                               | 0,1634                            | 0,0121                   |
| C - 5       | 1194                               | 0,1605                            | 0,0136                   |
| C - 6       | 1688                               | 0,1898                            | 0,0160                   |
| C - 7       | 2410                               | 0,2174                            | 0,0206                   |

datos experimentales.

#### 4.3.1 Zona exponencial de crecimiento

Los valores de la velocidad específica de crecimiento correspondientes a la zona exponencial, indicados en la tabla 4.32, se han representado en la figura 4.15 frente a la intensidad de iluminación inicial. Se observa en esta figura, que  $\mu$  parece variar linealmente con  $I_0$  hasta aproximadamente unos 1000 lux, para a continuación observarse un efecto de saturación.

Las ecuaciones propuestas en la bibliografía para relacionar  $\mu$  con  $I_0$  varían desde el modelo hiperbólico propuesto por Tamiya y col. (1953b)

$$\mu = \frac{\alpha \mu_m I_0}{\mu_m + \alpha I_0} \quad [4.21]$$

hasta el modelo discontinuo dado por

$$\mu = \alpha I_0 \quad I_0 \leq I_s \quad [4.22]$$

$$\mu = \mu_m \quad I_0 \geq I_s \quad [4.23]$$

Oorschot (1955) compara sus resultados experimentales con los dos modelos anteriores y uno intermedio de tipo exponencial



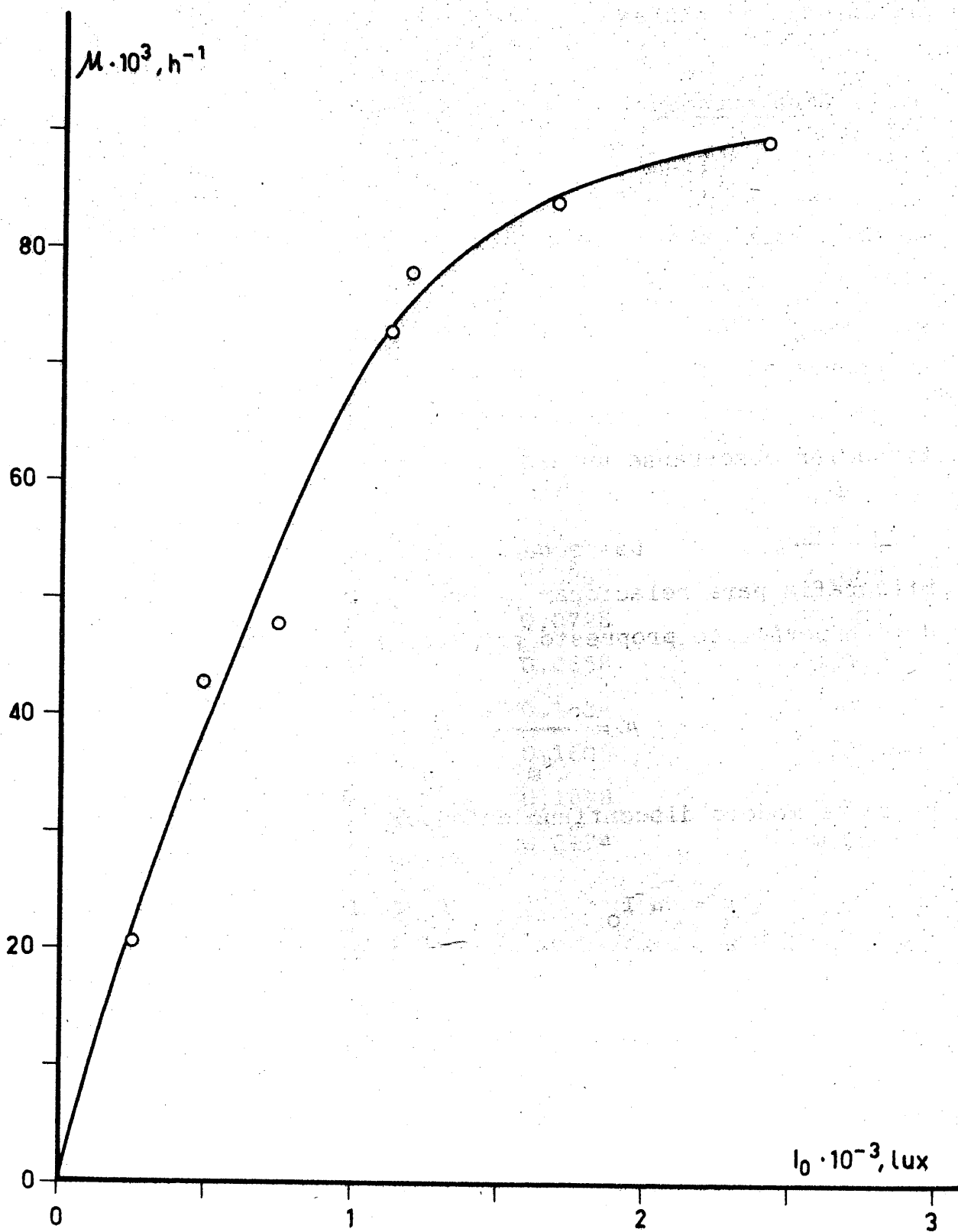


FIG 4.15

$$\mu = \mu_m \left( 1 - e^{-\frac{I}{I_s}} \right) \quad [4.24]$$

encontrando, que se ajustan más a la ecuación [4.24] que a las otras, aunque quedan comprendidos entre el modelo discontinuo y el exponencial.

Con objeto de comparar los tres modelos indicados se representan en la figura 4.16 para un valor de  $\mu_m$  de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  y de  $I_s$  de  $1000 \text{ lux}$  [ $\alpha = 10^{-4} (\text{lux h})^{-1}$ ], en la que se observa que el modelo exponencial cambia mucho más bruscamente de la parte lineal a la saturación que el propuesto por Tamiya.

Como se ha visto en la Introducción de esta memoria algunos investigadores encuentran que - intensidades luminosas muy altas inhiben el crecimiento celular, sobre todo a bajas temperaturas, por ello se han propuesto también ecuaciones para relacionar  $\mu$  con  $I_0$  que tienen en cuenta este hecho, Steele (1977).

$$\mu = \mu_m \frac{I}{I_m} e^{\left( 1 - \frac{I}{I_m} \right)} \quad [4.25]$$

que se ha representado también en la figura 4.16. Los resultados experimentales obtenidos en esta investigación se han ajustado por regresión lineal a las ecuaciones [4.21] y [4.25] y por regresión no lineal a la [4.24] obte-

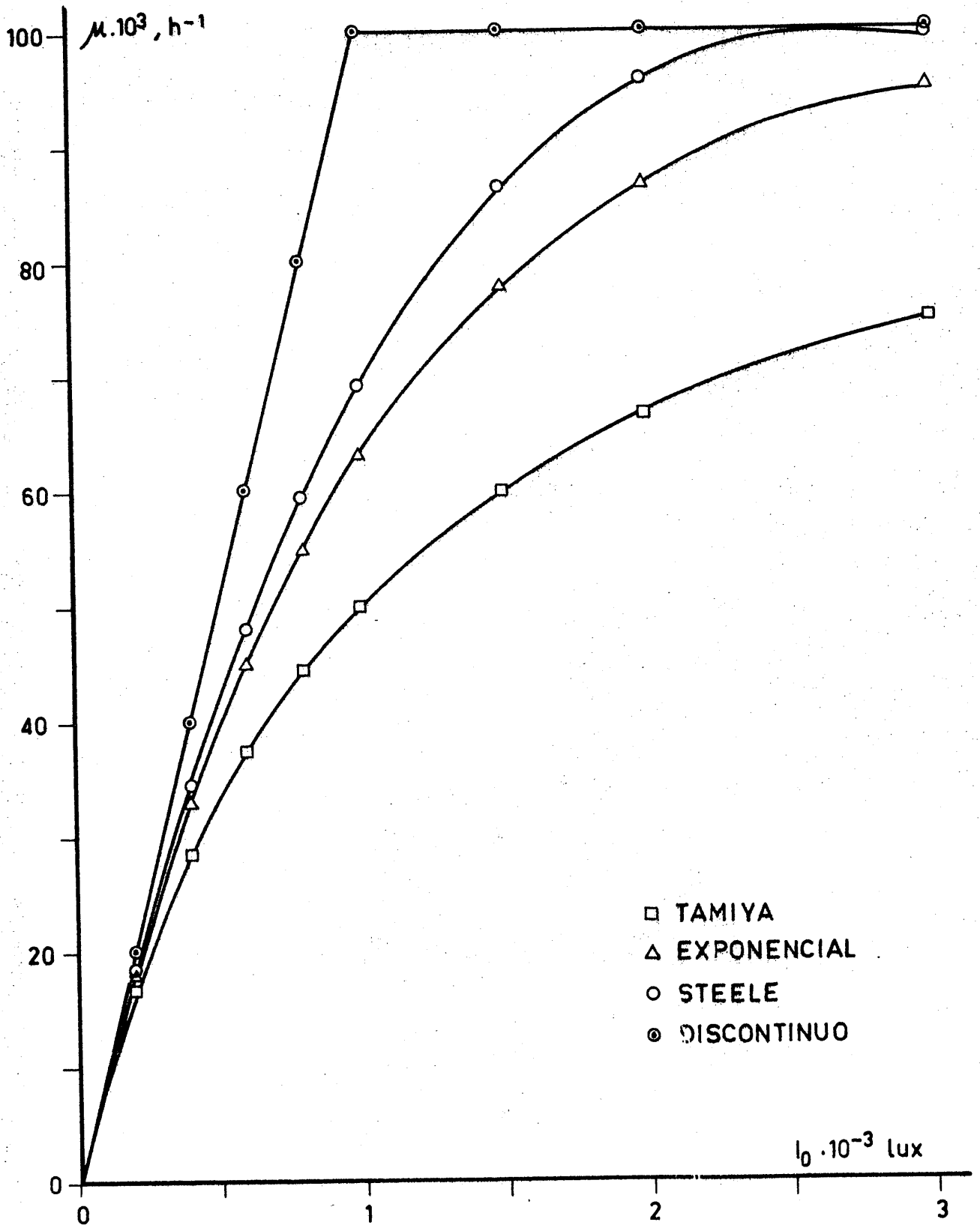


FIG 4.16

niéndose los valores de los parámetros que se indican a continuación

#### Modelo de Tamiya

$$\mu_m = 0,200 \text{ h}^{-1} \quad \alpha = 9,35 \cdot 10^{-5} (\text{lux} \cdot \text{h})^{-1} \quad r^2 = 0,982$$

#### Modelo exponencial

$$\mu_m = 0,099 \text{ h}^{-1} \quad I_s = 926 \text{ lux}$$

#### Modelo de Steele

$$\mu_m = 0,092 \text{ h}^{-1} \quad I_m = 2627 \text{ lux} \quad r^2 = 0,938$$

Estos tres modelos se comparan con los resultados experimentales utilizando los parámetros indicados, en la figura 4.17.

También se han comparado los tres modelos indicados con los resultados obtenidos por Myers (1946) en un aparato de cultivo continuo de volumen variable y dilución controlada para mantener constante la concentración de biomasa, figura 4.18, y con los resultados experimentales de Phillips y Myers (1954b) obtenidos en un aparato de cultivo continuo de volumen constante y dilución controlada también, figura 4.19. No ha sido posible realizar este tratamiento con los resultados obtenidos

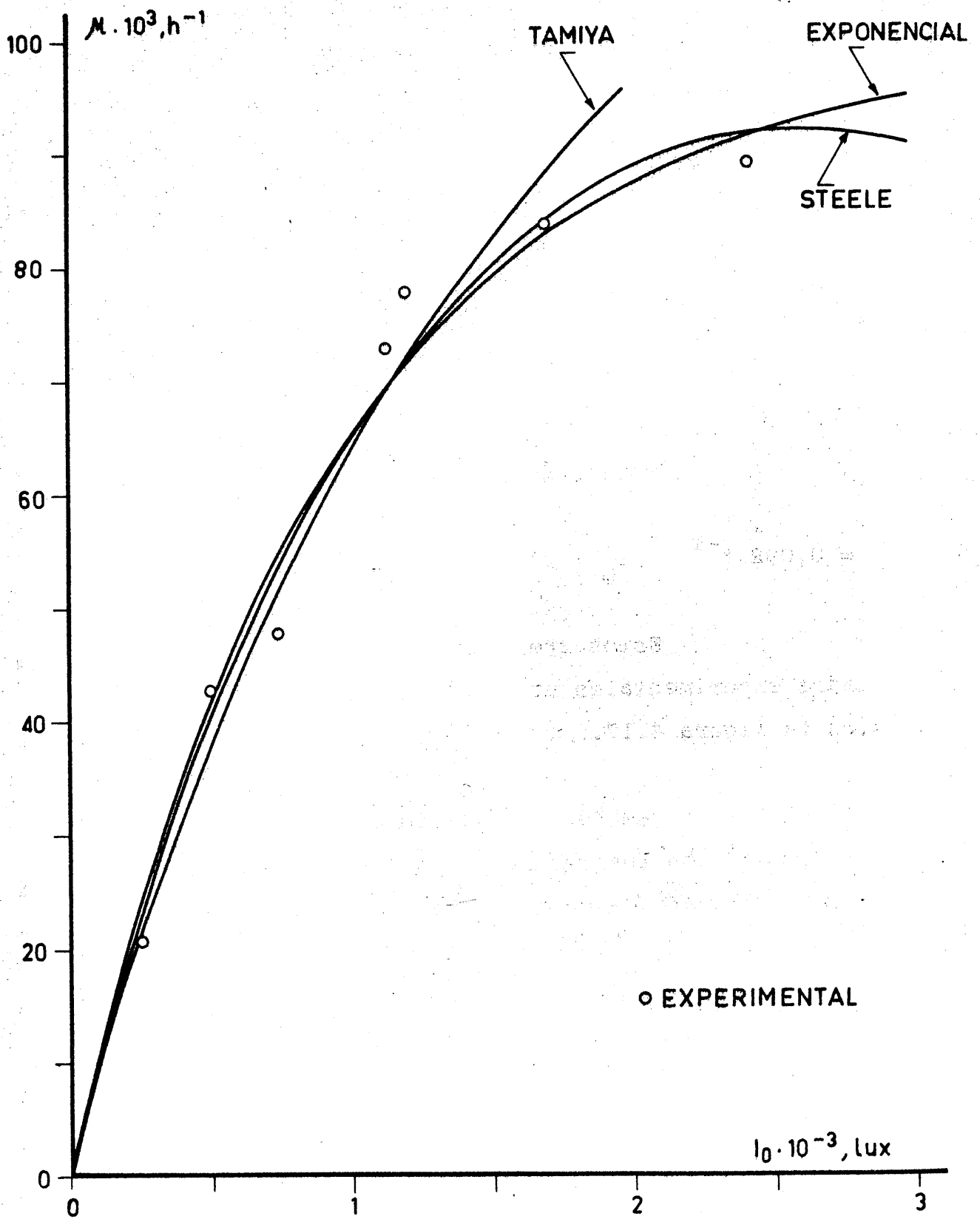


FIG 4.17

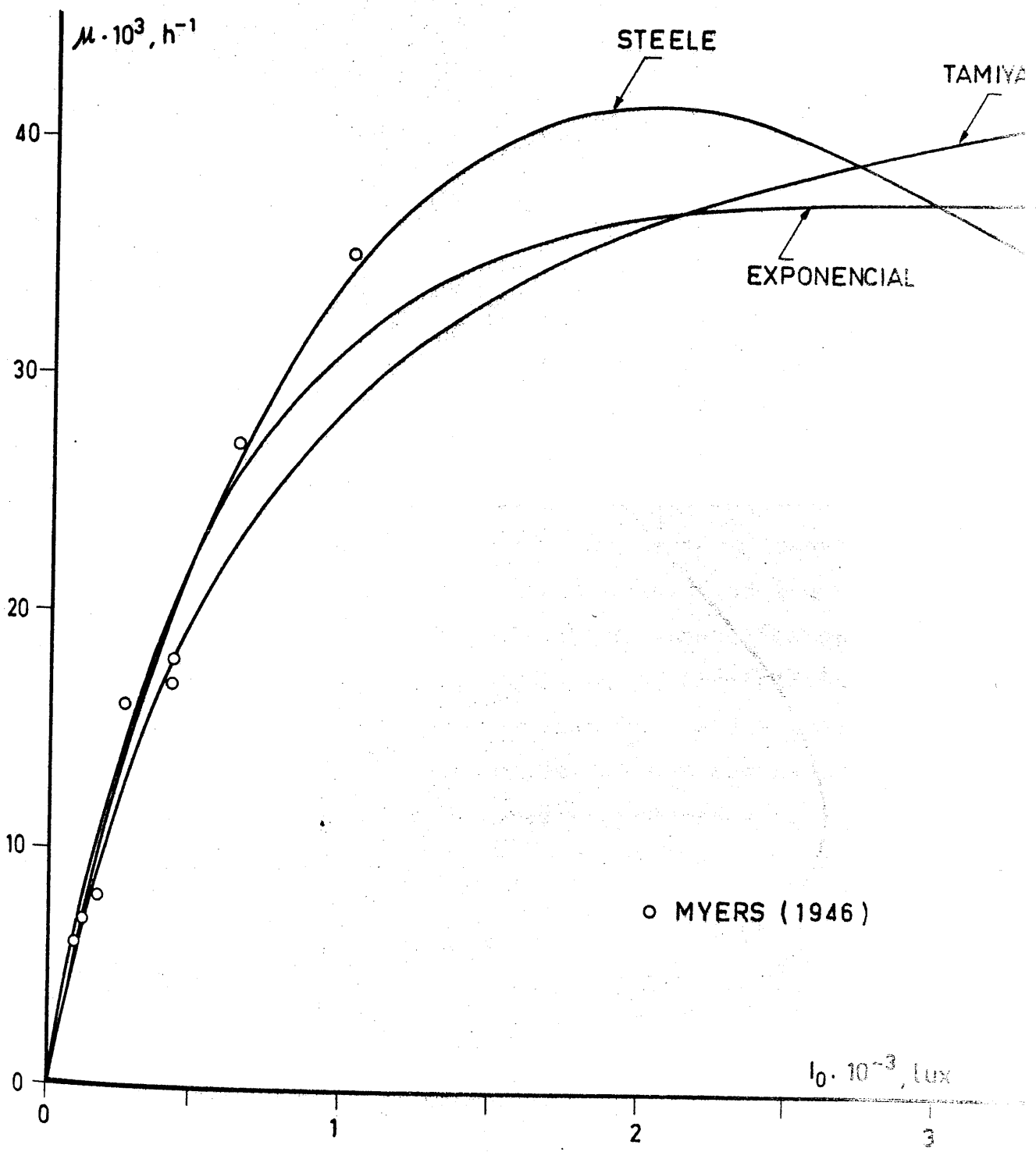


FIG 4.18

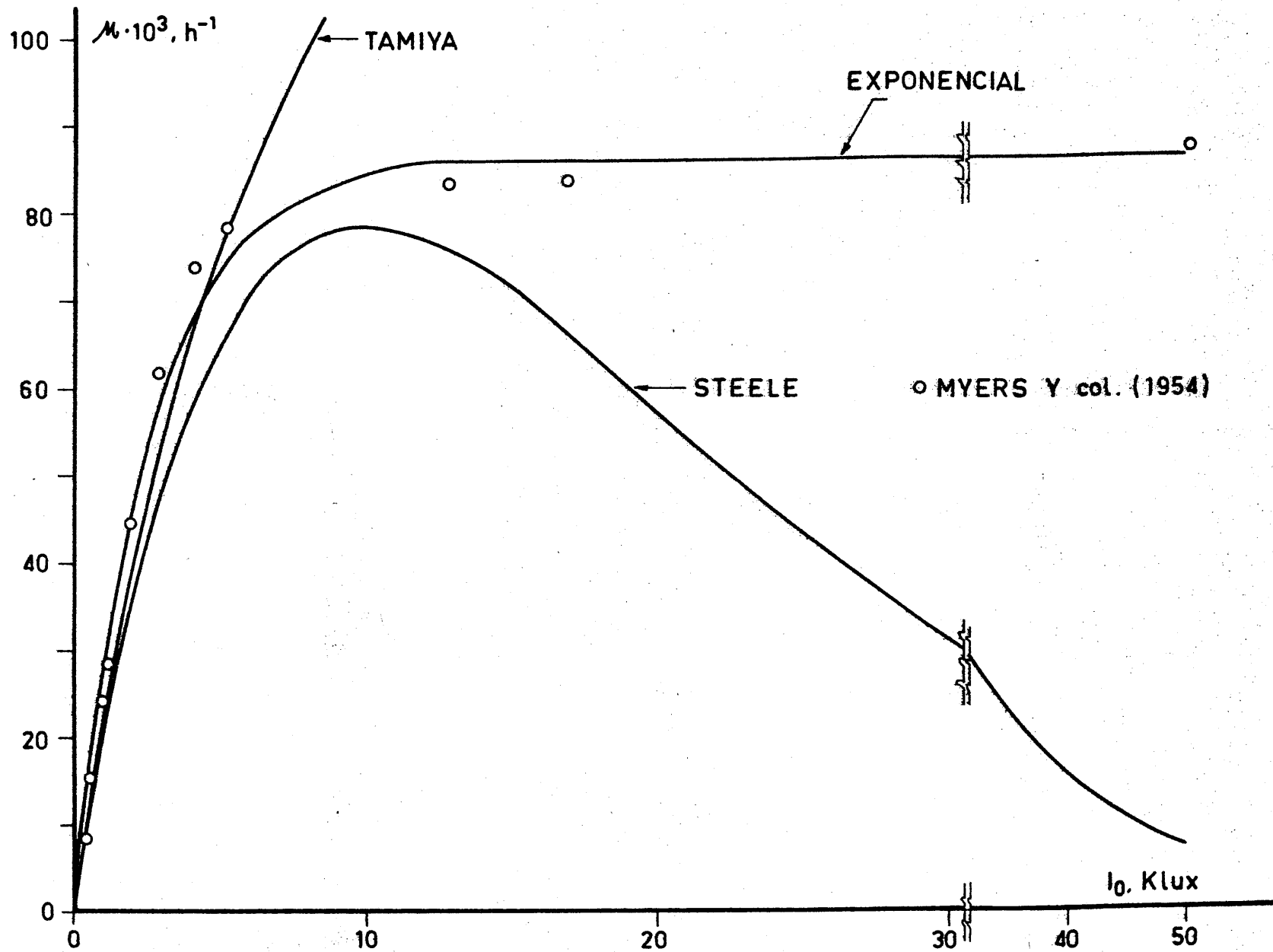


FIG 4.19

ya y col.(1953b) dado que estos autores no dan valores nu  
méricos de las velocidades específicas de crecimiento en  
su trabajo y solo indican gráficas semi-cuantitativas.

La observación de las tres últimas fi  
guras, pone claramente de manifiesto que los modelos expo  
nencial y de Steele reproducen mejor los resultados expe  
rimentales obtenidos en esta investigación y los de Myers  
, que el modelo de Tamiya.

Sin embargo, la figura 4.19 pone de ma  
nifiesto que el modelo de Steele se aparta apreciablemen  
te de los resultados de Myers a altas intensidades de i  
luminación. Este resultado era de preveer ya que el mode  
lo de Steele no conduce a un valor de  $\mu$  constante a in  
tensidades de iluminación elevadas si no a un máximo re  
lativamente plano para disminuir apreciablemente al con  
tinuar aumentando la intensidad de iluminación. Si bién -  
esta circunstancia es precisamente lo que se observa a -  
temperaturas bajas, no ocurre así por encima de los 20°C,  
ya que a estas temperaturas es preciso utilizar intensi  
dades de iluminación extremadamente altas para que se ob  
serve un efecto negativo de la misma sobre la velocidad  
de crecimiento.

Por otra parte, es evidente que los re  
sultados de Myers al ser obtenidos en una cámara de cul  
tivo continua en la que se mantiene constante la concen



tración de biomasa son todos ellos comparables entre sí y corresponderán a intensidades de iluminación proporcionales a las indicadas por Myers si es que no son coincidentes. Sin embargo, en esta investigación se ha utilizado un vaso de cultivo discontinuo y el valor de  $\mu$  indicado en la tabla 4.32 corresponde a la zona exponencial de crecimiento observada en cada uno de los experimentos realizados, por lo que la intensidad de iluminación ha ido variando desde  $I_0$  (o mejor dicho desde el valor de  $I_m$  correspondiente a la concentración del inóculo) hasta el valor de  $I_m$  correspondiente a  $c_x$ . En la tabla 4.34 se indican los intervalos de intensidad de iluminación a los que corresponden cada uno de los valores de  $\mu$  medidos en esta investigación.

La misma dificultad antes mencionada se presenta en los resultados obtenidos por Tamiya y col (1953b), ya que aunque utiliza una cámara de cultivo discontinuo muy estrecha (2,8 cm) a los valores de la concentración de biomasa indicados por estos autores que acaba la fase exponencial de crecimiento, la intensidad de iluminación debe diferir sensiblemente de la inicial.

#### 4.3.2 Zona lineal de crecimiento

Es evidente que el hecho de que la velocidad de crecimiento en los vasos se haga lineal, es decir, independiente de la concentración de biomasa en la -

TABLA 4.34

| <u>Exp.</u> | <u><math>\mu</math><br/><math>h^{-1}</math></u> | <u><math>(I_m)_{c_o}</math><br/>lux</u> | <u><math>(I_m)_{c_x}</math><br/>lux</u> |
|-------------|---|---|---|
| C - 1       | 0,0205  | 236                                     | 120                                     |
| C - 2       | 0,0427  | 463                                     | 288                                     |
| C - 3       | 0,0478  | 699                                     | 346                                     |
| C - 4       | 0,0727  | 1049                                    | 481                                     |
| C - 5       | 0,0777  | 1122                                    | 477                                     |
| C - 6       | 0,0837  | 1589                                    | 631                                     |
| C - 7       | 0,0891  | 2224                                    | 756                                     |

última parte de los experimentos debe indicar que esta - velocidad de crecimiento viene determinada por algún nutriente que se aporta al medio de cultivo a velocidad - constante.

En principio, cabría pensar que el  $\text{CO}_2$  y la energía luminosa podrían ser el nutriente indicado, ya que ambos cumplen la condición de suministrarse de una forma continua y constante al medio de cultivo.

Sin embargo, teniendo en cuenta el caudal de fase gaseosa que se burbujea a través del medio de cultivo, ya indicado en la Técnica Experimental, y que ésta es aire con un 5% en volumen de  $\text{CO}_2$ , la velocidad de suministro de  $\text{CO}_2$  por vaso de cultivo es:

$$12,5 \text{ cc/min} \therefore 0,75 \text{ l/h} \therefore 0,033 \text{ mol-g/h}$$

suponiendo que todo este  $\text{CO}_2$  se fijara en las células al estado de oxidación de carbohidrato ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), Beale y Appleman (1971), determinaría un incremento en masa del orden de 1 gramo por hora.

Considerando el valor máximo de la velocidad de crecimiento en la zona lineal observado en -- los experimentos comentados, tabla 4.32, se observa una velocidad de incremento de masa del orden de 0,01 g/h, es decir, 100 veces más pequeña que la calculada anteriormenu

te.

Es evidente que este cálculo aproximado, pero conservativo ya que el crecimiento de biomasa no es debido solo a la biosíntesis de carbohidrato, pone de manifiesto que el  $\text{CO}_2$  no puede ser el nutriente limitante del crecimiento y por consiguiente el que determine la aparición de la zona lineal.

Sin embargo, es posible que el aporte de  $\text{CO}_2$  al vaso de cultivo sea muy superior a su consumo pero que la transferencia de  $\text{CO}_2$  a través de la fase líquida controle la velocidad del proceso, con lo que sería el  $\text{CO}_2$  el responsable de la zona lineal de crecimiento. La máxima velocidad de transferencia del  $\text{CO}_2$  a través de la fase líquida vendrá dada por

$$N_{\text{CO}_2} = k_1 A c^* \quad \text{mol-g/h} \quad [4.26]$$

siendo  $c^*$  la solubilidad del  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo, ya que para un gas tan poco soluble como el  $\text{CO}_2$  es la velocidad de transferencia a través de la fase líquida la que controla la velocidad global de absorción. Considerando el medio de cultivo como agua a  $30^\circ\text{C}$ , hipótesis aceptable ya que la concentración de nutrientes es pequeña, el valor de  $c^*$  será

$$c^* = 1,41 \cdot 10^{-3} \quad \text{mol-g/l}$$

El coeficiente de transferencia de materia  $k_1$  puede estimarse mediante la correlación propuesta por Calderbank y Moo-Young (1967), para burbujas de más de 2,5 mm de diámetro, que es nuestro caso

$$k_1 = 0,42 (g \nu)^{1/3} \left( \frac{D}{\nu} \right)^{1/2} \text{ cm/s} \quad [4.27]$$

Como ya se ha visto en la parte 3 de esta memoria la viscosidad y densidad del medio de cultivo no difieren apreciablemente de la del agua, por lo que utilizando un valor de la viscosidad cinemática

$$\nu = 0,0085 \text{ cm}^2 / \text{s}$$

y de la difusividad del  $\text{CO}_2$

$$D = 2,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{s}$$

se obtiene

$$k_1 = 0,44 \text{ cm/s} \therefore 1,44 \text{ m/h}$$

No se disponen de correlaciones adecuadas para evaluar en nuestro caso el área interfacial  $A$ ; pero teniendo en cuenta la máxima velocidad de crecimiento observada y que ya se ha indicado anteriormente puede calcularse la velocidad de consumo bioquímico de  $\text{CO}_2$  que resulta ser

$$0,0003 \text{ mol-g/h} = k_1 A c^* = 2,03 A$$

de donde

$$A = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \therefore 1,5 \text{ cm}^2$$

este área interfacial determinaría que la velocidad de transferencia de  $\text{CO}_2$  a través de la fase líquida fuese igual a su velocidad de consumo por las algas; como el área interfacial real es mucho mayor (solo el área superficial, sin tener en cuenta el vórtice, es de  $44 \text{ cm}^2$ ) resulta evidente que la transferencia de  $\text{CO}_2$  a través de la fase líquida no controla la velocidad de crecimiento.

Los dos cálculos anteriores ponen de manifiesto que el consumo de  $\text{CO}_2$  en el crecimiento es muy pequeño comparado con el caudal de  $\text{CO}_2$  aportado, por lo que la composición de la fase gaseosa apenas cambia al pasar a través del medio de cultivo, y que la velocidad de transferencia de  $\text{CO}_2$  a través de la fase líquida es también muy superior a su consumo, por lo que se puede considerar que el medio de cultivo se encuentra siempre saturado de  $\text{CO}_2$  y por tanto que este nutriente no limita el crecimiento.

Por otra parte, la densidad celular del medio de cultivo en la zona lineal es tal, que prácticamente toda la luz incidente es absorbida, como puede po

nerse claramente de manifiesto mediante la expresión de de la intensidad de iluminación que sale del vaso de cultivo

$$I_f = I_o e^{-14,7 c} \quad [4.28]$$

que aplicada al momento en que se inicia la zona lineal ( $c_x$ ) indica que la energía luminosa transmitida a través del vaso de cultivo varia del 23 al 5% de la inicial en los experimentos C - 1 a C - 7. Téngase en cuenta, dada la forma exponencial de [4.28] que en cuanto  $c$  aumente al entrar claramente en la zona lineal el porcentaje anterior se va a hacer prácticamente nulo.

Por tanto, la zona lineal de crecimiento es debida a la absorción prácticamente total de la energía luminosa incidente que se suministra a una velocidad constante.

En la figura 4.20 se han representado los valores de la velocidad lineal de crecimiento,  $p$ , frente a la intensidad inicial de iluminación, en la que se observa que  $p$  varia linealmente con  $I_o$ , resultado semejante al obtenido por Tamiya y col. (1953b), de acuerdo con la ecuación

$$p = 8,45 \cdot 10^{-6} I_o \quad \text{g/l h} \quad [4.29]$$

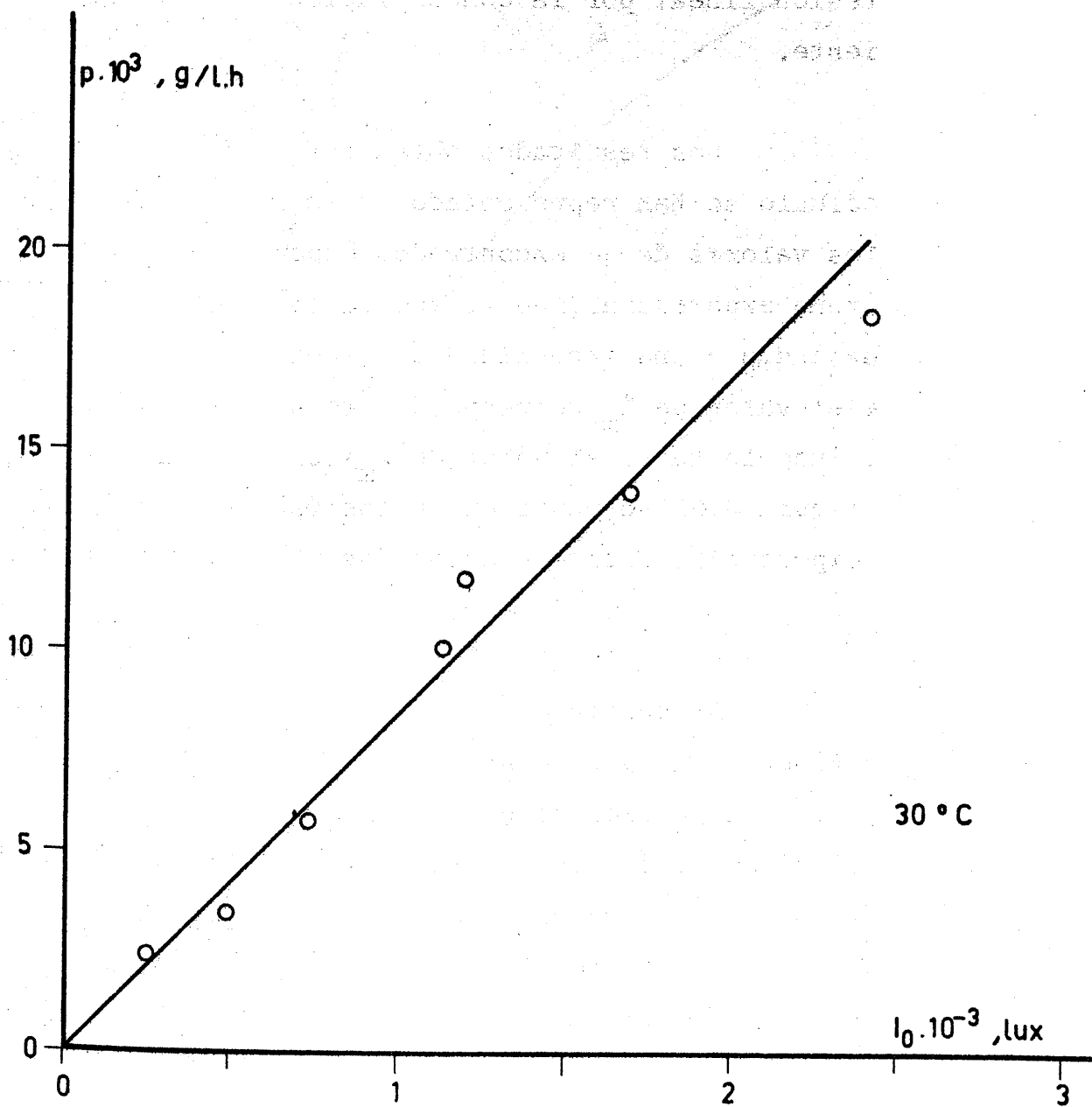


FIG 4.20



Para cada punto de la zona lineal de crecimiento es posible calcular la intensidad media de iluminación mediante la ecuación [4.9] y la velocidad específica de crecimiento dividiendo el valor de  $p$  obtenido por regresión lineal por la concentración de biomasa correspondiente.

Los resultados obtenidos mediante este último cálculo se han representado en la figura 4.21 junto con los valores de  $\mu$  encontrados experimentalmente para la zona exponencial. Puesto que estos últimos valores corresponden a una intensidad de iluminación que varía desde el valor de  $I_m$  correspondiente a la concentración del inóculo hasta el valor de  $I_m$  correspondiente a  $c_x$ , en la figura 4.21 se representan los valores de  $\mu$  de la zona exponencial frente a estos dos valores límites de  $I_m$ .

La continuidad de las dos líneas indicadas en la figura 4.21 pone claramente de manifiesto que la velocidad específica de crecimiento es una función de la intensidad media de iluminación  $I_m$  y que la distinción de los dos periodos exponencial y lineal es debida exclusivamente al consumo total de la luz en el vaso de cultivo en el segundo periodo.

No obstante, debe haber algún factor no considerado hasta el momento que determine que el valor de  $\mu$  en la zona exponencial permanezca constante a

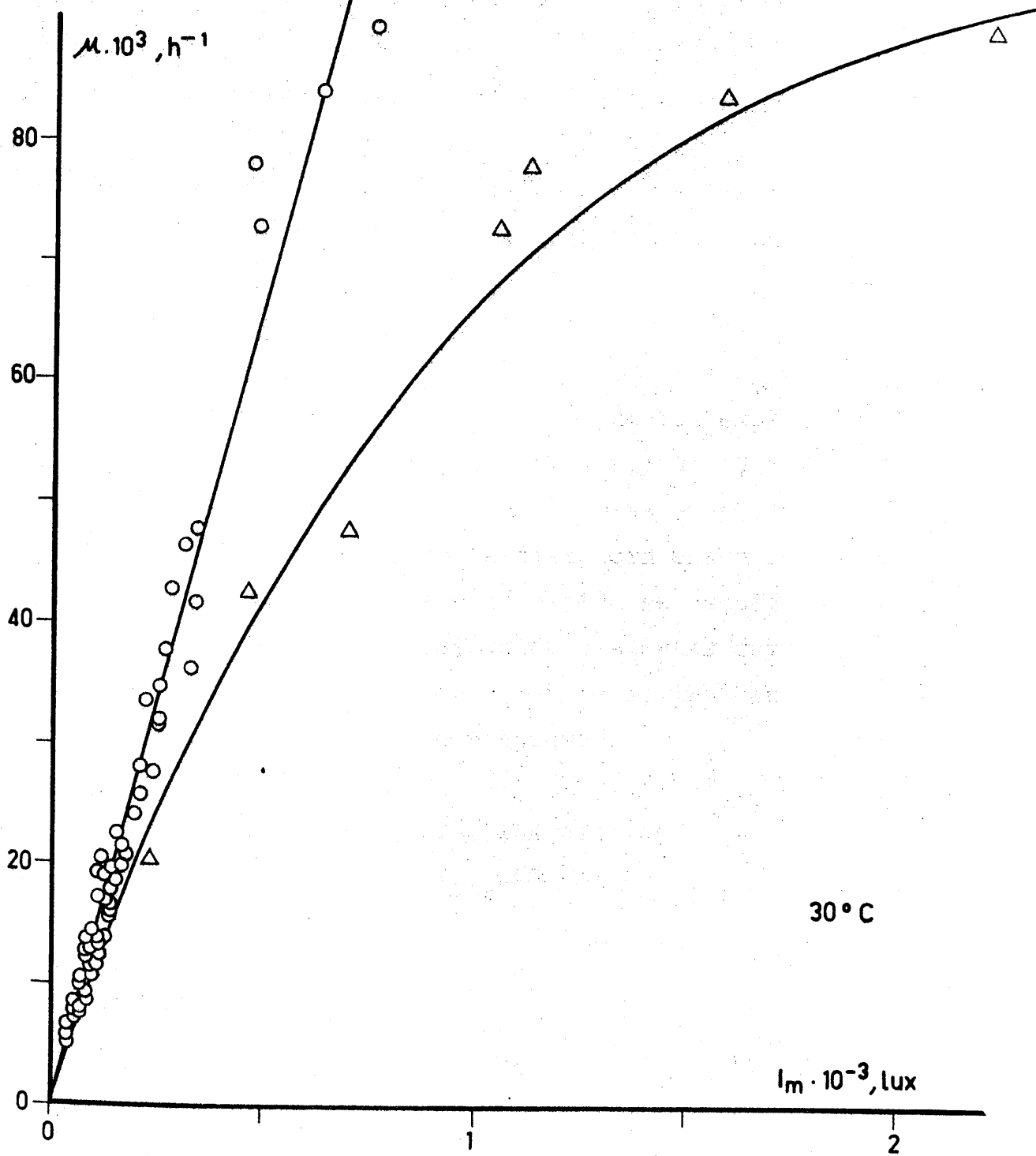
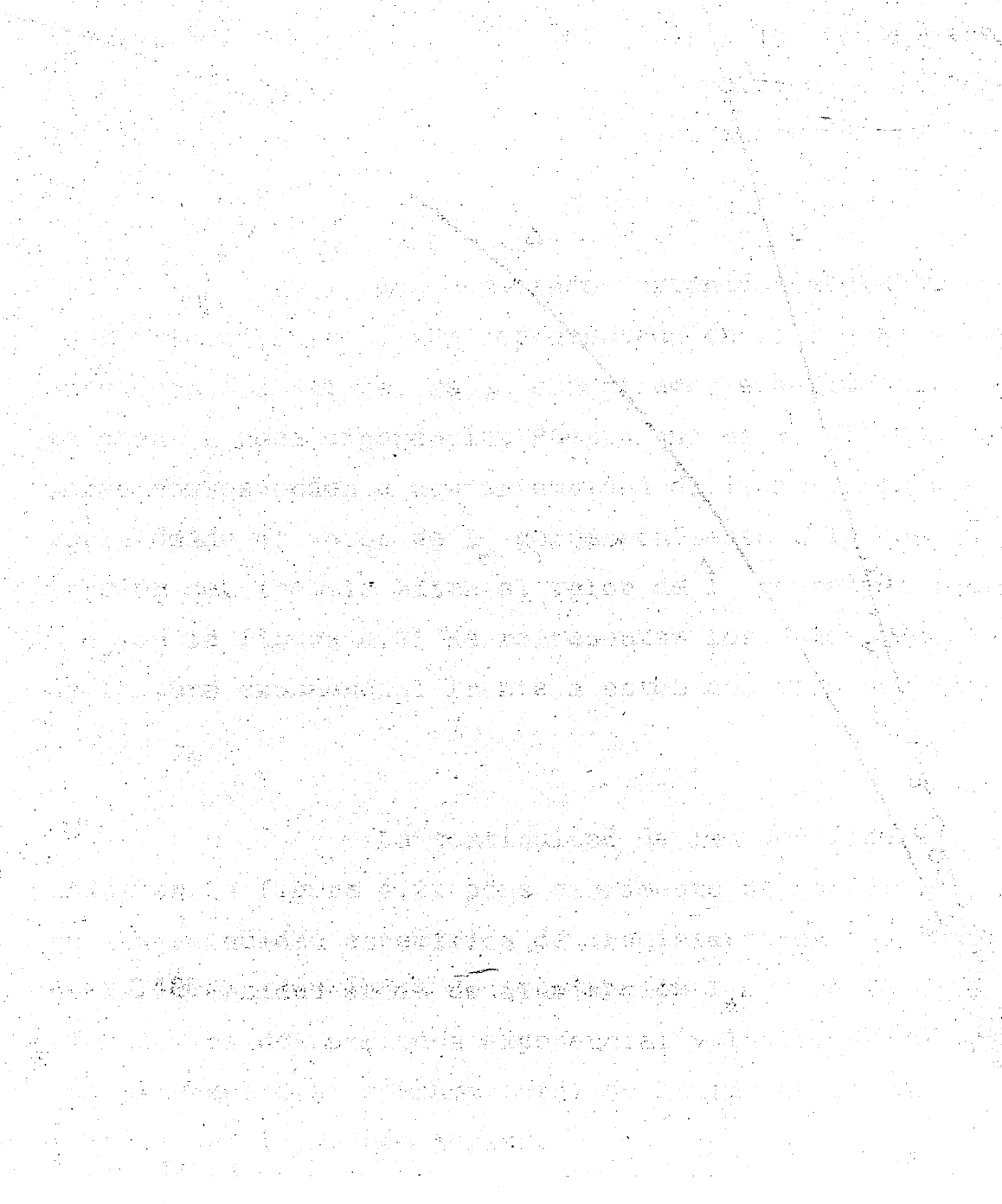


FIG 4.21

pesar de la considerable variación de  $I_m$ .



#### 4.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la cinética del crecimiento de *Chlorella-Pyrenoidosa* se realizaron tres series de experimentos -- más a 18,25 y 35°C, series A, B y D respectivamente. Salvo la intensidad de iluminación, de la que se hablará a continuación, las restantes condiciones experimentales han sido indicadas ya en la parte 3 de esta memoria.

La mayor parte de los experimentos de estas tres series, se realizaron variando la intensidad de iluminación por cambio en el voltaje aplicado a los tubos fluorescentes o de la distancia entre los tubos y los vasos de cultivo. De esta manera se consiguieron cuatro intensidades de iluminación distintas cuyas distribuciones espaciales y valores medios se indican en las tablas 4.35 a 4.38, y que corresponden a

|       |       |                                 |
|-------|-------|---------------------------------|
| $I_1$ | ..... | 184 voltios                     |
| $I_2$ | ..... | 220 voltios                     |
| $I_3$ | ..... | 235 voltios                     |
| $I_4$ | ..... | 220 voltios acercando los tubos |

No obstante, con objeto de ampliar el intervalo de intensidades de iluminación explorado, en alguna de estas series de experimentos se utilizaron mallas metálicas de diferentes luces que se interponían en

TABLA 4.35Intensidad media de iluminación, lux  $I_1$ 

| Vaso  | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_0$ |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $R_A$ | 701   | 697   | 689   | 699   | 797   | 710   |
| $R_B$ | 724   | 718   | 716   | 727   | 828   | 735   |
| $R_C$ | 700   | 765   | 760   | 694   | 792   | 730   |

$$(I_0)_m = 725$$

TABLA 4.36

Intensidad media de iluminación, lux  $I_2$

| <u>Vaso</u> | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_0</math></u> |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$       | 1159                    | 1140                    | 1127                    | 1142                    | 1294                    | 1165                    |
| $R_B$       | 1183                    | 1173                    | 1173                    | 1184                    | 1341                    | 1200                    |
| $R_C$       | 1157                    | 1147                    | 1136                    | 1173                    | 1320                    | 1175                    |

$$(I_0)_m = 1180$$

TABLA 4.37Intensidad media de iluminación, lux  $I_3$ 

| <u>Vaso</u> | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_0</math></u> |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $R_A$       | 1379                    | 1379                    | 1369                    | 1381                    | 1561                    | 1401                    |
| $R_B$       | 1500                    | 1486                    | 1485                    | 1501                    | 1687                    | 1519                    |
| $R_C$       | 1413                    | 1407                    | 1395                    | 1401                    | 1592                    | 1430                    |

$$(I_0)_m = 1450$$

TABLA 4.38

Intensidad media de iluminación, lux  $I_4$

| <u>Vaso</u>    | <u><math>I_1</math></u> | <u><math>I_2</math></u> | <u><math>I_3</math></u> | <u><math>I_4</math></u> | <u><math>I_5</math></u> | <u><math>I_o</math></u> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| R <sub>A</sub> | 1888                    | 1872                    | 1837                    | 1818                    | 1953                    | 1875                    |
| R <sub>B</sub> | 1970                    | 1958                    | 1914                    | 1901                    | 2023                    | 1955                    |
| R <sub>C</sub> | 1930                    | 1913                    | 1850                    | 1820                    | 1948                    | 1900                    |

$$(I_o)_m = 1910$$



tre los tubos fluorescentes y los vasos de cultivo. En estos casos, a continuación de las tablas de cinética del crecimiento se indica la distribución espacial y valor medio de la intensidad de iluminación correspondiente al medio de cultivo fresco.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados a 18°C, serie A, se indican en las tablas 4.39 a 4.42; los correspondientes a 25°C, serie B, en las tablas 4.43 a 4.51 y finalmente los correspondientes a 35°C, serie D, en las tablas 4.52 a 4.57.

En la figura 4.22 se han representado los valores medios de la concentración de biomasa frente al tiempo en coordenadas semilogarítmicas para los experimentos de 18°C, serie A. Puede observarse que a esta temperatura no se alcanza la zona lineal de crecimiento en las 70 horas que duraron los experimentos y que la velocidad específica de crecimiento correspondiente a la zona exponencial varía relativamente poco con la intensidad de iluminación, como se indica en la tabla 4.58 en la que se encuentran los valores de  $\mu$  obtenidos por regresión lineal de los datos experimentales.

En las figuras 4.23 y 4.24 se representan los datos cinéticos de crecimiento para los experimentos de la serie B en coordenadas semilogarítmicas y lineales respectivamente. Al igual que en los experimen -

TABLA 4.39

Experimento A - 1

Cinética del crecimiento,  $I_1$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0102                    | 0,0102                    | 0,0102                    | 0,0102                    |
| 17,00       | 0,0186                    | 0,0186                    | 0,0186                    | 0,0186                    |
| 19,25       | 0,0196                    | 0,0203                    | 0,0203                    | 0,0201                    |
| 20,75       | 0,0203                    | 0,0210                    | 0,0210                    | 0,0208                    |
| 24,08       | 0,0210                    | 0,0213                    | 0,0213                    | 0,0212                    |
| 41,25       | 0,0303                    | 0,0313                    | 0,0303                    | 0,0306                    |
| 43,25       | 0,0313                    | 0,0320                    | 0,0310                    | 0,0314                    |
| 47,00       | 0,0320                    | 0,0326                    | 0,0320                    | 0,0322                    |
| 49,25       | 0,0326                    | 0,0370                    | 0,0346                    | 0,0347                    |
| 50,75       | 0,0360                    | 0,0383                    | 0,0370                    | 0,0371                    |
| 66,83       | 0,0483                    | 0,0550                    | 0,0506                    | 0,0513                    |

TABLA 4.40

Experimento A - 2

Cinética del crecimiento,  $I_2$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0101                    | 0,0101                    | 0,0101                    | 0,0101                    |
| 17,00       | 0,0280                    | 0,0280                    | 0,0280                    | 0,0280                    |
| 19,00       | 0,0280                    | 0,0280                    | 0,0280                    | 0,0280                    |
| 20,83       | 0,0286                    | 0,0300                    | 0,0293                    | 0,0293                    |
| 23,00       | 0,0293                    | 0,0300                    | 0,0303                    | 0,0299                    |
| 25,75       | 0,0313                    | 0,0336                    | 0,0326                    | 0,0325                    |
| 27,50       | 0,0326                    | 0,0360                    | 0,0350                    | 0,0345                    |
| 41,00       | 0,0470                    | 0,0506                    | 0,0486                    | 0,0487                    |
| 43,00       | 0,0483                    | 0,0526                    | 0,0516                    | 0,0508                    |
| 44,75       | 0,0493                    | 0,0533                    | 0,0526                    | 0,0517                    |
| 47,00       | 0,0500                    | 0,0533                    | 0,0550                    | 0,0528                    |
| 49,00       | 0,0523                    | 0,0583                    | 0,0570                    | 0,0559                    |
| 50,75       | 0,0550                    | 0,0593                    | 0,0583                    | 0,0575                    |
| 67,66       | 0,0806                    | 0,1120                    | 0,1052                    | 0,0993                    |

TABLA 4.41

Experimento A - 3

Cinética del crecimiento,  $I_3$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0103                    | 0,0103                    | 0,0103                    | 0,0103                    |
| 17,00       | 0,0256                    | 0,0256                    | 0,0246                    | 0,0253                    |
| 19,00       | 0,0263                    | 0,0263                    | 0,0253                    | 0,0260                    |
| 23,00       | 0,0263                    | 0,0270                    | 0,0263                    | 0,0265                    |
| 25,00       | 0,0293                    | 0,0313                    | 0,0293                    | 0,0300                    |
| 26,75       | 0,0310                    | 0,0320                    | 0,0300                    | 0,0310                    |
| 42,00       | 0,0416                    | 0,0493                    | 0,0436                    | 0,0448                    |
| 44,00       | 0,0450                    | 0,0506                    | 0,0470                    | 0,0475                    |
| 47,00       | 0,0493                    | 0,0533                    | 0,0493                    | 0,0506                    |
| 49,00       | 0,0516                    | 0,0570                    | 0,0506                    | 0,0531                    |
| 50,75       | 0,0520                    | 0,0593                    | 0,0526                    | 0,0546                    |
| 69,25       | 0,0832                    | 0,1052                    | 0,0900                    | 0,0928                    |

TABLA 4.42

| Experimento A - 4 | Cinética del crecimiento, I <sub>4</sub> |                           |                           |
|-------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| <u>t, h</u>       | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u>                | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
| 0,00              | 0,0102                                   | 0,0102                    | 0,0102                    |
| 17,66             | 0,0226                                   | 0,0226                    | 0,0226                    |
| 19,00             | 0,0246                                   | 0,0246                    | 0,0246                    |
| 20,75             | 0,0256                                   | 0,0256                    | 0,0256                    |
| 24,75             | 0,0263                                   | 0,0263                    | 0,0263                    |
| 26,75             | 0,0270                                   | 0,0270                    | 0,0270                    |
| 41,66             | 0,0346                                   | 0,0370                    | 0,0358                    |
| 43,00             | 0,0360                                   | 0,0376                    | 0,0368                    |
| 48,17             | 0,0403                                   | 0,0416                    | 0,0410                    |
| 51,00             | 0,0416                                   | 0,0426                    | 0,0421                    |
| 68,50             | 0,0570                                   | 0,0613                    | 0,0592                    |

TABLA 4.43

Experimento B - 1

Cinética del crecimiento,  $I_1$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    |
| 17,25       | 0,0180                    | 0,0213                    | 0,0193                    | 0,0195                    |
| 19,00       | 0,0213                    | 0,0246                    | 0,0226                    | 0,0228                    |
| 21,00       | 0,0233                    | 0,0280                    | 0,0266                    | 0,0260                    |
| 23,00       | 0,0266                    | 0,0290                    | 0,0290                    | 0,0282                    |

TABLA 4.44

Experimento B - 2

Cinética del crecimiento,  $I_1$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0065                    | 0,0065                    | 0,0065                    | 0,0065                    |
| 18,17       | 0,0186                    | 0,0186                    | 0,0186                    | 0,0186                    |
| 20,42       | 0,0203                    | 0,0203                    | 0,0203                    | 0,0203                    |
| 23,00       | 0,0220                    | 0,0226                    | 0,0226                    | 0,0224                    |
| 25,00       | 0,0233                    | 0,0233                    | 0,0233                    | 0,0233                    |
| 27,00       | 0,0233                    | 0,0256                    | 0,0256                    | 0,0248                    |
| 47,50       | 0,0772                    | 0,0800                    | 0,0786                    | 0,0786                    |
| 49,00       | 0,0740                    | 0,0852                    | 0,0800                    | 0,0797                    |
| 51,00       | 0,0872                    | 0,1032                    | 0,0986                    | 0,0963                    |
| 65,00       | 0,1892                    | 0,2104                    | 0,1972                    | 0,1989                    |

TABLA 4.45

Experimento B - 3

Cinética del crecimiento,  $I_2$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0083                    | 0,0083                    | 0,0083                    | 0,0083                    |
| 17,00       | 0,0206                    | 0,0206                    | 0,0213                    | 0,0208                    |
| 19,00       | 0,0246                    | 0,0266                    | 0,0266                    | 0,0259                    |
| 21,00       | 0,0266                    | 0,0296                    | 0,0293                    | 0,0285                    |
| 23,00       | 0,0293                    | 0,0333                    | 0,0333                    | 0,0320                    |
| 25,00       | 0,0346                    | 0,0380                    | 0,0380                    | 0,0369                    |
| 27,00       | 0,0370                    | 0,0393                    | 0,0393                    | 0,0385                    |
| 41,00       | 0,1006                    | 0,1006                    | 0,0932                    | 0,0981                    |
| 43,00       | 0,1066                    | 0,1212                    | 0,1140                    | 0,1139                    |
| 45,00       | 0,1292                    | 0,1372                    | 0,1372                    | 0,1345                    |
| 47,00       | 0,1600                    | 0,1600                    | 0,1600                    | 0,1600                    |
| 49,00       | 0,1600                    | 0,1800                    | 0,1800                    | 0,1733                    |
| 51,00       | 0,1760                    | 0,1972                    | 0,1972                    | 0,1901                    |
| 65,25       | 0,2768                    | 0,3600                    | 0,3040                    | 0,3136                    |
| 72,00       | 0,3040                    | 0,3600                    | 0,3464                    | 0,3368                    |
| 73,50       | 0,3040                    | 0,3760                    | 0,3464                    | 0,3421                    |
| 75,00       | 0,3040                    | 0,3760                    | 0,3760                    | 0,3520                    |
| 89,00       | 0,4208                    | 0,5200                    | 0,4664                    | 0,4691                    |
| 91,00       | 0,4264                    | 0,5248                    | 0,4744                    | 0,4752                    |
| 98,75       | 0,4904                    | 0,5648                    | 0,5384                    | 0,5312                    |



TABLA 4.46

Experimento B - 4

Cinética del crecimiento, I<sub>3</sub>

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0078                    | 0,0078                    | 0,0078                    |
| 23,42       | 0,0280                    | 0,0370                    | 0,0325                    |
| 25,00       | 0,0336                    | 0,0436                    | 0,0386                    |
| 26,50       | 0,0360                    | 0,0446                    | 0,0403                    |
| 29,00       | 0,0403                    | 0,0480                    | 0,0442                    |
| 30,50       | 0,0480                    | 0,0560                    | 0,0520                    |
| 32,00       | 0,0560                    | 0,0560                    | 0,0605                    |
| 46,16       | 0,1392                    | 0,1840                    | 0,1616                    |
| 47,75       | 0,1664                    | 0,2012                    | 0,1838                    |
| 49,50       | 0,1760                    | 0,2372                    | 0,2066                    |
| 52,83       | 0,2332                    | 0,2520                    | 0,2426                    |
| 55,00       | 0,2424                    | 0,2692                    | 0,2558                    |
| 56,50       | 0,2464                    | 0,2984                    | 0,2724                    |
| 70,25       | 0,4320                    | 0,4264                    | 0,4292                    |
| 72,00       | 0,5040                    | 0,5040                    | 0,5040                    |
| 77,08       | 0,5200                    | 0,5200                    | 0,5200                    |
| 78,83       | 0,5304                    | 0,5280                    | 0,5292                    |
| 97,41       | 0,6288                    | 0,6816                    | 0,6552                    |
| 101,17      | 0,6448                    | 0,7200                    | 0,6824                    |
| 104,42      | 0,6128                    | 0,7408                    | 0,6768                    |
| 119,00      | 0,7200                    | 0,9328                    | 0,8264                    |

TABLA 4.47

| Experimento B - 5 |                           | Cinética del crecimiento  |                           |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <u>t, h</u>       | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
| 0,00              | 0,0086                    | 0,0086                    | 0,0086                    |
| 9,00              | 0,0141                    | 0,0136                    | 0,0139                    |
| 24,00             | 0,0283                    | 0,0283                    | 0,0283                    |
| 33,00             | 0,0478                    | 0,0498                    | 0,0488                    |
| 48,00             | 0,1344                    | 0,1412                    | 0,1378                    |
| 57,00             | 0,2464                    | 0,2624                    | 0,2544                    |
| 72,00             | 0,3936                    | 0,4720                    | 0,4328                    |
| 81,00             | 0,4672                    | 0,6080                    | 0,5376                    |
| 88,33             | 0,5584                    | 0,6176                    | 0,5580                    |
| 95,00             | 0,5952                    | 0,7040                    | 0,6496                    |
| 96,00             | 0,6080                    | 0,6816                    | 0,6448                    |
| 110,00            | 0,7200                    | 0,8352                    | 0,7776                    |
| 119,00            | 0,7552                    | 0,9152                    | 0,8352                    |
| 134,00            | 0,9152                    | 1,1392                    | 1,0272                    |
| 143,00            | 0,9840                    | 1,1840                    | 1,0840                    |
| 158,00            | 1,1840                    | 1,3952                    | 1,2896                    |
| 167,00            | 1,1968                    | 1,4240                    | 1,3104                    |
| 182,00            | 1,3600                    | 1,5680                    | 1,4640                    |

TABLA 4.48

## Experimento B - 5

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1422                 | 1402                 | 1388                 | 1404                 | 1586                 | 1431                 |
| R <sub>B</sub> | 1532                 | 1519                 | 1508                 | 1528                 | 1682                 | 1544                 |
| R <sub>C</sub> | 1466                 | 1447                 | 1428                 | 1449                 | 1614                 | 1473                 |

$$(I_o)_m = 1483$$

TABLA 4.49

Experimento B - 6

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    | 0,0085                    |
| 15,00       | 0,0160                    | 0,0160                    | 0,0160                    | 0,0160                    |
| 24,00       | 0,0293                    | 0,0276                    | 0,0276                    | 0,0282                    |
| 39,00       | 0,0556                    | 0,0574                    | 0,0466                    | 0,0532                    |
| 48,00       | 0,1286                    | 0,1280                    | 0,1140                    | 0,1235                    |
| 49,75       | 0,1146                    | 0,1080                    | 0,1115                    | 0,1114                    |
| 63,00       | 0,3008                    | 0,3680                    | 0,3464                    | 0,3384                    |
| 72,00       | 0,3888                    | 0,4352                    | 0,4096                    | 0,4112                    |
| 87,00       | 0,4960                    | 0,5600                    | 0,5600                    | 0,5387                    |
| 87,66       | 0,5312                    | 0,5532                    | 0,5536                    | 0,5460                    |
| 96,00       | 0,5952                    | 0,6816                    | 0,6400                    | 0,6389                    |
| 101,00      | 0,6400                    | 0,7200                    | 0,7296                    | 0,6965                    |
| 110,00      | 0,6944                    | 0,8064                    | 0,8160                    | 0,7723                    |
| 125,00      | 0,9056                    | 1,0592                    | 0,9952                    | 0,9867                    |
| 126,00      | 0,8800                    | 1,0432                    | 0,9856                    | 0,9696                    |
| 134,00      | 0,9600                    | 1,0784                    | 1,0560                    | 1,0315                    |
| 139,00      | 0,9696                    | 1,1776                    | 1,1520                    | 1,0997                    |
| 148,00      | 1,0304                    | 1,2576                    | 1,1840                    | 1,1573                    |
| 163,00      | 1,1552                    | 1,4272                    | 1,2800                    | 1,2875                    |

TABLA 4.50

## Experimento B - 6

Intensidad media de iluminación, lux

| Vaso           | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1623                 | 1605                 | 1585                 | 1603                 | 1823                 | 1636                 |
| R <sub>B</sub> | 1767                 | 1745                 | 1736                 | 1751                 | 1977                 | 1782                 |
| R <sub>C</sub> | 1783                 | 1765                 | 1739                 | 1759                 | 2026                 | 1800                 |

$$(I_0)_m = 1739$$

TABLA 4.51

Experimento B - 7

Cinética del crecimiento,  $I_4$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0073                    | 0,0073                    | 0,0073                    | 0,0073                    |
| 17,25       | 0,0193                    | 0,0200                    | 0,0193                    | 0,0195                    |
| 19,00       | 0,0223                    | 0,0246                    | 0,0223                    | 0,0231                    |
| 20,83       | 0,0246                    | 0,0256                    | 0,0253                    | 0,0252                    |
| 23,00       | 0,0283                    | 0,0296                    | 0,0270                    | 0,0283                    |
| 25,00       | 0,0293                    | 0,0336                    | 0,0296                    | 0,0308                    |
| 27,00       | 0,0336                    | 0,0370                    | 0,0313                    | 0,0340                    |
| 49,00       | 0,1260                    | 0,1300                    | 0,1280                    | 0,1280                    |
| 51,00       | 0,1544                    | 0,1680                    | 0,1640                    | 0,1621                    |
| 65,25       | 0,3680                    | 0,3944                    | 0,3408                    | 0,3677                    |
| 67,50       | 0,3464                    | 0,3944                    | 0,3600                    | 0,3669                    |
| 72,50       | 0,4208                    | 0,4824                    | 0,4400                    | 0,4477                    |

TABLA 4.52

Experimento D - 1

Cinética del crecimiento,  $I_1$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0082                    | 0,0082                    | 0,0082                    | 0,0082                    |
| 17,00       | 0,0213                    | 0,0236                    | 0,0256                    | 0,0235                    |
| 19,00       | 0,0236                    | 0,0263                    | 0,0266                    | 0,0255                    |
| 20,83       | 0,0253                    | 0,0280                    | 0,0280                    | 0,0271                    |
| 23,00       | 0,0263                    | 0,0293                    | 0,0336                    | 0,0297                    |
| 25,00       | 0,0286                    | 0,0310                    | 0,0326                    | 0,0307                    |
| 27,00       | 0,0286                    | 0,0326                    | 0,0336                    | 0,0316                    |
| 41,25       | 0,0550                    | 0,0832                    | 0,0652                    | 0,0678                    |
| 43,00       | 0,0640                    | 0,0872                    | 0,0832                    | 0,0781                    |
| 44,75       | 0,0672                    | 0,0900                    | 0,0852                    | 0,0808                    |
| 47,00       | 0,0720                    | 0,0932                    | 0,0932                    | 0,0861                    |
| 49,00       | 0,0832                    | 0,0986                    | 0,1052                    | 0,0957                    |
| 50,75       | 0,0820                    | 0,1120                    | 0,1140                    | 0,1027                    |

TABLA 4.53

Experimento D - 2

Cinética del crecimiento,  $I_2$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0092                    | 0,0092                    | 0,0092                    |
| 17,00       | 0,0246                    | 0,0230                    | 0,0238                    |
| 19,00       | 0,0280                    | 0,0236                    | 0,0258                    |
| 20,75       | 0,0303                    | 0,0246                    | 0,0275                    |
| 23,00       | 0,0313                    | 0,0266                    | 0,0290                    |
| 25,00       | 0,0336                    | 0,0280                    | 0,0308                    |
| 27,00       | 0,0383                    | 0,0326                    | 0,0355                    |
| 41,50       | 0,1052                    | 0,1186                    | 0,1119                    |
| 43,00       | 0,1166                    | 0,1232                    | 0,1199                    |
| 44,75       | 0,1280                    | 0,1366                    | 0,1323                    |
| 47,00       | 0,1532                    | 0,1612                    | 0,1572                    |
| 49,00       | 0,1584                    | 0,1612                    | 0,1598                    |
| 51,00       | 0,1612                    | 0,1704                    | 0,1658                    |
| 68,50       | 0,3224                    | 0,3320                    | 0,3272                    |
| 74,00       | 0,3408                    | 0,3408                    | 0,3408                    |
| 89,00       | 0,4480                    | 0,4584                    | 0,4532                    |



Experimento D - 3

Cinética del crecimiento,  $I_3$ 

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0059                    | 0,0059                    | 0,0059                    | 0,0059                    |
| 17,00       | 0,0120                    | 0,0120                    | 0,0120                    | 0,0120                    |
| 19,00       | 0,0156                    | 0,0156                    | 0,0156                    | 0,0156                    |
| 21,00       | 0,0170                    | 0,0170                    | 0,0170                    | 0,0170                    |
| 23,00       | 0,0170                    | 0,0170                    | 0,0170                    | 0,0170                    |
| 25,00       | 0,0193                    | 0,0193                    | 0,0193                    | 0,0193                    |
| 27,00       | 0,0236                    | 0,0236                    | 0,0236                    | 0,0236                    |
| 41,00       | 0,0516                    | 0,0516                    | 0,0516                    | 0,0516                    |
| 43,00       | 0,0560                    | 0,0560                    | 0,0560                    | 0,0560                    |
| 45,00       | 0,0640                    | 0,0640                    | 0,0640                    | 0,0640                    |
| 47,00       | 0,0740                    | 0,0740                    | 0,0740                    | 0,0740                    |
| 48,75       | 0,0886                    | 0,0886                    | 0,0886                    | 0,0886                    |
| 51,00       | 0,1012                    | 0,1012                    | 0,1012                    | 0,1012                    |
| 51,50       | 0,0766                    | 0,1300                    | 0,1065                    | 0,1044                    |
| 66,00       | 0,2024                    | 0,2960                    | 0,2200                    | 0,2395                    |
| 72,58       | 0,2332                    | 0,2960                    | 0,2424                    | 0,2572                    |
| 74,83       | 0,2560                    | 0,3144                    | 0,2652                    | 0,2785                    |
| 75,83       | 0,2560                    | 0,3224                    | 0,2652                    | 0,2812                    |
| 90,00       | 0,3488                    | 0,4848                    | 0,3944                    | 0,4093                    |
| 95,91       | 0,3944                    | 0,5200                    | 0,4264                    | 0,4469                    |
| 97,25       | 0,4264                    | 0,5464                    | 0,4480                    | 0,4736                    |
| 115,00      | 0,6128                    | 0,7520                    | 0,6128                    | 0,6592                    |
| 121,33      | 0,6288                    | 0,7520                    | 0,6288                    | 0,6699                    |
| 123,50      | 0,6288                    | 0,8528                    | 0,6448                    | 0,7088                    |
| 138,91      | 0,8528                    | 0,9856                    | 0,8528                    | 0,8971                    |

TABLA 4.55

Experimento D - 4

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0132                    | 0,0132                    | 0,0132                    | 0,0132                    |
| 9,00        | 0,0303                    | 0,0300                    | 0,0281                    | 0,0295                    |
| 24,00       | 0,0612                    | 0,0544                    | 0,0560                    | 0,0572                    |
| 33,00       | 0,1172                    | 0,1196                    | 0,1040                    | 0,1136                    |
| 48,00       | 0,1968                    | 0,2344                    | 0,2160                    | 0,2157                    |
| 57,00       | 0,2768                    | 0,3344                    | 0,3232                    | 0,3115                    |
| 72,00       | 0,4256                    | 0,5216                    | 0,4576                    | 0,4683                    |
| 81,00       | 0,4928                    | 0,5920                    | 0,5920                    | 0,5589                    |
| 96,00       | 0,6592                    | 0,8000                    | 0,7360                    | 0,7317                    |

TABLA 4.56

Experimento D - 4

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1616                 | 1595                 | 1555                 | 1574                 | 1754                 | 1613                 |
| R <sub>B</sub> | 1717                 | 1701                 | 1667                 | 1682                 | 1851                 | 1718                 |
| R <sub>C</sub> | 1679                 | 1646                 | 1605                 | 1604                 | 1766                 | 1661                 |

$$(I_o)_m = 1664$$

TABLA 4.57

Experimento D - 5

Cinética del crecimiento,  $I_4$ 

| <u>t, h</u> | <u><math>c_A, g/l</math></u> | <u><math>c_B, g/l</math></u> | <u><math>c_m, g/l</math></u> |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0,00        | 0,0078                       | 0,0078                       | 0,0078                       |
| 17,25       | 0,0223                       | 0,0220                       | 0,0222                       |
| 19,00       | 0,0273                       | 0,0240                       | 0,0257                       |
| 20,83       | 0,0293                       | 0,0286                       | 0,0290                       |
| 23,00       | 0,0316                       | 0,0273                       | 0,0295                       |
| 25,00       | 0,0350                       | 0,0303                       | 0,0327                       |
| 26,75       | 0,0436                       | 0,0326                       | 0,0381                       |
| 41,08       | 0,1532                       | 0,0852                       | 0,1192                       |
| 43,00       | 0,1572                       | 0,0880                       | 0,1226                       |
| 44,83       | 0,1664                       | 0,0920                       | 0,1292                       |
| 47,08       | 0,1680                       | 0,1052                       | 0,1366                       |
| 49,00       | 0,1880                       | 0,1212                       | 0,1546                       |
| 51,00       | 0,2132                       | 0,1346                       | 0,1739                       |
| 65,00       | 0,2960                       | 0,2692                       | 0,2826                       |
| 67,00       | 0,3064                       | 0,2768                       | 0,2916                       |
| 72,00       | 0,3760                       | 0,3488                       | 0,3624                       |

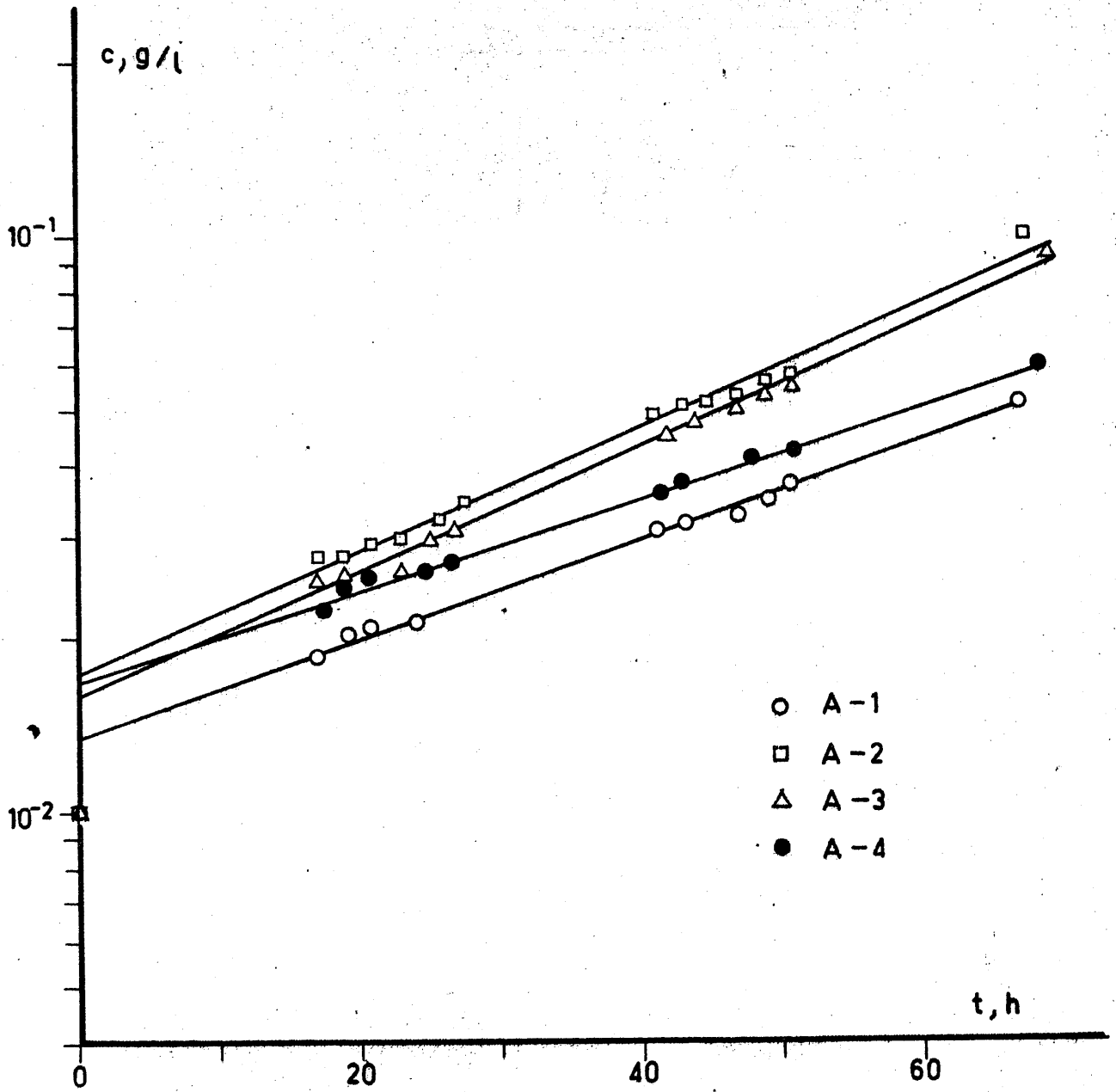


FIG 4.22

TABLA 4.58

| <u>Exp.</u> | <u>I<sub>o</sub></u><br><u>lux</u> | <u><math>\mu</math></u><br><u>h<sup>-1</sup></u> | <u>r<sup>2</sup></u> |
|-------------|------------------------------------|--|----------------------|
| A - 1       | 725                                | 0,0196   | 0,994                |
| A - 2       | 1180                               | 0,0245   | 0,990                |
| A - 3       | 1450                               | 0,0249   | 0,995                |
| A - 4       | 1910                               | 0,0181   | 0,995                |

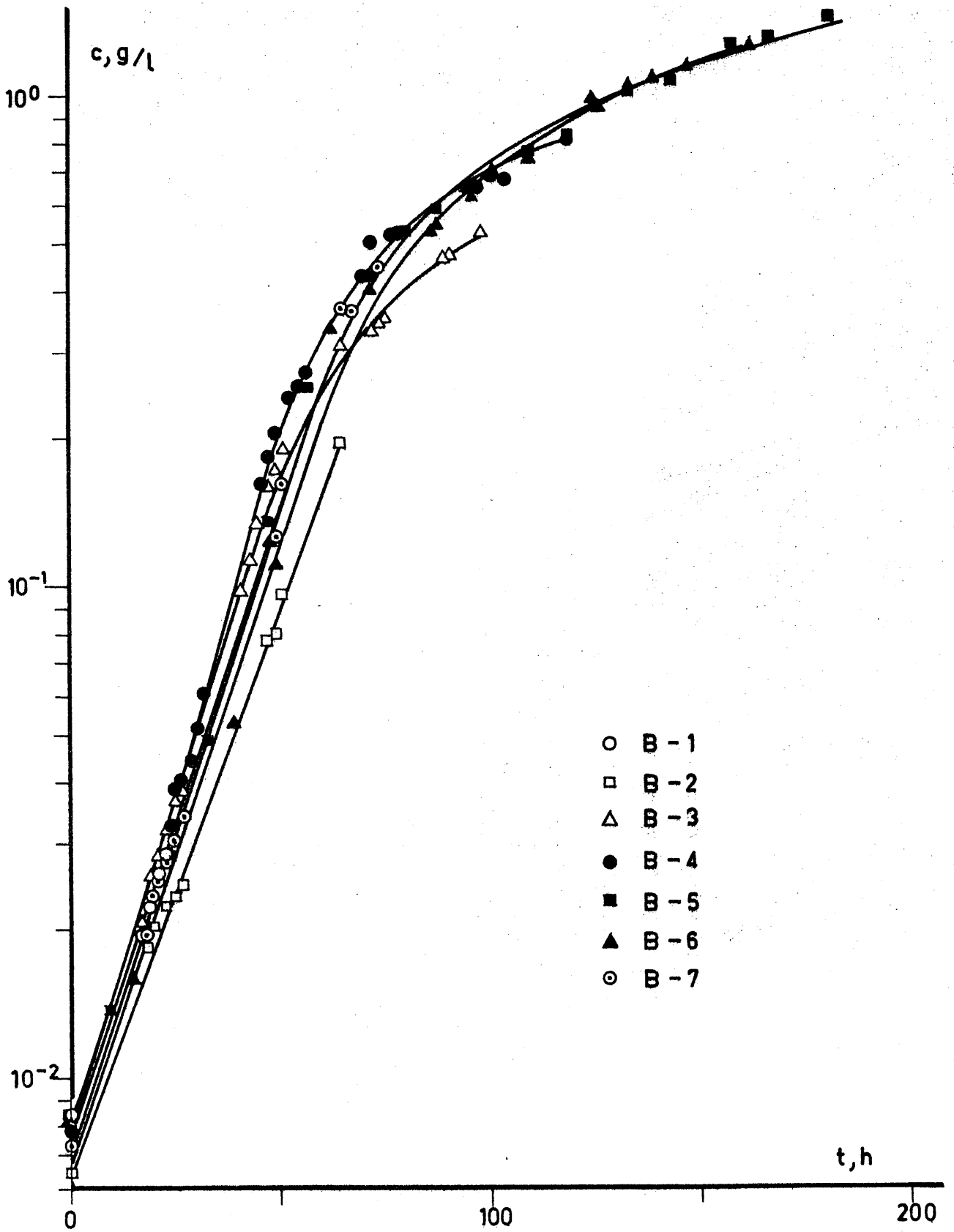


FIG 4.23

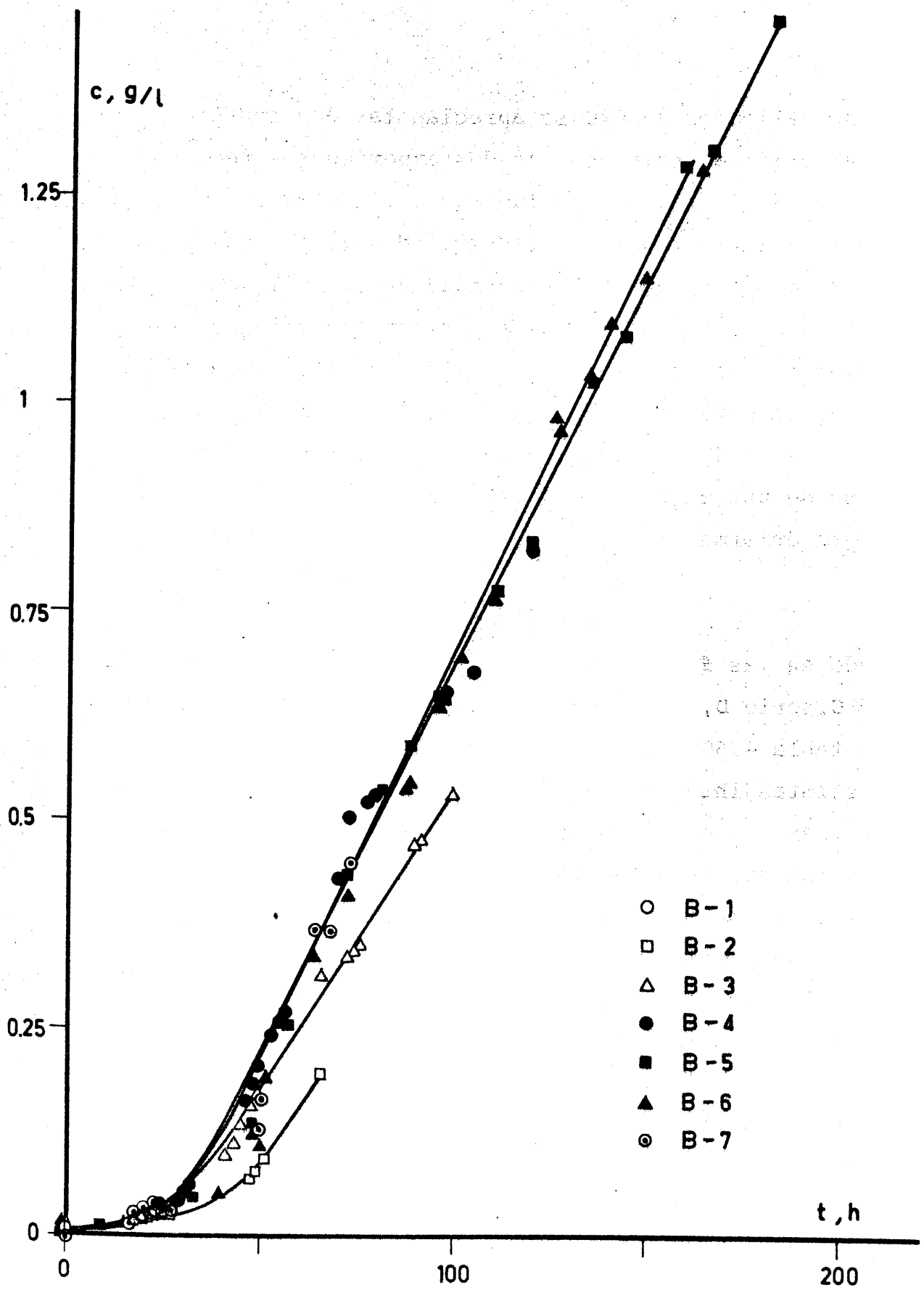


FIG 4.24



tos realizados a 30°C se aprecian las dos zonas exponencial y lineal, salvo en los dos experimentos realizados a la menor intensidad de iluminación, 725 lux, en los que no se alcanza la zona lineal. Conviene destacar que la variación de  $\mu$  y  $p$  con la intensidad de iluminación que se aprecia en las dos figuras anteriormente citadas, es algo inferior que la observada a 30°C. Los valores de estos parámetros, obtenidos por regresión lineal, se indican en la tabla 4.59 junto con el valor de  $c_x$ , correspondiente al -paso de una zona a otra, calculados como ya se ha indicado anteriormente.

Un tratamiento semejante se ha reali-  
zado en las figuras 4.25 y 4.26 para los experimentos de 35°C, serie D, y los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 4.60. En este caso, las curvas correspondientes a distintas intensidades de iluminación quedan más separadas, pero esto es debido fundamentalmente a que la concentración del inóculo fué algo distinta de unos experimen-  
tos a otros.

Los resultados obtenidos en los cuatro experimentos realizados a 18°C, indican que la velocidad específica de crecimiento pasa por un máximo al aumentar la intensidad de iluminación. Este comportamiento es ex-clusivo de esta temperatura y no ha sido observado en -ninguna de las otras tres temperaturas ensayadas, todas ellas superiores a 18°C, en el rango de intensidades de i-

TABLA 4.59

| <u>Exp.</u> | <u>I<sub>0</sub></u><br><u>lux</u> | <u>μ</u><br><u>h<sup>-1</sup></u> | <u>r<sup>2</sup></u> | <u>P</u><br><u>g/l h</u> | <u>r<sup>2</sup></u> | <u>c<sub>x</sub></u><br><u>g/l</u> |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------------|
| B - 1       | 725                                | 0,0522                            | 0,995                | -----                    | -----                | -----                              |
| B - 2       | 725                                | 0,0518                            | 0,997                | -----                    | -----                | -----                              |
| B - 3       | 1180                               | 0,0611                            | 0,997                | 0,0072                   | 0,996                | 0,118                              |
| B - 4       | 1450                               | 0,0624                            | 0,996                | 0,0091                   | 0,976                | 0,146                              |
| B - 5       | 1483                               | 0,0589                            | 0,990                | 0,0095                   | 0,996                | 0,161                              |
| B - 6       | 1739                               | 0,0573                            | 0,981                | 0,0100                   | 0,995                | 0,175                              |
| B - 7       | 1910                               | 0,0598                            | 0,998                | 0,0119                   | 0,903                | 0,199                              |

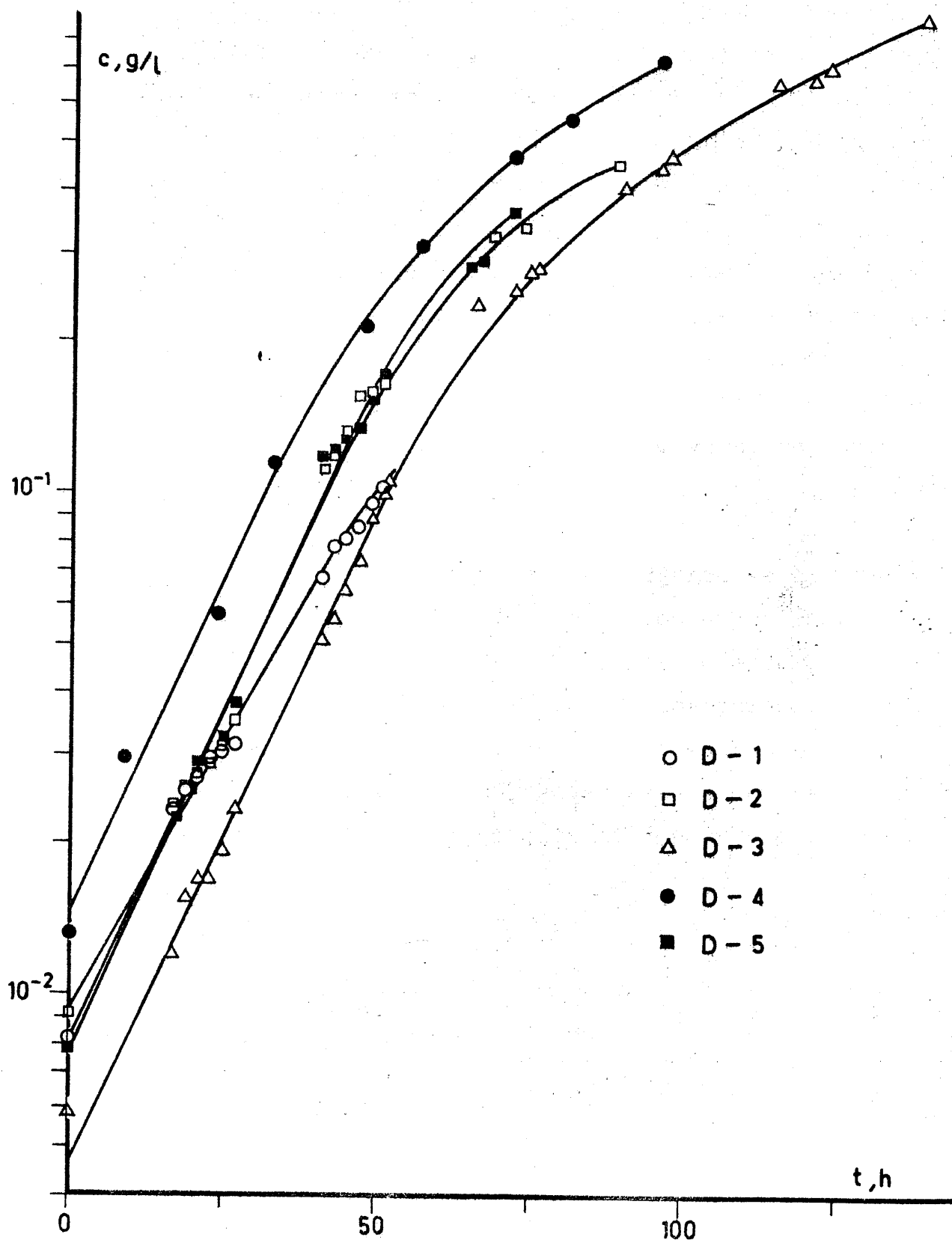


FIG. 4.00

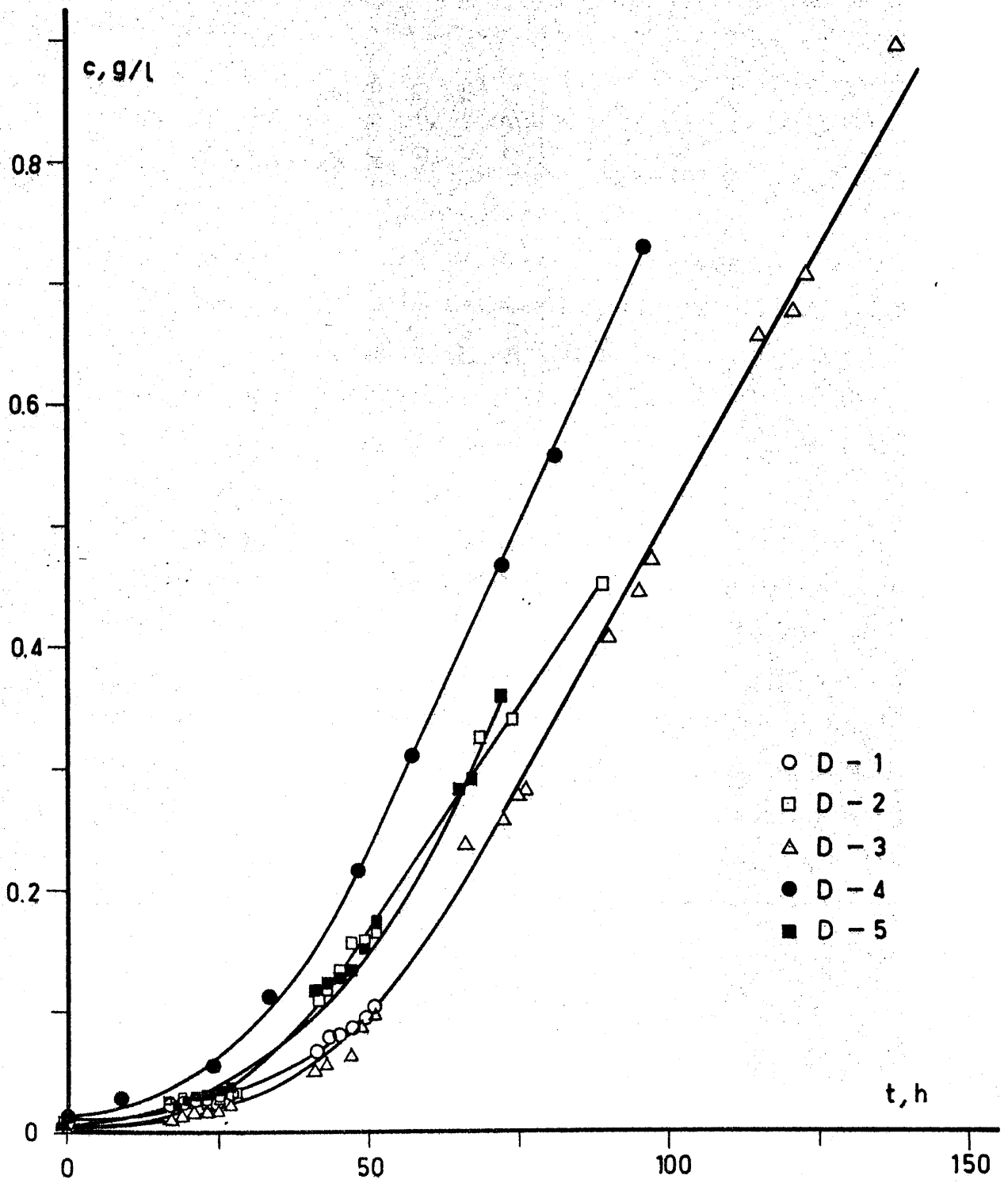


FIG 4.26

TABLA 4.60

| Exp.  | $I_o$<br>lux | $\mu$<br>$h^{-1}$ | $r^2$ | P<br>$g/l\ h$ | $r^2$ | $c_x$<br>$g/l$ |
|-------|--------------|-------------------|-------|---------------|-------|----------------|
| D - 1 | 725          | 0,0494            | 0,989 | 0,0044        | 0,997 | 0,0891         |
| D - 2 | 1180         | 0,0604            | 0,978 | 0,0073        | 0,992 | 0,1202         |
| D - 3 | 1450         | 0,0600            | 0,995 | 0,0090        | 0,990 | 0,1500         |
| D - 4 | 1664         | 0,0616            | 0,982 | 0,0107        | 0,999 | 0,1737         |
| D - 5 | 1910         | 0,0627            | 0,993 | 0,0119        | 0,969 | 0,1898         |

luminación explorado. Un resultado semejante es observado por Tamiya y col. (1953b) que mientras a 15 y 25°C no observan disminución apreciable de la velocidad específica de crecimiento hasta intensidades de iluminación del orden de 50000 lux, a 7°C el crecimiento era retardado incluso con 5000 lux y a 50000 lux el crecimiento se detenía por completo en pocos días haciéndose las células totalmente incoloras. Analogamente Sorokin y Krauss (1962) en el estudio del crecimiento de cultivos sincronizados de *Chlorella Pyrenoidosa* y operando hasta intensidades de iluminación del orden de 32000 lux encuentran máximos en la velocidad específica de crecimiento para 20°C y temperaturas inferiores pero no para las temperaturas más altas.

Es indudable, que a muy altas intensidades de iluminación se debe producir un efecto negativo sobre  $\mu$ , sin embargo, nuestros resultados y los de la mayor parte de los investigadores encontrados en la bibliografía, ponen de manifiesto que solo a temperaturas bajas este efecto se produce para valores relativamente pequeños de la intensidad de iluminación, en general para temperaturas superiores a 25°C el valor de  $\mu$  máxima encontrado se mantiene prácticamente constante hasta intensidades de iluminación próximas al valor medio de la luz del sol.

Como se ha indicado anteriormente el

único modelo de los utilizados en el apartado 4.3 que prevee que  $\mu$  pase por un máximo al variar  $I$  es el modelo de Steele (1977), ecuación [4.25], por lo que se han ajustado los datos de la tabla 4.58 a este modelo, utilizando como valor de la intensidad de iluminación el medio correspondiente a la duración del experimento (ya que todos ellos transcurren en zona exponencial exclusivamente) la ecuación obtenida es

$$\mu = 0,0236 \frac{I}{909} e^{\left(1 - \frac{I}{909}\right)} \quad r^2 = 0,959 \quad [4.30]$$

que se representa junto con los resultados experimentales en la figura 4.27.

Para las temperaturas de 25 y 35°C se ha realizado un tratamiento semejante al del apartado anterior para 30°C, en la figura 4.28 se han representado los valores de la velocidad de crecimiento en la zona lineal frente a la intensidad de iluminación incidente, para estas dos temperaturas. Se observa en esta figura que al igual que a 30°C los valores de  $p$  parecen variar linealmente con  $I_0$ , siendo los valores de la pendiente:

| <u>T, °C</u> | <u>pendiente, g/l h lux</u> |
|--------------|-----------------------------|
| 25           | 6,15.10 <sup>-6</sup>       |
| 30           | 8,45.10 <sup>-6</sup>       |
| 35           | 6,22.10 <sup>-6</sup>       |

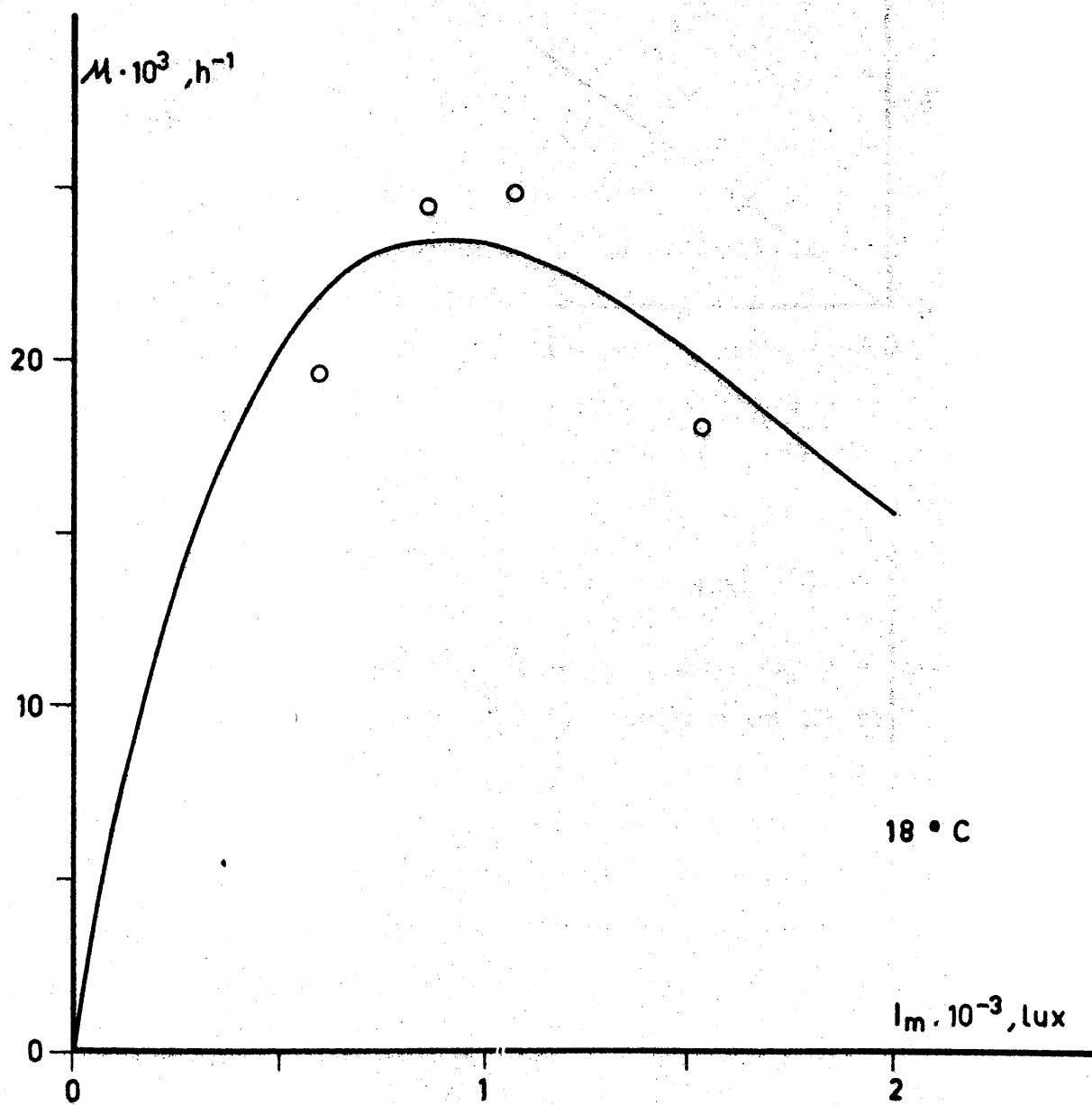


FIG 4.27



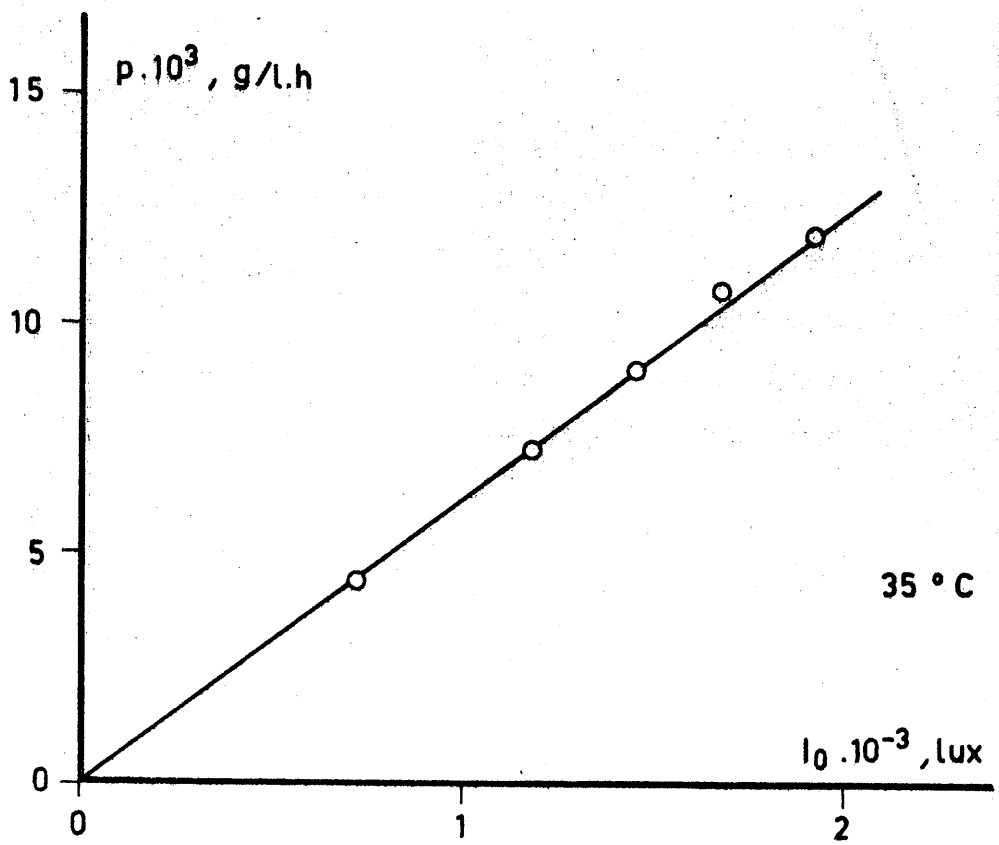
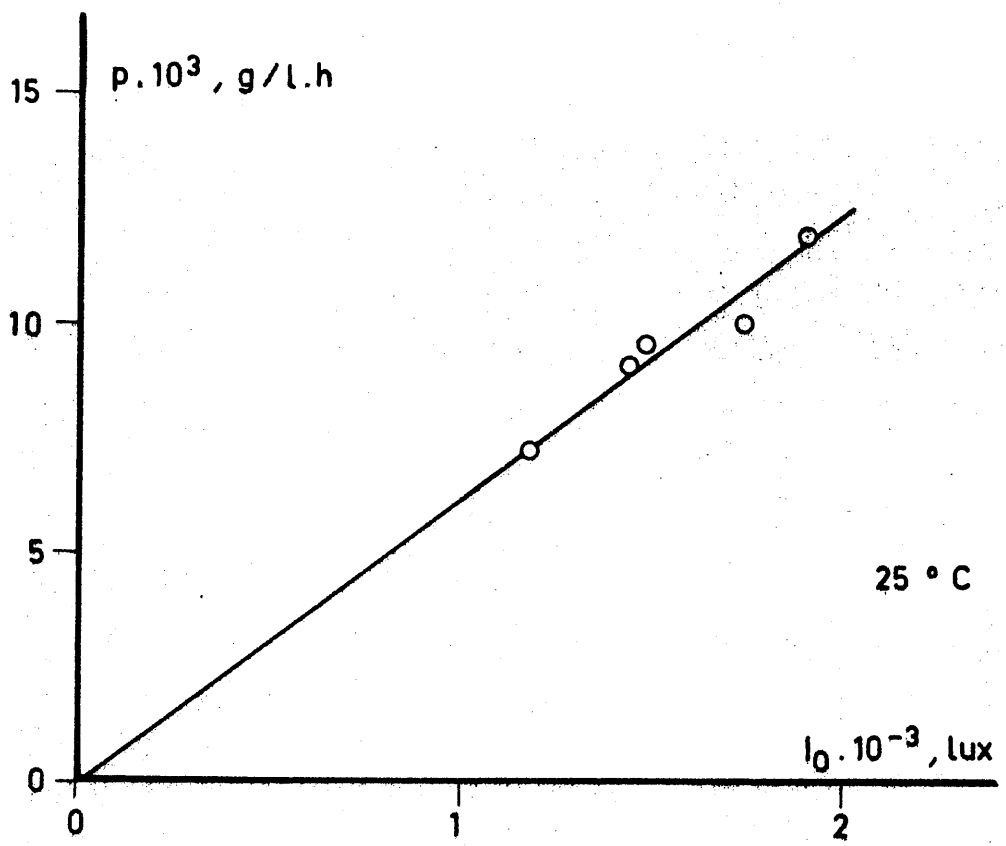


FIG 4.28

que ponen de manifiesto que la velocidad de crecimiento en la zona lineal es máxima a aproximadamente 30°C y disminuye tanto al aumentar como al disminuir la temperatura.

En las figuras 4.29 y 4.30 se ha realizado una representación similar a la de la figura 4.21 representando los valores de la velocidad específica de crecimiento (calculada para la zona lineal como  $p/c$ ) frente a  $I_m$ , en el caso de los valores de  $\mu$  correspondientes a la zona exponencial se han representado frente a los dos valores límites, ya comentados, del intervalo en el que tiene lugar esta zona, que se indican en las tablas 4.61 y 4.62.

De las figuras 4.29, 4.21 y 4.30 se han obtenido los valores que se indican en la tabla 4.63, donde  $\mu_m$  representa la máxima velocidad específica de crecimiento correspondiente al modelo exponencial [4.24],  $\alpha'$  la pendiente de las rectas indicadas en las figuras e  $I_b$  la abscisa en el origen de estas rectas, que de acuerdo con la bibliografía debe representar la intensidad de iluminación incidente mínima necesaria para el metabolismo basal sin que se produzca crecimiento.

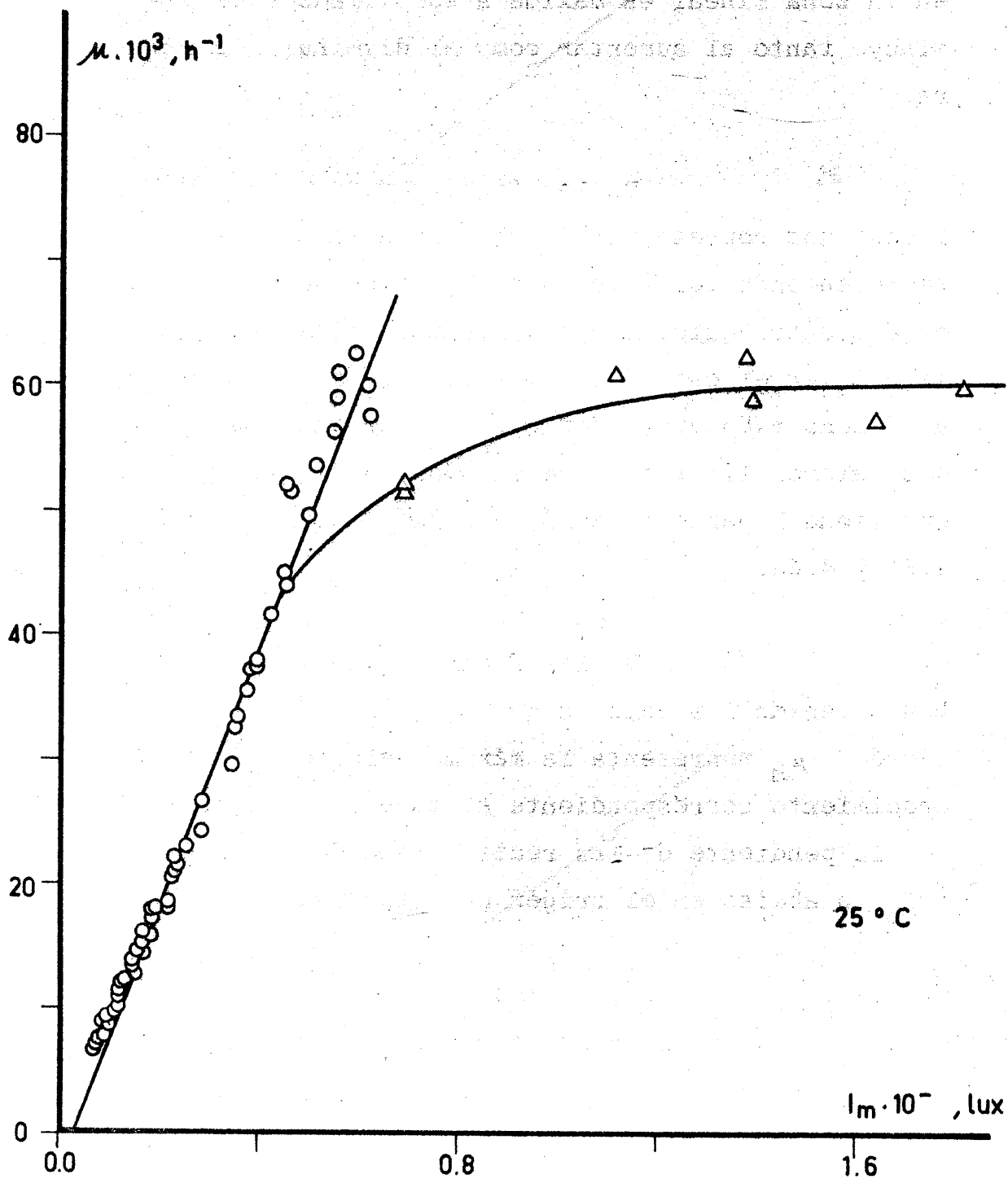


FIG 4.29

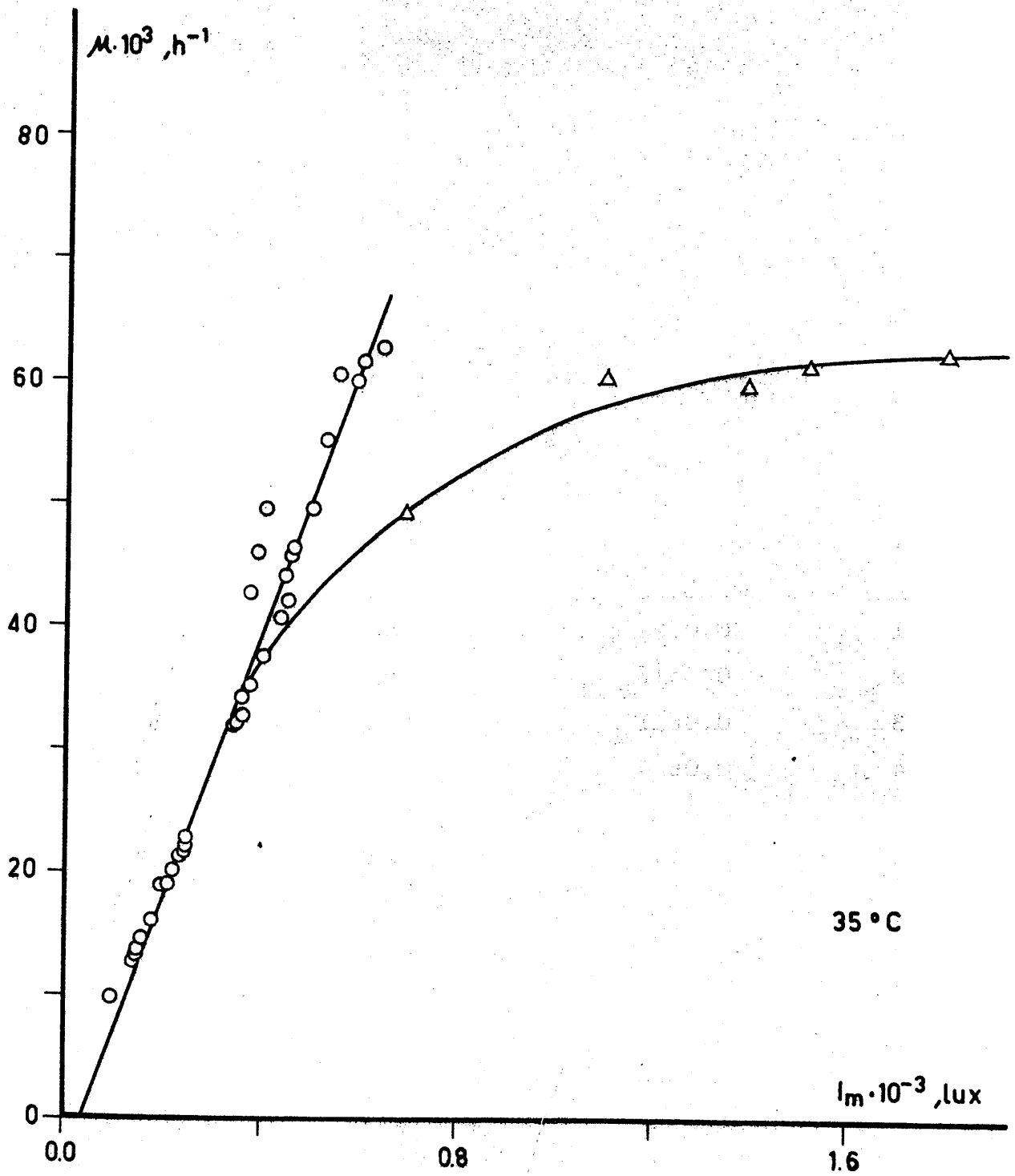


FIG 4.30

TABLA 4.61

| <u>Exp.</u> | $\frac{\mu}{h^{-1}}$ | $\frac{(I_m)_{c_o}}{\text{lux}}$ | $\frac{(I_m)_{c_x}}{\text{lux}}$ |
|-------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| B - 1       | 0,0522               | 682                              | 461                              |
| B - 2       | 0,0518               | 691                              | 461                              |
| B - 3       | 0,0611               | 1111                             | 560                              |
| B - 4       | 0,0624               | 1370                             | 597                              |
| B - 5       | 0,0589               | 1393                             | 568                              |
| B - 6       | 0,0573               | 1635                             | 624                              |
| B - 7       | 0,0598               | 1811                             | 618                              |

TABLA 4.62

| <u>Exp.</u> | $\mu$<br><u><math>h^{-1}</math></u> | $(I_m)_{c_o}$<br><u>lux</u> | $(I_m)_{c_x}$<br><u>lux</u> |
|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| D - 1       | 0,0494                              | 683                         | 404                         |
| D - 2       | 0,0604                              | 1104                        | 554                         |
| D - 3       | 0,0600                              | 1389                        | 585                         |
| D - 4       | 0,0616                              | 1513                        | 601                         |
| D - 5       | 0,0627                              | 1805                        | 643                         |

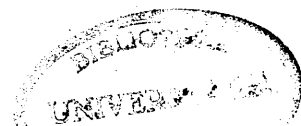


TABLA 4.63

| <u>T , °C</u> | <u><math>\mu_m , h^{-1}</math></u> | <u>I<sub>s</sub> , lux</u> | <u><math>\alpha' , l / h \text{ lux}</math></u> | <u>I<sub>b</sub> , lux</u> |
|---------------|------------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| 25            | 0,0607                             | 345                        | $1,04 \cdot 10^{-4}$                            | 22                         |
| 30            | 0,0996                             | 909                        | $1,33 \cdot 10^{-4}$                            | 3                          |
| 35            | 0,0639                             | 455                        | $1,06 \cdot 10^{-4}$                            | 23                         |

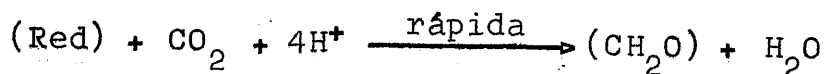
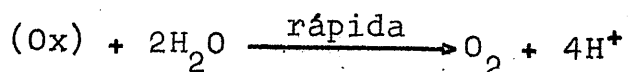
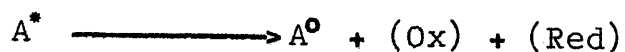
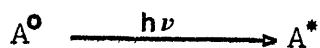
Se observa en esta tabla que al igual que ocurría con la velocidad de crecimiento en la zona lineal, la velocidad específica máxima de crecimiento se hace máxima a 30°C y muy próxima a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

El mismo resultado se observa para la pendiente de la recta  $\mu$  frente a I para pequeños valores de I,  $\alpha'$ , es decir para valores de la intensidad de iluminación inferiores al de saturación. Por otra parte la intensidad de saturación es máxima a 30°C y la I<sub>b</sub> mínima, si bien este último valor es poco significativo ya que su obtención por extrapolación a  $\mu$  cero implica que un pequeño error en la pendiente,  $\alpha'$ , puede alterar grandemente el resultado obtenido.

#### 4.5 INTERPRETACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

El estudio bibliográfico realizado - junto con los resultados obtenidos en esta investigación ,nos han llevado a proponer para el proceso fotosintético el modelo que se desarrolla a continuación, semejante en sus fundamentos al propuesto por Lumry y Rieske (1959)

Supóngase que el mecanismo por el que la fotosíntesis tiene lugar viene representado por las siguientes etapas



y que dado que las dos últimas etapas son rápidas y el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  se encuentran en gran exceso, el mecanismo anterior puede simplificarse a





En estas ecuaciones  $A^{\circ}$  y  $A^*$  representan una molécula de un pigmento fotosintético no activado y activado respectivamente, por tanto la etapa [4.31] implica la interacción entre un fotón y una molécula orgánica, mientras que la etapa [4.32] representa la utilización metabólica de la energía absorbida en [4.31] y debe ser de carácter enzimático. A través de ambas etapas en serie la clorofila actúa de transportador de energía.

Si se representa por  $a$  a los mg de pigmentos fotosintéticos por g de peso seco de células, y por  $a^{\circ}$  y  $a^*$  las concentraciones, expresadas en las mismas unidades que  $a$ , de pigmentos fotosintéticos no activados y activados respectivamente, es evidente que en cada instante debe cumplirse

$$a = a^{\circ} + a^* \quad [4.33]$$

Aunque la energía absorbida en la fotosíntesis no se emplea solo en la biosíntesis de componentes celulares, es decir en el crecimiento, sino también en el mantenimiento de las células, parece lógico que la velocidad específica de crecimiento esté directamente relacionada con la velocidad de consumo metabólico de la energía, y podrá expresarse por tanto

$$\mu = k a^* \quad [4.34]$$

En cuanto a las velocidades relativas de las etapas [4.31] y [4.32] caben dos posibilidades límites:

- 1.- Que la primera etapa se pueda considerar instantánea, con lo que toda la energía incidente será absorbida o la concentración de pigmentos fotosintéticos no activados será nula.

El primer caso, se dará cuando la energía incidente no sea suficiente para activar los  $A^0$  producidos por la etapa [4.32], en estas condiciones la velocidad global de crecimiento deberá ser proporcional a la intensidad de iluminación incidente y podrá expresarse en la forma

$$\mu = \alpha I \quad [4.35]$$

siendo las concentraciones de pigmentos fotosintéticos

$$a^* = \frac{\alpha I}{k} \quad [4.36]$$

$$a^0 = a - \frac{\alpha I}{k} \quad [4.37]$$

Al ir creciendo la intensidad de iluminación se alcanzará un valor tal que

$$a^* = \frac{\alpha I_s}{k} = a \quad [4.38]$$

$$a^0 = 0 \quad [4.39]$$

y a partir de este momento todo exceso de energía sobre  $I_s$  no podrá ser absorbida, permaneciendo constante la velocidad específica de crecimiento e igual a

$$\mu = k a \quad [4.40]$$

Puede verse que estos resultados conducen al modelo discontinuo ya comentado para explicar la influencia de la intensidad de iluminación sobre la velocidad específica de crecimiento en un cultivo de algas limitado por la luz, que puede resumirse en la forma

$$\mu = \alpha I \quad \text{para} \quad I \leq \frac{k}{\alpha} a \quad [4.41]$$

$$\mu = k a \quad \text{para} \quad I \geq \frac{k}{\alpha} a$$

2.- Si la velocidad de ambas etapas es parecida, se alcanzará un estado cuasi-estacionario en el que la concentración de pigmentos fotosintéticos activados permanecerá prácticamente constante, al igualarse las velocidades de ambas etapas

$$\mu = \alpha I a^0 = k a^* \quad [4.43]$$

de donde

$$a^{\circ} = \frac{k}{\alpha I} a^* \quad [4.44]$$

y teniendo en cuenta 4.33

$$a^* = \frac{a}{\frac{k}{\alpha I} + 1} \quad [4.45]$$

por tanto

$$\mu = k a^* = \frac{k \alpha a I}{k + \alpha I} \quad [4.46]$$

que corresponde al modelo hiperbólico de Tamiya.

Logicamente, si el modelo propuesto es adecuado la situación real se encontrará comprendida entre estos dos límites, lo que como ya se ha visto es confirmado por los resultados de esta investigación y por los obtenidos por la mayor parte de los investigadores. En general, la situación real parece estar mucho más próxima del modelo discontinuo que del de Tamiya, aunque naturalmente no se observa un cambio tan brusco al valor de  $I_s$  como el modelo discontinuo prevee.

Puesto que la etapa [4.31] implica una interacción mucho más simple y directa que la [4.32], de carácter fotoquímico, es lógico que sea más rápida, sin embargo es evidente que para que se produzca requiere el contacto fotón- $A^{\circ}$  y que la probabilidad de este contacto dependerá del valor de  $a^{\circ}$ . El razonamiento anterior equi

vale a decir que la fracción absorbida de la energía incidente será proporcional a la concentración de receptores capaces de absorber esa energía, es decir

$$-\frac{da^0}{dI} = \beta a^0 \quad [4.47]$$

que por integración conduce a

$$a^0 = a e^{-\beta I} \quad [4.48]$$

ya que en la oscuridad todos los pigmentos estarán sin activar es decir

$$a^0 = a \quad [4.49]$$

Sustituyendo [4.48] en [4.33] se obtiene

$$a^* = a - a^0 = a (1 - e^{-\beta I}) \quad [4.50]$$

y por tanto la velocidad específica de crecimiento

$$\mu = k a (1 - e^{-\beta I}) \quad [4.51]$$

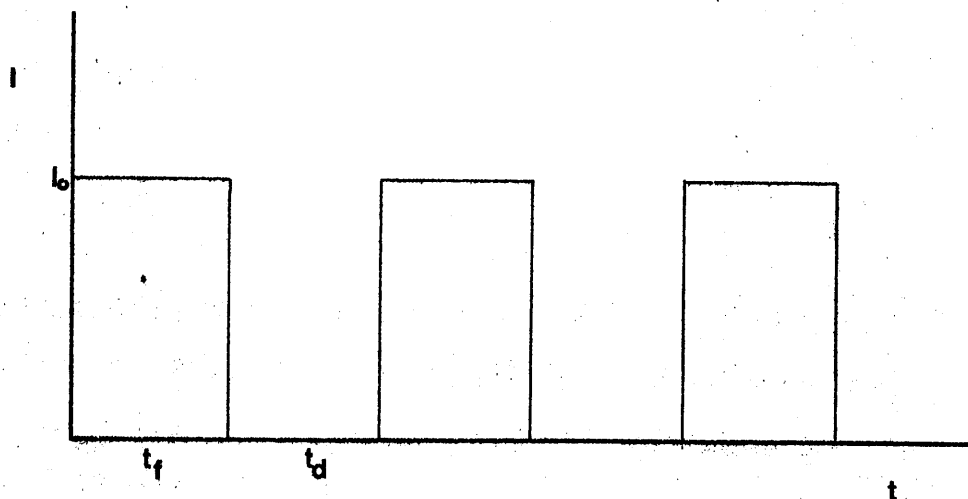
que corresponde al modelo exponencial ya utilizado anteriormente.

Parece lógico, que este último modelo represente mejor la realidad que los otros dos casos li-

mites citados, como efectivamente se ha encontrado anteriormente no solo con los resultados experimentales de esta investigación sino también con los de Myers y col. (1946 y 1954).

Si el modelo anteriormente desarrollado es adecuado para representar la velocidad de fotosíntesis, y por tanto de crecimiento, deberá explicar los resultados obtenidos en los experimentos con luz intermitente que se encuentran en la bibliografía Phillips y Myers (1954b), Kok (1953).

En estos experimentos se somete un cultivo de algas de pequeño espesor y diluido para evitar las sombras mutuas entre las células a un programa de iluminación tal como se indica en la figura



con tiempos de flash muy cortos de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  s y tiempos de oscuridad inferiores a 1 s.

Si en la iluminación intermitente la velocidad específica de crecimiento durante la etapa de iluminación viniera dada por la ecuación [4.51], y durante el periodo de oscuridad los pigmentos fotosintéticos activados  $A^*$  se siguieran consumiendo por el metabolismo celular pero no se generasen, su concentración durante este periodo disminuiría constantemente de acuerdo con la etapa [4.32] del mecanismo propuesto

$$-\frac{da^*}{dt} = k'a^* \quad [4.52]$$

donde la constante cinética  $k'$  es distinta de la anteriormente utilizada al expresar la velocidad específica de crecimiento, aunque proporcional a ella de acuerdo con los coeficientes estequiométricos de la transformación real representada por la etapa [4.32]

Por integración de [4.52], teniendo en cuenta [4.50] se obtiene

$$a^* = a (1 - e^{-\beta I_0}) e^{-k't} \quad [4.53]$$

y por tanto la velocidad específica de crecimiento media durante el periodo de oscuridad vendrá dada por

$$\bar{\mu}_d = \frac{1}{t_d} \int_0^{t_d} k a^* dt$$

$$\bar{\mu}_d = \frac{k a}{k' t_d} (1 - e^{-\beta I_0}) (1 - e^{-k' t_d}) \quad [4.54]$$

Considerando conjuntamente los dos periodos, la velocidad especifica media de crecimiento del cultivo sometido a iluminación intermitente será

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_f t_f + \mu_d t_d}{t_f + t_d} \quad [4.55]$$

es decir

$$\bar{\mu} = k a (1 - e^{-\beta I_0}) \frac{t_f}{t_f + t_d} \left[ 1 + \frac{1}{k' t_f} (1 - e^{-k' t_d}) \right] \quad [4.56]$$

La ecuación [4.56] se ha comparado con los resultados experimentales de Phillips y Myers (1954b) y con la descripción cualitativa de Kok (1953) sobre la influencia de los parámetros de la iluminación intermitente:  $I_0, t_f, t_d$ . Aunque reproduce bien las variaciones de  $\bar{\mu}$  con estos parámetros, conduce siempre a valores de  $\bar{\mu}$  superiores a los encontrados experimentalmente.

Sin embargo, si en la ecuación [4.56] se utiliza en lugar de  $I_0$  la intensidad media de iluminación dada por



$$I_m = I_0 \frac{t_f}{t_f + t_d} \quad [4.57]$$

la concordancia es total.

En efecto, por ajuste por regresión - no lineal de los datos de iluminación de Phillips y col (1954b) indicados en la figura 4.19 a la ecuación [4.51] se obtiene

$$k a = 0,0865 \text{ h}^{-1}$$

$$\beta = 0,00038 \text{ lux}^{-1}$$

que sustituidos en la ecuación [4.56] modificada en la forma indicada

$$\bar{\mu} = 0,0865(1 - e^{-0,00038 I_m}) \frac{t_f}{t_f + t_d} \left[ 1 + \frac{1}{k' t_f} (1 - e^{-k' t_d}) \right] \quad [4.58]$$

que puede ponerse en la forma

$$\left[ \frac{\bar{\mu}}{0,0865(1 - e^{-0,00038 I_m}) \frac{t_f}{t_f + t_d}} - 1 \right] t_f = \frac{1}{k'} (1 - e^{-k' t_d}) \quad [4.59]$$

A partir de los datos de estos autores se han calculado los valores del primer miembro de

la ecuación anterior y se han ajustado por regresión no lineal a la misma. La primera prueba de la validez de este tratamiento sería que los valores de  $k'$  obtenidos del coeficiente que multiplica al tiempo de oscuridad en la exponencial y del coeficiente que multiplica al paréntesis del segundo miembro deberían coincidir.

Es decir, la ecuación [4.59] puede escribirse en la forma

$$f(\bar{\mu}, I_m, t_f, t_d) = A(1 - e^{-Bt_d}) \quad [4.60]$$

y los valores obtenidos por regresión no lineal de los datos de Phillips y col. para las constantes A y B son

$$A = \frac{1}{k'} = 0,359 \cdot 10^{-4} \longrightarrow k' = 27858 \text{ h}^{-1}$$

$$B = k' = 27847 \text{ h}^{-1}$$

que coinciden muy aceptablemente.

La segunda prueba, naturalmente relacionada con la anterior, sería que utilizando el valor de  $k'$  obtenido anteriormente la ecuación [4.58] reprodujese aceptablemente los datos experimentales de estos autores. Como efectivamente ocurre, ver tabla [4.64]

Una tercera comprobación de la ecua-

TABLA 4.64

Resultados de Myers y Phillips (1954)

| $t_d \cdot 10^4, h$ | $t_f \cdot 10^4, h$ | $I_m, lux$ | $\mu \text{ exp. } h^{-1}$ | $\mu \text{ cal. } h^{-1}$ |
|---------------------|---------------------|------------|----------------------------|----------------------------|
| 1,6700              | 0,1850              | 5624       | 0,0225                     | 0,0222                     |
| 0,7390              | 0,1850              | 11687      | 0,0500                     | 0,0461                     |
| 0,2780              | 0,1850              | 24892      | 0,0838                     | 0,0707                     |
| 0,8780              | 0,0464              | 2723       | 0,0208                     | 0,0226                     |
| 0,4170              | 0,0464              | 5704       | 0,0492                     | 0,0484                     |
| 0,1860              | 0,0464              | 11841      | 0,0763                     | 0,0704                     |
| 0,1080              | 0,0464              | 16424      | 0,0879                     | 0,0781                     |
| 0,4530              | 0,0117              | 1533       | 0,0175                     | 0,0221                     |
| 0,2190              | 0,0117              | 3090       | 0,0346                     | 0,0455                     |
| 0,1030              | 0,0117              | 5906       | 0,0638                     | 0,0683                     |
| 0,0472              | 0,0117              | 12363      | 0,0908                     | 0,0814                     |
| 0,0278              | 0,0117              | 17461      | 0,0896                     | 0,0841                     |
| 0,1140              | 0,00278             | 1434       | 0,0263                     | 0,0313                     |
| 0,1140              | 0,00278             | 1495       | 0,0296                     | 0,0322                     |
| 0,0556              | 0,00278             | 2883       | 0,0538                     | 0,0535                     |
| 0,0250              | 0,00278             | 5955       | 0,0767                     | 0,0751                     |
| 0,0167              | 0,00278             | 9334       | 0,0817                     | 0,0824                     |

ción [4.58] consiste en analizar independientemente la influencia de las variables de operación  $I_m$ ,  $t_f$  y  $t_d$  y compararla con la descripción cualitativa de Kok (1953). Esta comparación se ha realizado de forma gráfica en la figura 4.31, que coincide totalmente con las descripciones de este autor.

Sin embargo, los tres modelos indicados anteriormente ignoran en su formulación la influencia de la intensidad de iluminación incidente sobre el contenido total de clorofila de las algas. En general, los resultados encontrados en la bibliografía ponen de manifiesto que las algas reaccionan ante la disminución de la intensidad de iluminación sintetizando más clorofila, aunque no es bien conocido el mecanismo bioquímico por el cual se produce esta respuesta a una alteración del medio.

Aunque como se ha indicado en la introducción de esta memoria las algas de cultivos densos en crecimiento lineal, limitado por la luz, son ricas en clorofila, se dispone de pocos datos cuantitativos sobre la relación entre el contenido en clorofila y la intensidad de iluminación y además suelen presentar gran dispersión dadas las dificultades existentes en la medida experimental del contenido en clorofila.

No obstante, la adaptación del conte-

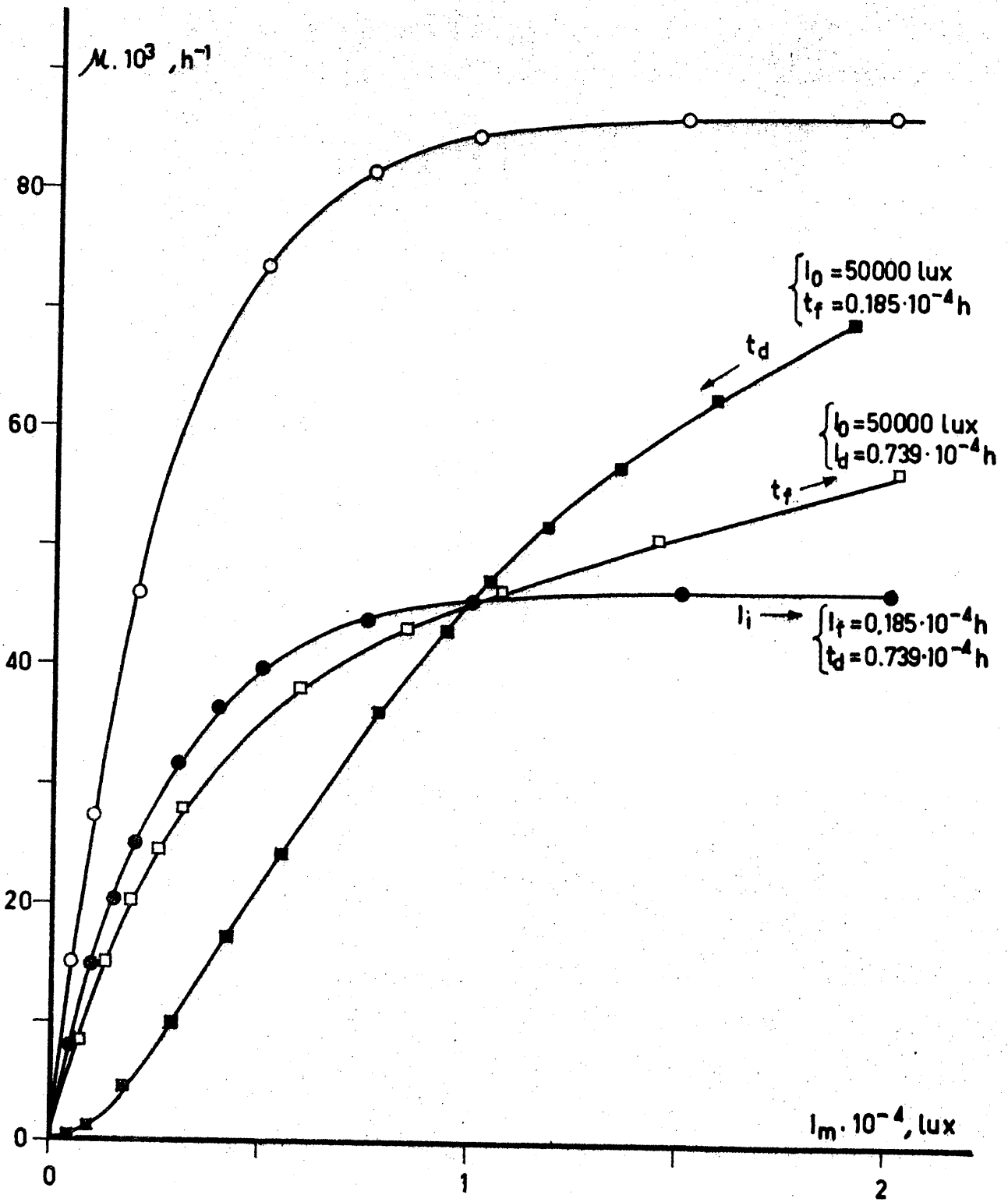


FIG 4.31

nido en clorofila a los cambios de la intensidad de iluminación debe ser un proceso mucho más lento que la propia fotosíntesis como ponen de manifiesto los resultados de algunos investigadores Nielsen y col.(1962), Simer (1969). Por tanto cuando se emplea luz intermitente con pequeños tiempos de flash o cultivos densos agitados el contenido en clorofila de las células debe ser función de la intensidad media de iluminación a la que están expuestas y no de los valores instantaneos. Este razonamiento podría explicar en parte la necesidad de introducir  $I_m$  en la ecuación [4.58] para justificar los resultados de Phillips y col.(1954b).

Otro problema que se presenta en la interpretación de los resultados de esta investigación es la justificación de la existencia de la zona exponencial de crecimiento en los experimentos realizados a pequeñas intensidades de iluminación incidente. Si la velocidad específica de crecimiento parece ser una función-exponencial de la intensidad media de iluminación es difícil explicar como se mantiene constante para variaciones tan apreciables de  $I_m$  como las que se observan por ejemplo, en la tabla 4.34 para los experimentos cinéticos de 30°C.

Con objeto de explicar este fenómeno se realizaron dos experimentos cinéticos más E y F cuyos resultados se indican en las tablas 4.65 a 4.70.

TABLA 4.65

| Experimento E |                           | Cinética del crecimiento  |                           |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <u>t, h</u>   | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> |
| 0,00          | 0,0086                    | 0,0086                    | 0,0086                    |
| 9,00          | 0,0110                    | 0,0110                    | 0,0110                    |
| 24,00         | - - -                     | 0,0245                    | 0,0245                    |
| 28,00         | - - -                     | - - -                     | 0,0306                    |
| 33,00         | - - -                     | - - -                     | 0,0367                    |
| 48,00         | - - -                     | - - -                     | 0,0710                    |

TABLA 4.66

Experimento. E

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>          | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub>       | 459                  | 454                  | 439                  | 434                  | 486                  | 455                  |
| R <sub>A</sub> (9h)  | 402                  | 395                  | 381                  | 374                  | 410                  | 394                  |
| R <sub>B</sub>       | 453                  | 446                  | 435                  | 433                  | 493                  | 451                  |
| R <sub>B</sub> (24h) | 355                  | 349                  | 339                  | 338                  | 379                  | 352                  |
| R <sub>C</sub>       | 478                  | 470                  | 455                  | 451                  | 510                  | 473                  |
| R <sub>C</sub> (48h) | 252                  | 246                  | 238                  | 237                  | 264                  | 248                  |



TABLA 4.67

Experimento F

Cinética del crecimiento

| <u>t, h</u> | <u>c<sub>A</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>B</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>C</sub>, g/l</u> | <u>c<sub>m</sub>, g/l</u> |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,00        | 0,0086                    | 0,0086                    | 0,0086                    | 0,0086                    |
| 8,75        | 0,0122                    | 0,0122                    | 0,0122                    | 0,0122                    |
| 23,75       | 0,0196                    | 0,0196                    | 0,0196                    | 0,0196                    |
| 27,75       | 0,0214                    | 0,0239                    | 0,0233                    | 0,0229                    |
| 32,75       | 0,0245                    | 0,0276                    | 0,0257                    | 0,0259                    |
| 46,75       | 0,0355                    | 0,0416                    | 0,0374                    | 0,0382                    |
| 50,75       | 0,0441                    | 0,0551                    | 0,0490                    | 0,0494                    |
| 54,08       | 0,0502                    | 0,0649                    | 0,0576                    | 0,0576                    |
| 57,08       | 0,0582                    | 0,0747                    | 0,0661                    | 0,0663                    |
| 70,75       | 0,1151                    | 0,1470                    | 0,1274                    | 0,1298                    |
| 74,75       | 0,1421                    | 0,1960                    | 0,1592                    | 0,1658                    |
| 78,25       | 0,1764                    | 0,2254                    | 0,1960                    | 0,1993                    |
| 81,25       | 0,1960                    | 0,2548                    | 0,2156                    | 0,2221                    |

TABLA 4.68

Experimento F

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 267                  | 263                  | 254                  | 251                  | 280                  | 263                  |
| R <sub>B</sub> | 308                  | 304                  | 296                  | 290                  | 319                  | 304                  |
| R <sub>C</sub> | 297                  | 292                  | 284                  | 278                  | 311                  | 293                  |

$$(I_0)_m = 287$$

TABLA 4.69

Experimento F  
Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>o</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 705                  | 696                  | 683                  | 686                  | 774                  | 706                  |
| R <sub>B</sub> | 830                  | 816                  | 804                  | 800                  | 907                  | 829                  |
| R <sub>C</sub> | 802                  | 786                  | 774                  | 771                  | 883                  | 800                  |

$$(I_o)_m = 778$$

TABLA 4.70

Experimento F

Intensidad media de iluminación, lux

| <u>Vaso</u>    | <u>I<sub>1</sub></u> | <u>I<sub>2</sub></u> | <u>I<sub>3</sub></u> | <u>I<sub>4</sub></u> | <u>I<sub>5</sub></u> | <u>I<sub>0</sub></u> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| R <sub>A</sub> | 1052                 | 1048                 | 1035                 | 1044                 | 1203                 | 1066                 |
| R <sub>B</sub> | 1205                 | 1223                 | 1212                 | 1216                 | 1389                 | 1233                 |
| R <sub>C</sub> | 1192                 | 1179                 | 1169                 | 1183                 | 1339                 | 1203                 |

$$(I_0)_m = 1167$$

En el experimento E, realizado con  $I_0 \approx 460$  lux, se interrumpía el crecimiento durante la fase exponencial a las 9,24 y 48 h respectivamente para medir directamente las distribuciones de intensidad de iluminación, por el método ya indicado en la parte 3 de esta memoria. La finalidad de este experimento era confirmar los valores límites de  $I_m$  para la zona exponencial que se indican en la tabla 4.34, ya que estos valores habían sido calculados utilizando la ecuación [4.9] que fué obtenida a partir de medidas de intensidad de iluminación en cultivos preparados por dilución de una suspensión de células en el periodo lineal de crecimiento.

Los resultados obtenidos en este experimento se representan en la figura 4.32, que confirma lo ya indicado a partir de la tabla 4.34, es decir, que la variación de la intensidad media de iluminación durante la zona exponencial de crecimiento es muy apreciable.

En el experimento F se cambia bruscamente la intensidad de iluminación incidente durante la zona exponencial de crecimiento de 290 a 780 y a 1170 lux respectivamente. Los resultados de este experimento se han representado en la figura 4.33 en la que se observa que la velocidad específica de crecimiento cambia al hacerlo la intensidad de iluminación incidente. El primer salto se observa claramente, no tanto el segundo pe-

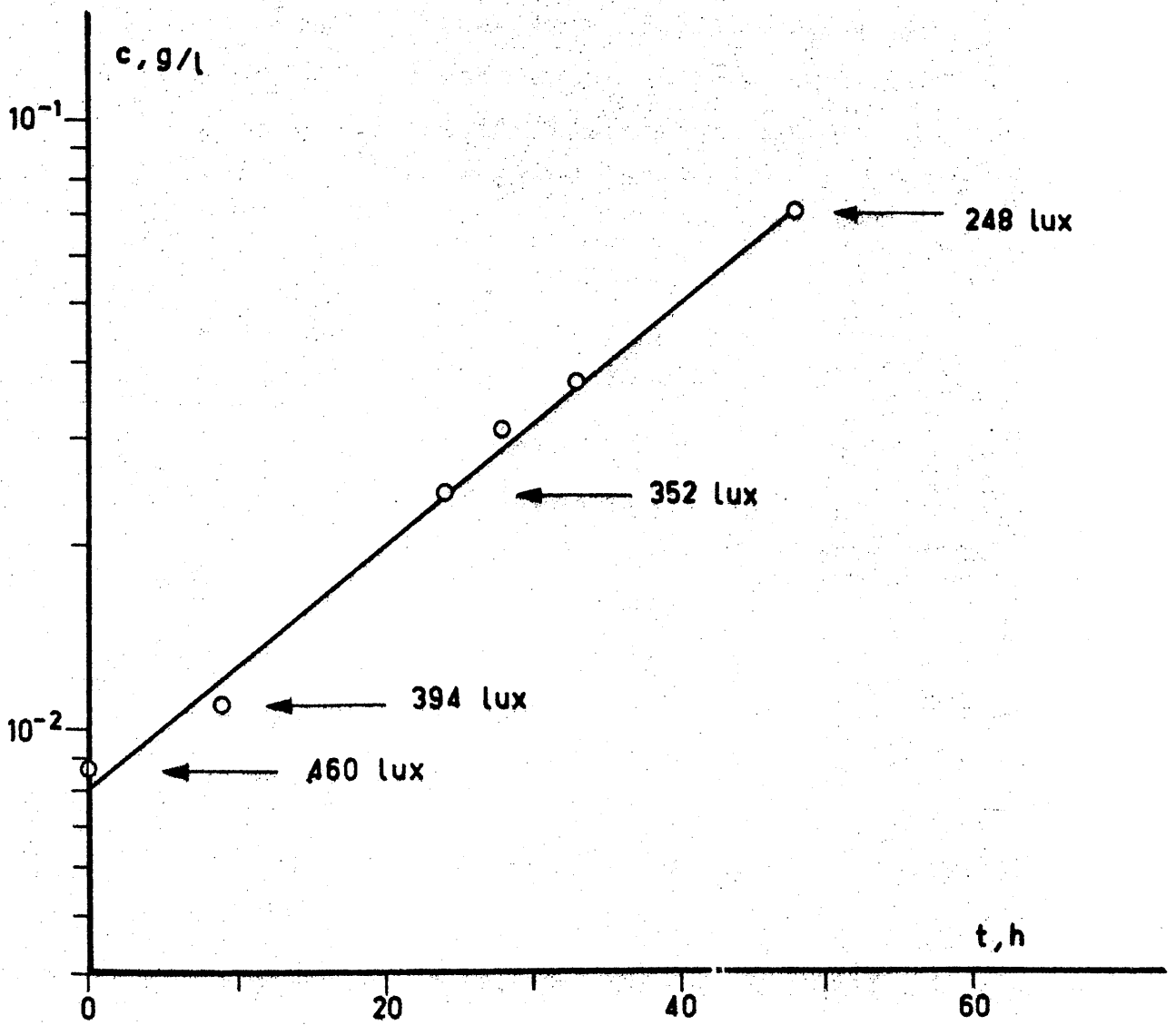


FIG 4.32

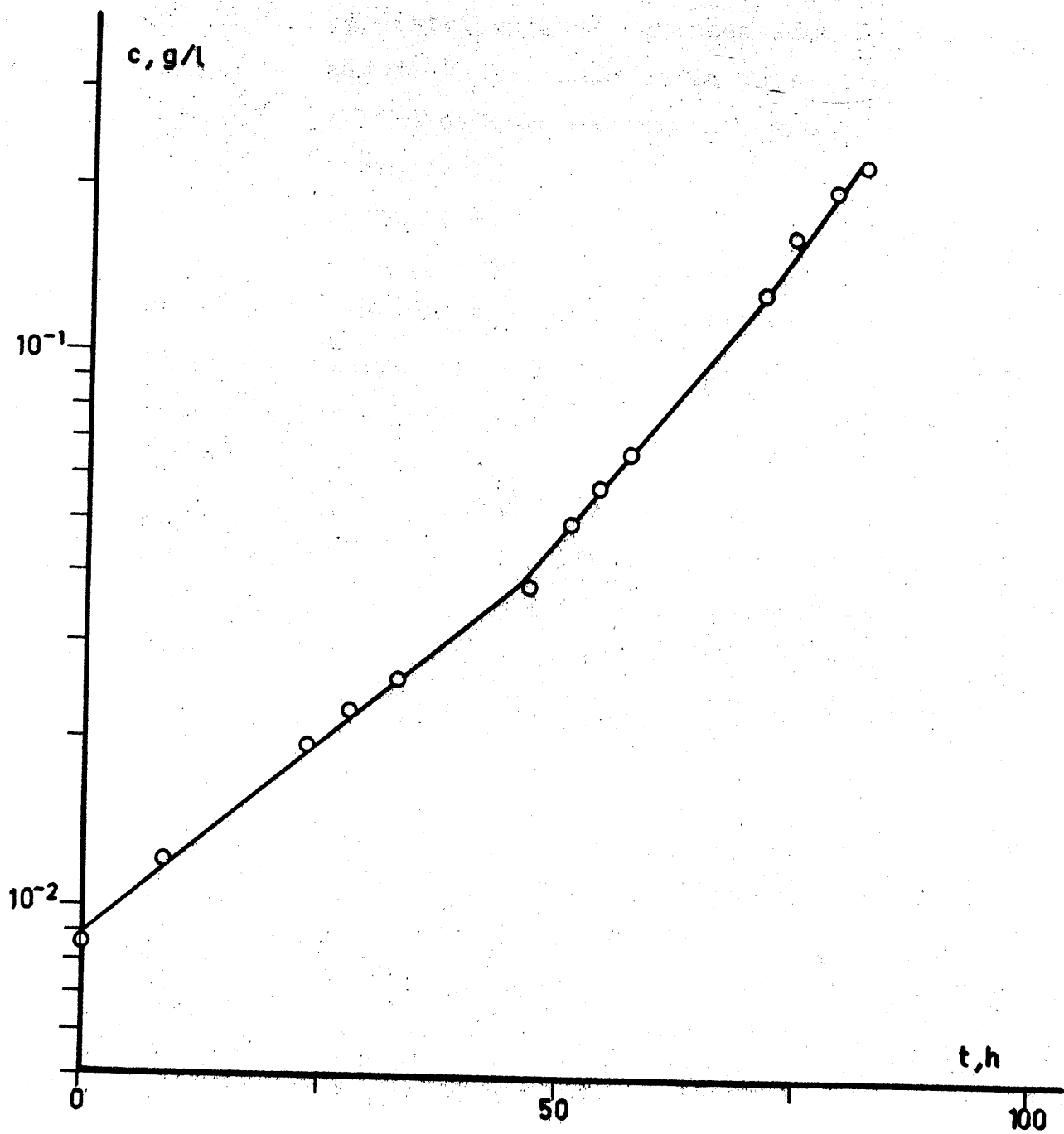


FIG 4.33

ro debe tenerse en cuenta que los valores de la intensidad incidente son ya del orden de  $I_s$ .

Estos resultados no son consistentes con la explicación de Tamiya de la zona exponencial de crecimiento que se observa generalmente en los cultivos discontinuos a pequeñas intensidades de iluminación, menores que  $I_s$ . Según este autor la zona exponencial es debida a que en esa región las sombras mútuas entre las células son despreciables y la intensidad de iluminación puede considerarse constante.

En nuestra opinión la existencia de esta zona a valores de  $I_0 < I_s$  es debida a la respuesta de las células a una disminución lenta de la intensidad de iluminación sintetizando más clorofila, sin embargo esta respuesta no puede darse ante un cambio brusco como se observa en el experimento F.

En efecto, las medidas del contenido en clorofila realizadas en muchos de los experimentos cinéticos ya comentados, aunque con una gran dispersión, ponen de manifiesto que el contenido en clorofila de las células expresado en mg por g de peso seco aumenta durante la fase exponencial de crecimiento para permanecer posteriormente practicamente constante, como se observa en la tabla 4.71 en la que se indican los resultados obtenidos para la zona exponencial de los experimento



TABLA 4.71

## Contenido en clorofila

| Experimento C - 1 |                  | Experimento B - 5 |                  |
|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| <u>t, h</u>       | <u>CHL, mg/g</u> | <u>t, h</u>       | <u>CHL, mg/g</u> |
| 0,0               | 40,1             | 0,0               | 27,1             |
| 24,0              | 66,6             | 24,0              | 33,3             |
| 49,5              | 77,8             | 48,0              | 43,1             |
| 72,0              | 73,9             | 72,0              | 63,6             |
| 96,0              | 105,0            |                   |                  |
| 107,0             | 96,1             |                   |                  |

tos C - 1 y B - 5 a título de ejemplo.

Estos resultados son consistentes con los de Myers y Graham (1959) que encuentran que el contenido en clorofila es de manera aproximada inversamente-proporcional a la intensidad de iluminación y con los de Nielsen y Jorgensen (1968) ya comentados en la introducción de esta memoria.

ciencia de la vida y de la salud

El presente informe se refiere a:

1. El desarrollo de la ciencia de la vida y de la salud

2. El desarrollo de la ciencia de la vida y de la salud

3. El desarrollo de la ciencia de la vida y de la salud

4. El desarrollo de la ciencia de la vida y de la salud

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

El presente informe se refiere a:

## 5. CONCLUSIONES

00000000000000000000

Como resultado de la presente investigación se han llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- La atenuación de la intensidad de iluminación, procedente de las lámparas fluorescentes PLANT-GRO, a través del medio de cultivo se ajusta a la ley de Beer - en función de la concentración celular. El coeficiente de extinción ha resultado ser 2,42 l/g cm, que coincide aceptablemente con los valores obtenidos a partir del espectro de emisión de las lámparas empleadas y los valores monocromáticos de este coeficiente determinados por Myers (1953) y Tamiya (1953b).
- 2.- Se ha determinado experimentalmente la distribución espacial de intensidades de iluminación en los vasos de cultivo utilizados, a varias intensidades de iluminación incidentes y varias concentraciones de biomasa. A partir de estas distribuciones espaciales se ha calculado la intensidad media de iluminación en cada caso, encontrándose que se ajustan aceptablemente a la ecuación.

$$I_m = \frac{I_o}{\alpha c} ( 1 - e^{-\alpha c} )$$

deducida por aplicación de la ley de Beer a una cámara de cultivo de sección rectangular iluminada por una de sus caras.

En la ecuación anterior  $\alpha$  representa el producto del coeficiente de extinción por una longitud característica de la geometría del vaso de cultivo y del sistema de iluminación. En nuestro caso, vasos de cultivo cilíndricos (diámetro interior 7,5 cm) iluminados por un lado en dirección normal a su eje, el valor de  $\alpha$  ha resultado ser de 14,7 l/g, que teniendo en cuenta el coeficiente de extinción indicado en la conclusión anterior, da para la longitud característica el valor de 6 cm.

- 3.- Experimentos realizados variando la velocidad de agitación del medio de cultivo han puesto de manifiesto que, en los intervalos utilizados en esta investigación, la mezcla puede considerarse perfecta y la velocidad específica de crecimiento es función de la intensidad media de iluminación

$$\bar{\mu} = \mu (I_m)$$

y no de su distribución espacial.

A la misma conclusión se llega considerando los resultados indicados en la bibliografía para iluminación intermitente, cuando los tiempos de flash son muy pequeños, del orden de 1 ms. La ecuación anterior implica, teniendo en cuenta el fenómeno de la saturación de luz, que la turbulencia o la intermiten-

cia (en este sentido ambas son equivalentes) permite un mayor aprovechamiento de la energía luminosa, cuando la intensidad de iluminación incidente es superior a la intensidad de saturación.

- 4.- El estudio experimental de la influencia de la intensidad de iluminación, en el intervalo de 250 a 2500 lux, sobre la cinética de crecimiento de *Chlorella Pyrenoidosa* a 30°C, partiendo de concentraciones iniciales de biomasa menores de 0,01 g/l (inóculo), pone de manifiesto que en todos los casos se observa una primera zona de crecimiento exponencial seguida de otra de crecimiento lineal cuando la velocidad de aporte de energía radiante pasa a controlar la velocidad del proceso.
- 5.- La velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , durante la zona exponencial parece variar linealmente con la intensidad incidente,  $I_0$ , hasta aproximadamente unos 1000 lux, para a continuación observarse un efecto de saturación.

Para relacionar estas dos magnitudes se han ensayado las tres ecuaciones recogidas por Oorschot (1955) y la propuesta por Steele (1977), encontrándose que tanto nuestros resultados como los de Myers y col. (1946 y 1954), obtenidos en cultivo continuo, se ajustan mejor a la ecuación exponencial



$$\mu = \mu_m \left( 1 - e^{-\frac{I}{I_s}} \right)$$

En esta investigación, los valores de los parámetros encontrados son

$$\mu_m = 0,099 \text{ h}^{-1} \quad I_s = 926 \text{ lux}$$

para la temperatura de 30°C.

6.- La velocidad de crecimiento,  $p$ , durante la zona lineal-varia linealmente con la intensidad de iluminación, como era de esperar ya que en esta zona la velocidad de crecimiento está controlada por la velocidad de aporte de la energía luminosa y practicamente toda la radiación incidente es absorbida en los vasos de cultivo. La relación encontrada a 30°C es

$$p = 8,45 \cdot 10^{-6} I_o \quad \text{g/l h}$$

con  $I_o$  expresada en lux

7.- El estudio experimental de la influencia de la temperatura, en el intervalo de 25 a 35°C, pone de manifiesto que los valores de  $\mu_m$  y de  $p$  pasan por un máximo alrededor de 30°C y disminuyen tanto al aumentar como al disminuir la temperatura.

No obstante, a las temperaturas de 25 y 35°C, la velocidad específica de crecimiento correspondiente a la zona exponencial sigue ajustándose a la función de la intensidad de iluminación ya indicada en la conclusión 5, y la velocidad de crecimiento en la zona lineal sigue siendo proporcional a  $I_0$ .

- 8.- A la temperatura de 18°C, la velocidad específica de crecimiento correspondiente a la zona exponencial pasa por un máximo al aumentar la intensidad de iluminación. Este comportamiento ha sido ya observado por Tammi y col. (1953b) a 7°C y por Sorokin y Krauss (1962) a 20°C.

En general, para este alga y temperaturas superiores a 25°C el valor de  $\mu_m$  se mantiene prácticamente constante desde  $I_s$  hasta intensidades de iluminación próximas a la de la luz del sol sobre la superficie de la tierra.

- 9.- Sobre la base del mecanismo simplificado propuesto por Lumry y Rieske (1959), se ha desarrollado un modelo para explicar la ecuación exponencial que relaciona la velocidad específica de crecimiento con la intensidad de iluminación.

La aplicación de este modelo a los resultados de iluminación intermitente de Phillips y

Myers (1954b), suponiendo una concentración de pigmentos fotosintéticos activados, función de la intensidad media de iluminación durante los periodos de flash y una disminución de la concentración de éstos con una cinética de primer orden durante los periodos de oscuridad, ajusta aceptablemente los datos cuantitativos de estos autores y explica la influencia de los parámetros de la iluminación intermitente descrita por Kok (1953).

10.- Los resultados obtenidos en esta investigación ponen de manifiesto que para intensidades de iluminación incidentes inferiores a  $I_s$  se observa la existencia de una zona exponencial de crecimiento relativamente amplia, a pesar de que la intensidad media de iluminación cambia apreciablemente a lo largo de la misma. Las medidas del contenido en clorofila por unidad de peso seco y los resultados obtenidos en experimentos en los que se provocan cambios bruscos de la intensidad media de iluminación durante la zona exponencial, indican que las células son capaces de adaptar, en cierto grado, su contenido en clorofila a las variaciones lentas de la intensidad de iluminación.

Es decir, en los casos comentados en esta conclusión la existencia de la zona exponencial parece ser debida a una compensación de dos efectos: - disminución de  $I_m$  y aumento del número de pigmentos -

fotosintéticos por célula aptos para absorber energía radiante.



## 6. NOMENCLATURA

SECRET

- a - concentración de pigmentos fotosintéticos, mg/g
- a<sup>o</sup> - concentración de pigmentos fotosintéticos no activados, mg/g
- a\* - concentración de pigmentos fotosintéticos activados, mg/g
- A - área interfacial, cm<sup>2</sup>
- A<sub>i</sub> - área asignada a cada fotocélula, cm<sup>2</sup>
- A<sub>t</sub> - área de la sección del vaso de cultivo, cm<sup>2</sup>
- A<sup>o</sup> - molécula de pigmento fotosintético no activado
- A\* - molécula de pigmento fotosintético activado
- c - concentración de biomasa, g/l
- c<sub>A</sub> - concentración de biomasa en el vaso A, g/l
- c<sub>B</sub> - concentración de biomasa en el vaso B, g/l
- c<sub>C</sub> - concentración de biomasa en el vaso C, g/l
- c<sub>m</sub> - concentración de biomasa media de los tres vasos, g/l
- c<sub>o</sub> - concentración de biomasa a t=0, g/l
- c<sub>x</sub> - concentración de biomasa correspondiente al paso de la zona exponencial a lineal, g/l
- c<sub>a</sub> - concentración de clorofila a, g/l
- c<sub>b</sub> - concentración de clorofila b, g/l
- c\* - solubilidad del CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo, mol-g/l
- CHL - contenido en clorofila, g/l, mg/g
- D - velocidad de dilución, h<sup>-1</sup>
- D - difusividad del CO<sub>2</sub>, cm<sup>2</sup>/s
- D.O - densidad óptica
- F - caudal alimentación de medio de cultivo fresco, l/h
- g - aceleración de la gravedad, cm/s<sup>2</sup>



- $\Delta h$  - diferencia de altura manométrica, mm  
 $I_b$  - intensidad de iluminación mínima correspondiente al metabolismo basal, lux  
 $I_f$  - intensidad de iluminación transmitida, lux  
 $I_h$  - intensidades medias por secciones, lux  
 $I_i$  - intensidades puntuales, lux  
 $I_m$  - intensidad de iluminación media, lux  
 $I_o$  - intensidad de iluminación incidente con el medio de cultivo sin células, lux  
 $I(x)$  - intensidad de iluminación existente a una distancia  $x$  a partir de la superficie por la que entra la luz, lux  
 $(I_o)_m$  - intensidad de iluminación media de las incidentes en los tres vasos, lux  
 $(I_m)_{c_o}$  - intensidad media de iluminación correspondiente a una concentración de biomasa  $c_o$ , lux  
 $(I_m)_{c_x}$  - intensidad media de iluminación correspondiente a una concentración de biomasa  $c_x$ , lux  
 $k_a$  - coeficiente de extinción de las células, l/g cm  
 $k_l$  - coeficiente de transferencia de materia, cm/s  
 $k_m$  - coeficiente de extinción del líquido de cultivo, l/g cm  
 $L$  - espesor total de la cámara, cm  
 $N_{CO_2}$  - velocidad de transferencia del  $CO_2$ , mol-g/h  
 $P$  - velocidad de crecimiento lineal, g/l h  
 $Q$  - caudal volumétrico de la fase gaseosa, cc/min  
 $R_A$  - vaso de cultivo A  
 $R_B$  - vaso de cultivo B

- $R_C$  - vaso de cultivo C  
 $t$  - tiempo, h  
 $t_f$  - tiempo de flash, h  
 $t_d$  - tiempo de oscuridad, h  
 $V$  - voltaje de las lámparas, v  
 $V_C$  - volumen del medio de cultivo, l

Letras griegas

- $\alpha$  - pendiente en el origen de las curvas de irradiación  
 , (lux h)<sup>-1</sup>  
 $\alpha$  - producto  $k_a L$ , l/g  
 $\lambda$  - longitud de onda, Å, nm  
 $\mu$  - velocidad específica de crecimiento, h<sup>-1</sup>  
 $\mu_m$  - velocidad específica de crecimiento máxima, h<sup>-1</sup>  
 $\bar{\mu}$  - velocidad específica de crecimiento media, h<sup>-1</sup>  
 $\mu(I)$  - velocidad específica de crecimiento correspondien-  
 te a la intensidad de iluminación I, h<sup>-1</sup>  
 $\nu$  - viscosidad cinemática del medio de cultivo, cm<sup>2</sup>/s  
 $\Omega$  - resistencia fotocélulas, ohms

- volume de produção de 100 toneladas  
- tempo de fabricação de 10 dias  
- custo de produção de 10 milhões de reais  
- lucro líquido de 2 milhões de reais  
- ponto de equilíbrio em 50 toneladas  
- margem de contribuição de 20%

- ponto de equilíbrio em 50 toneladas  
- margem de contribuição de 20%  
- custo variável unitário de 80 mil reais  
- preço de venda unitário de 100 mil reais  
- custo fixo total de 2 milhões de reais  
- custo fixo variável de 1 milhão de reais  
- custo fixo unitário de 20 mil reais  
- custo variável unitário de 80 mil reais

- custo variável unitário de 80 mil reais  
- preço de venda unitário de 100 mil reais  
- custo fixo total de 2 milhões de reais  
- custo fixo variável de 1 milhão de reais  
- custo fixo unitário de 20 mil reais  
- custo variável unitário de 80 mil reais  
- ponto de equilíbrio em 50 toneladas  
- margem de contribuição de 20%

## 7. BIBLIOGRAFIA

APPENDIX 1

- Albertsson P.A ; Exp. Cell. Res. 73 , 161 (1972)
- Algeus S ; Physiol. Plantarum 4 , 742 (1951)
- Arnon D.I ; Plant Physiology 24 , 1 (1949)
- Beale S.I y Appleman D ; Pl. Physiol. 47 , 230 (1971)
- Belyanin V.N y Kovrov B.G ; Dokl. Akad. Nauk. 179 , 14  
63 (1968)
- Bhattacharyya G.S, Roy G.S y Dutta B.K ; Thecnology 8 ,  
119 (1971)
- Brandt A.B, Antoninova M.V, Kiseleva M.I y Sharipov K.A  
; Biofizika 20 , 479 (1975)
- Briggs G.E y Whittingham C.P ; New Phytologist 51 , 236  
(1952)
- Burlew J.S ; "Current status of the large-scale culture  
of algae" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot -  
Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ. 600 ca  
pit. 1 pp. 3-23 (1953)
- Calderbank P.H y Moo-Young M.B ; "Gas-Liquid Reactions"  
Danckwerts, McGraw-Hill (1970)

- Costa Novella E ; "Los Organismos Unicelulares como Fuente de Proteinas" Instituto de España, Real Academia Nacional de Medicina. Madrid (1974)
- Dam R, Lee L, Fry P.C y Fox H ; J. Nutrit. 86 , 376 (1965)
- Davis E.A, Dedrick C.S, French C.S, Milner H.W, Myers J, Smith J.H.C y Spoehr H.A ; "Laboratory experiments on Chlorella culture at the Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology" En: Algal Culture - From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ. 600 Capit. 9 pp. 105-153 (1953)
- Emerson R y Green L ; Plant Physiol. 13 , 157 (1938)
- Emerson R y Lewis C.M ; Amer. Jour. Bot. 30 , 165 (1943)
- Endo H y Shirota M ; Proc. Int. Ferment. Symp. 4 , 533 (1972)
- Fogg G.E ; Rep. Progr. Appl. Chem. 42 , 701 (1957)
- Fogg G.E y Collyer D.M ; "The accumulation of lipides by algae" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ. 600 Capit. 12 pp. 177-181 (1953)

- Fogg G.E, Smith W.E.E y Miller J.D.A ; J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1 , 59 (1959)
- Follmann H, Markl H y Vortmeyer D ; Ger. Chem. Eng. 1 , 335 (1978)
- Galloway R.A, Rolfe I y Soeder C.J ; Arch. Hydrobiol. 73 , 1 (1974)
- Geoghegan M.J ; "Experiments with Chlorella at Jealott's Hill" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ. 600 Capit. 13 pp. 182-189 (1953)
- Govindjee R y Rabinowitch E ; Biochim. Biophys. Acta - 162 , 539 (1968)
- Haldall P y French C.S ; Pl. Physiol. 33 , 249 (1958)
- Hase E y Morimura Y ; Methods Enzymol. 23 , 78 (1971)
- Holland L.L ; Diss. Abstr. Int. 30 , 625 (1969)
- Javornicky P, Soeder C.J, Komarek J y Lhotsky O ; Arch. Hydrobiol. 41 , 450 (1973)
- Kok B ; "Experiments on photosynthesis by Chlorella in flashing light" En: Algal Culture From Laboratory To -



- Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ. 600 Capit.6 pp. 63-75 (1953)
- Krauss R.W ; "Inorganic nutrition of algae" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ.600 Capit.8 pp. 85-102 (1953)
  - Latzko E y Gibbs M ; Pl. Physiol. 44 , 295 (1969)
  - Lumry R y Rieske J.S ; Plant. Physiol. 34 , 301 (1959)
  - Mackinney G ; J. Biol. Chem. 140 , 315 (1941)
  - Maddux W.S y Jones R.F ; Limnol. Oceanogr. 9 , 79 (1964)
  - Matthern R.O, Kostick J.A y Okada I ; Biotechnol. Bioeng. 11 , 863 (1969)
  - McCombie A.M ; J. Fish. Res. Bd. Can. 17 , 871 (1960)
  - Milner H.W ; "The chemical composition of algae" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Washington Publ.600 Capit.19 pp.285-302 (1953)
  - Monod J ; Ann. Inst. Past. 79 , 390 (1950)

- Myers J ; Jour. Gen. Physiol. 29 , 429 (1946)
- Myers J ; "Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. - Washington Publ.600 Capit.4 pp. 37-54 (1953)
- Myers J y Clark L.B ; J. Gen. Physiol. 28 ,103 (1944)
- Myers J y Graham J.R ; Plant. Physiol. 34 , 345 (1959)
- Nielsen E.S ; Physiol. Plantarum 8 , 317 (1955)
- Nielsen E.S, Hansen V.K y Jorgensen E.G ; Physiologia - Pl. 15 , 505 (1962)
- Nielsen E.S y Jorgensen E.G ; Physiologia Pl. 21 , 401 (1968)
- Nihei T, Sasa T, Miyachi S, Suzuki K y Tamiya H ; Archiv. fur Mikrobiol. 21 , 156 (1954)
- Novick A y Szilard L ; Science 112 , 715 (1950)
- Oorschot J.L.P van ; Mededel. Landbouwhogeschool te Wageningen 55 , 225 (1955)
- Osmund H.H ; Cryobiology 4 , 17 (1967)

- Osterlind S ; *Physiol Plantarum* 1 , 170 (1948)
- Osterlind S ; *Symbolae Bot. Upsal.* 10 , 1 (1949)
- Osterlind S ; *Physiol. Plantarum* 3 , 353 (1950)
- Pearsall W.H y Bengry R.P ; *Ann. Bot.* 4 , 485 (1940)
- Phillips J.N y Myers J ; *Plant Physiol.* 29 , 148 (19--54a)
- Phillips J.N y Myers J ; *Plant Physiol.* 29 , 152 (19--54b)
- Pipes W.O y Koutsoyannis S.P ; *Appl. Microbiol.* 1 , 1 (1962)
- Rabe A.E y Benoit R.J ; *Biotech. and Bioeng.* 4 , 377 (1962)
- Rainbow C y Rose A.H ; "Microbial food" En: *Biochemistry of Industrial Microorganisms* Academic Press New York-London pp. 34-67 (1963)
- Reisner G.S y Thompson J.F ; *Plant Physiol.* 31 , 181 - (1956)
- Rieske J.S, Lumry R y Spikes J.D ; *Plant Physiol.* 34 ,

293 (1949)

- Rodriguez-López M ; Nature 203 , 666 (1964)
- Rodriguez-López M ; J. Gen. Microbiol. 43 , 139 (1966)
- Roger M y Villermaux J ; Aiche J. 21 , 1207 (1975)
- Scott G.T ; J. Cellular Comp. Physiol. 21 , 327 (1943)
- Shuler R.L y Affens W.A ; Appl. Microbiol. 19 , 76 (1970)
- Simmer J ; A. Rep. Lab. Algol. , 127 (1969)
- Sorokin C ; Archiv. fur Mikrobiol. 37 , 151 (1960a)
- Sorokin C ; Biochim. Biophys. Acta 38 , 197 (1960b)
- Sorokin C ; Plant Cell. Physiol. 12 , 979 (1971)
- Sorokin C y Krauss R.W ; Plant Physiol. 33 , 109 (1958)
- Sorokin C Y Krauss R.W ; Pl. Physiol. 37 , 37 (1962)
- Sorokin C y Krauss R.W ; Amer. J. Bot. 52 , 331 (1965)
- Spoehr H.A y Milner H.W ; Plant Physiol. 24 , 120 (1949)

- Starr R.C ; Methods Enzymol. 23 , 29 (1971)
- Steele J.H ; "Microbial kinetics and dynamics" En: Chemical Reactor Theory Lapidus L, Amundson N,R Prentice-Hall Englewood Cliffs Capit.7 pp. 405-483 (1977)
- Stewart W.D.P ; Algal Phisiology and Biochemistry - Blackwell Scientific Oxford (1974)
- Tamiya H ; Botan. Mag. 64 , 167 (1951)
- Tamiya H, Shibata K, Sasa T, Iwamura T y Morimura Y ; "E--ffect of diurnally intermittent illumination on the - growth and some cellular characteristics of Chlorella" En: Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant J.S - Burlew Carnegie Inst. Washington Publ.600 Capit.7 pp. 76-84 (1953a)
- Tamiya H, Hase E, Shibata K, Mituya A, Iwamura T, Nihei T y Sasa T ; "Kinetics of growth of Chlorella, with special reference to its dependence on quantity of available - light and on temperature" En: Algal Culture From Labo-ratory To Pilot Plant J.S Burlew Carnegie Inst. Publ. 600 Washington Capit.16 pp. 204-232 (1953b)
- Warburg O ; Die Naturwissenschaften 39 , 337 (1952)
- Wentworth W.E ; Journal of Chemical Education 42 , 96-

103 y 162-167 (1965)

- Winokur M ; Amer. Jour. Bot. 35 , 118 (1948)
- Wren J.D y Harshman R.C ; Aiche Symp. Ser. 68 , 238 -  
(1972)
- Zarnowski J ; Acta Hydrobiol. 14 , 215 (1972)