

**EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE SONIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA EN LA MICROALGA *SCENEDESMUS SP***

**CLARA JOHANA AMADO PACHON
KAREN TATIANA HIGUERA MARTINEZ**

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO. COLOMBIA.
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS
PROGRAMAS INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL.
FACULTAD CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA.
BOGOTÁ D.C
2019**

**EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE SONIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA EN LA MICROALGA *SCENEDESMUS SP***

**CLARA JOHANA AMADO PACHON
KAREN TATIANA HIGUERA MARTINEZ**

**Trabajo de Formación para la Investigación presentado para optar al título de
INGENIEROS QUÍMICOS**

DIRECTORA: YINETH PIÑEROS CASTRO

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO. COLOMBIA.
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE PROCESOS Y SISTEMAS
PROGRAMAS INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL.
FACULTAD CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA.
BOGOTÁ D.C
2019**

DEDICATORIA

Este proyecto realizado para lograr el título como Ingenieras Químicas, de acuerdo a la formación como investigación, se lo dedicamos a nuestros padres, que fueron de gran apoyo durante todo el proceso, brindándonos lo necesario para culminarlo, además de ser una gran motivación en nuestras vidas para ser excelentes profesionales y personas.

Finalmente lo dedicamos a todas las personas que conocieron este proceso, a nuestras familias, quienes nos acompañaron y fueron parte fundamental para lograr superar aquellos obstáculos que se presentaban.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a nuestras familias quienes nos brindaron lo necesario en todos los aspectos para finalizar el proceso. Agradecemos a la Universidad Jorge Tadeo Lozano, por aportarnos el conocimiento y todo lo útil para no tener dificultades durante el trabajo. Agradecemos a nuestra directora de tesis Yineth Piñeros Castro por apoyarnos en todo lo requerido y aportarnos grandes lecciones como profesionales, debido a su gran conocimiento.

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN.....	8
METODOLOGÍA.....	10
Cepa de Microalga <i>Scenedesmus Sp</i>	10
Sonido	11
Determinación de Crecimiento de Biomasa en el tiempo.....	12
Determinación de concentración de Biomasa Seca.....	13
Análisis Bioquímicos.....	13
Análisis Estadísticos.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Concentración Biomasa Seca	14
Crecimiento de Biomasa en el tiempo	17
Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides.....	21
Cuantificación de proteínas	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS	27

RESUMEN

La microalga *Scenedesmus Sp* tiene propiedades de gran importancia como su alto contenido proteico, el cual constituye cerca del 45% de su composición de biomasa en peso seco; también contiene pigmentos de alto interés industrial como clorofila a, clorofila b y carotenoides, los cuales son utilizados en el área de alimentos y cosmetología, por lo cual se buscan nuevas alternativas para minimizar los costos y optimizar el proceso en el que se obtengan mejores resultados, con respecto al crecimiento de biomasa seca y compuestos de interés. En este trabajo se evaluó el efecto del sonido a tres diferentes frecuencias (3300Hz, 2200Hz y 1100Hz), en cultivos de *Scenedesmus sp*. En medio Bold Basal, los cuales fueron expuestos a diferentes niveles de sonido por 3 horas diarias durante 14 días, con aeración constante. Como resultados se obtuvo efecto significativo de la frecuencia del sonido sobre la producción de biomasa, obteniendo un promedio de 0,68g/L para el ensayo del control, muy similar a la frecuencia de 1100Hz. La mayor producción se obtuvo a frecuencias de 2200Hz y 3300Hz con un promedio de biomasa seca de 0,81g/L. Evaluando el crecimiento de biomasa el ensayo con mayor concentración fue el trabajado con la frecuencia de 3300Hz estando al final 6% por encima del control con una concentración de 0,66g/L. Relacionado con los pigmentos por peso de biomasa, se obtuvieron valores inferiores a las frecuencias de 2200 y 3300 Hz con un promedio de concentración de 4,95mg/g de biomasa seca, mientras que a una frecuencia de 1100Hz se lograron 6,25mg/g de biomasa seca, estando 9,6% por encima del control que obtuvo una concentración de biomasa de 5,7mg/g de biomasa seca.

La mejor frecuencia se evalúa teniendo en cuenta la aplicación en la que se desee usar, de acuerdo a lo que se determino la que mejores resultados obtuvo fue la frecuencia a 2200Hz.

SUMMARY

The microalgae *Scenedesmus* has properties of great importance such as its high protein content, which constitutes about 45% of its dry weight biomass composition; It also contains pigments of high industrial interest such as chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, which are used in the area of food and cosmetology, so new alternatives are sought to minimize costs and optimize the process in which better results are obtained, with respect to the growth of dry biomass and compounds of interest. In this work, the effect of sound at three different frequencies (3300Hz, 2200Hz and 1100Hz), in crops of *Scenedesmus sp.* in Bold Basal medium, which were exposed to different sound levels for 3 hours a day for 14 days, with constant aeration. As a result, a significant effect of the sound frequency on biomass production was obtained, obtaining an average of 0.68g / L for the control test, very similar to the 1100Hz frequency. The highest production was obtained at frequencies of 2200Hz and 3300Hz with an average of dry biomass of 0.81g / L. Evaluating the biomass growth, the test with the highest concentration was the one with the frequency of 3300Hz, being at the end 6% above the control with a concentration of 0.66g / L. Related to the pigments by weight of biomass, values lower than the frequencies of 2200 and 3300 Hz were obtained with an average concentration of 4.95mg / g of dry biomass, while at a

frequency of 1100Hz 6.25mg / g were achieved of dry biomass, being 9.6% above the control that obtained a biomass concentration of 5.7mg / g of dry biomass. The best frequency is evaluated taking into account the application in which you want to use, according to what was determined the best result was the frequency at 2200Hz.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas se describen como organismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares, las cuales no presentan una morfología compleja y su tamaño varía de 3 a 80 μm (Scharff, 2015). Están compuestas por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Los ácidos grasos se encuentran en las membranas, en los productos de almacenamiento y metabolitos, (Tejada, et al. 2015). Para el desarrollo del estudio se utilizó la cepa *Scenedesmus Sp.*, la cual consta de paredes celulares resistentes, compuestas por multicapas internas de celulosa y hemicelulosa y las externas por esporopollenina y politerpeno, además poseen una fuerte adaptabilidad ambiental. (Zhang. Et al. 2018).

Las microalgas son una fuente de vitaminas como A, B1, B2, C y E; nicotinato biotina; ácido fólico; ácido pantoténico; niacina; yodo; potasio, calcio y minerales (Sathasivam, Et al. 2017). La biomasa obtenida de éstos organismos puede ser usada en procedimientos de eliminación y reducción de agentes químicos tóxicos y metales pesados, con el fin de limpiar y purificar fuentes de agua (RATH, 2012), además se consideran una materia prima importante para la producción de biodiesel debido a su contenido de lípidos (Mubarak, 2019), también son la fuente

primaria en la elaboración de diversos productos, entre los que se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, ficotoxina, además son usadas con propósitos nutraceuticos y suplementos de alto valor proteico en nutrición humana y animal (Sathasivam, Et al. 2017).

Al tener en cuenta la composición y los usos que tienen las microalgas, se puede ver la importancia de la búsqueda de factores que contribuyan con el mejoramiento de los cultivos para elevar la concentración de biomasa microalgal. Por ejemplo, se ha evaluado el efecto del sonido audible en el crecimiento y la productividad de las microalgas de la cepa *Haematococcus pluvialis*, obteniendo resultados positivos en la concentración de biomasa en los cultivos tratados con música (Christwardana, Et al. 2017). También se realizó un estudio en el cual se buscaba promover el crecimiento de células de microalgas examinando el efecto de las ondas de sonido con diferentes frecuencias para estimular la productividad de la biomasa de la cepa, *Picochlorum oklahomensis* obteniendo al tratar el cultivo con una frecuencia de 2200 Hz una mayor concentración de biomasa que con las frecuencias de 1100 Hz y 3300 Hz, lo que indica que el estudio del sonido como estímulo para producción y crecimiento de biomasa microalgal representa una posibilidad de industrializar la producción de microalgas (Cai, 2016).

Diversos autores han buscado alternativas en las cuales el nivel de concentración de biomasa aumente, por ejemplo se ha evaluado la influencia de las fuentes de nitrógeno sobre la producción de biomasa en la microalga *Scenedesmus bijugatus* obteniendo como resultado que la concentración de nitrógeno para una producción de biomasa óptima se debe encontrar entre 5 y 10 mM (Arumugam et al., 2013).

También se ha evaluado el efecto de la intensidad de la luz sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos en la microalga *Scenedesmus Sp* bajo limitaciones de nitrógeno, para lo cual se analizaron tres niveles de intensidad de luz (50, 250, 400 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Liu et al., 2012).

El objetivo principal de este estudio será evaluar el efecto del sonido en diferentes frecuencias (1100 Hz, 2200 Hz y 3300 Hz) en el crecimiento, producción de biomasa y metabolitos de la cepa de microalga *Scenedesmus Sp*.

METODOLOGÍA

Cepa de Microalga *Scenedesmus Sp*

El cultivo de la microalga *Scenedesmus Sp*, en comparación a otros tratamientos este se considera de mediana complejidad con desarrollo en escala de plantas pilotos (Flotats Et al. 2011). Teniendo en cuenta que son organismos vivos estos tienen ciertas condiciones para tener un crecimiento óptimo y obtener resultados positivos, como la luz y los nutrientes, se realizó la preparación de un medio Bold's Basal Medium el cual aporta la cantidad de nutrientes necesaria para esta especie de microalga (Bischoft & Bold, 1963). El cultivo se realizó como sistema cerrado el cual a escala de laboratorio no tiene desventajas y se expone a menor probabilidad de contaminación (Pardo & Del Campo, 2007). El ensayo se realizó usando un Erlenmeyer de 1 litro como medio líquido en donde 600 mililitros de volumen total eran de cultivo, los cuales de éstos 60 mililitros eran inóculo el cual es el 10% del total, agitados mediante burbujeo constante con un sistema de

saturación en erlenmeyer de 500 mililitros con agua hasta 400 mililitros, durante todo el ensayo se tomaron datos de temperatura con un promedio de 20,2°C la cual favorece la respiración y la fotorrespiración (Dee et al., 2011) y una humedad de 29%, condiciones las cuales favorecerían al medio de cultivo, de acuerdo a las características de la microalga. (Zhang. Et al. 2018).

Sonido

Algunas investigaciones analizan que el estímulo audible directo puede causar efectos en el crecimiento de la microalga por este motivo como parte del montaje los cultivos que se trataban con sonido tenían en su parte interna un buzzer de 24V con un diámetro de 3cm y 1,5 cm de espesor con el fin de que la frecuencia llegara directa al cultivo de manera que cualquier sonido externo no afectara el ensayo, minimizando el error (Liu et al., 2012). Se desarrolló un sistema experimental de crecimiento en 3 ensayos los cuales se trataron con tres diferentes frecuencias (1.100Hz, 2.200Hz y 3,300Hz) por medio de un osciloscopio se midió las frecuencias, de manera que se garantizara que se emitía lo correspondiente, a partir de una programación realizada por medio del software Arduino se realizó el programa, para que se emitiera la frecuencia que fuera la deseada de acuerdo al respectivo ensayo, para esto se usó un RTC DS3231 el cual funcionaba como reloj para que el sonido llegara a los cultivos en el mismo horario siendo 3 horas diarias totales, durante todo el ensayo (Artero, 2013).

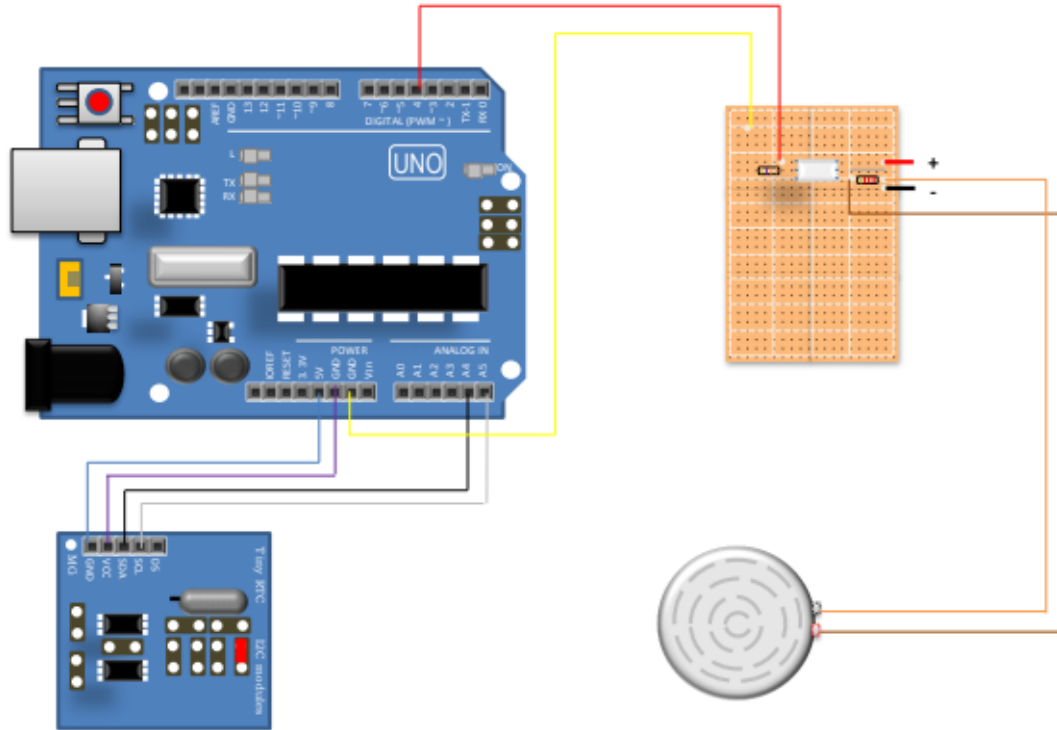


IMAGEN 1. MONTAJE ELECTRÓNICO DE SONIDO – ARDUINO.

Esta parte para el desarrollo del trabajo fue fundamental, debido a que permitía emitir la frecuencia de sonido por medio de una sola tarjeta arduino a seis buzzer, los cuales permitían que la frecuencia deseada llegara a cada cultivo.

Determinación de Crecimiento de Biomasa en el tiempo

Durante cada montaje se tomaba una muestra de 1ml de cada ensayo (incluyendo los de referencia) obteniendo un total de siete, la cual mediante un espectrofotómetro (uv-visible thermo scientific - evolution 300) se obtenía la concentración de la muestra, teniendo una curva de crecimiento de biomasa para

cada ensayo con respecto al tiempo, tomando como tiempo 0 el día que se realizó el cultivo de la cepa de *Scenedesmus Sp* (Andrade et al., 2009).

Determinación de concentración de Biomasa Seca

Para determinar la concentración de biomasa seca se realizó al final de cada uno de los ensayos analizados, para lo cual se centrifugó a 6000 RPM 50 ml de cultivo durante 20 minutos aproximadamente, hasta obtener toda la biomasa del volumen final de cultivo recolectado. Posteriormente se lleva la biomasa húmeda a un horno durante 24 horas a 60°C, obteniendo de esta manera la biomasa seca final de cada ensayo reportada en gramos de biomasa seca / volumen final de cultivo (gramos biomasa / litros de cultivo) (Andrade et al., 2009).

Análisis Bioquímicos

Para realizar los análisis bioquímicos se realizó una prueba para determinar la cantidad de proteínas por peso de biomasa que se obtuvo al final de cada ensayo, para cada prueba se necesitó 10 miligramos de biomasa seca, cada prueba se hizo por triplicado y a partir de una curva de calibración se obtuvo la concentración de proteína, realizado por triplicado para cada muestra mediante la absorbancia tomada a una longitud de 750nm. Para la cuantificación de clorofila a, clorofila b y carotenoides, se tomó una muestra de biomasa seca de 20 miligramos diluido en 5ml de acetona al 90%, el cual tras su respectivo proceso (24 horas a 4 °C) se

procedió a obtener la absorbancia a (453, 644, 663 y 750nm), mediante cálculos se obtuvo la cuantificación de cada propiedad (Loreto et al., 2013).

Análisis Estadísticos

Para evaluar las tendencias de la producción de biomasa seca obtenida en los cultivos con sonido y la obtenida en los controles en la realización de cada ensayo, al igual que el crecimiento de la misma, cantidad de pigmentos (clorofila a, clorofila b y carotenoides), se utilizó el análisis de varianza ANOVA de un factor, con el cual se contrasta una hipótesis nula de que todas las medias de la población analizada son iguales, con la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás, usando un nivel de significancia $< 0,05$ y para identificar las diferencias entre las comparaciones de las medias se usó la prueba estadística TUKEY (Driscoll, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración Biomasa Seca

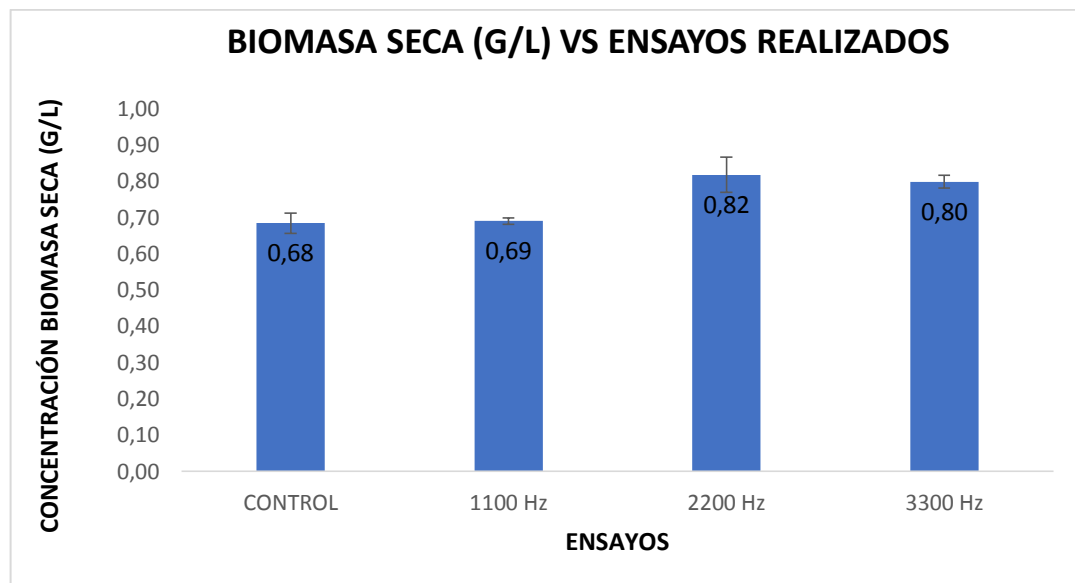
Al final de cada ensayo realizado se recolectó la biomasa seca para su posterior análisis, en la gráfica 1 se evidencia la comparación de las tres frecuencias de sonido analizadas 1100 Hz, 2200 Hz, 3300 Hz, con el respectivo control. Al realizar el análisis de varianza ANOVA, se pudo evidenciar que existe una diferencia significativa entre los valores de cada una de las muestras, por lo cual se puede se puede asumir que los datos obtenidos son relevantes al momento de

realizar dichas comparaciones para un resultado final. Con la prueba estadística TUKEY y su comparación de medias, se halló que existe una diferencia entre el control y las frecuencias de 2200 Hz y 3300 Hz, al igual que 1100 Hz difiere de los valores de biomasa de las muestras de cultivo de 2200 Hz y 3300 Hz. También se encontró que no existe una diferencia significativa entre los valores de la frecuencia analizada de 1100 Hz con el control, lo mismo sucede al comparar los datos de la frecuencia de 2200 Hz con la de 3300 Hz, pero se puede destacar que los valores más altos de biomasa seca final recolectada se hallaron al tratar los cultivos de microalga *Scenedesmus SP* con la frecuencia de 2200 Hz.

Los resultados de biomasa final obtenida en cada ensayo, se pueden comparar con diversos estudios realizados, en los cuales se tienen en cuenta diferentes estímulos. En la tabla 1 se encuentran dos de estos análisis; el primero evalúa el efecto de la intensidad lumínica en el crecimiento y producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus Sp*, al observar los resultados se puede apreciar que la concentración de biomasa en g/l es mayor al exponer la cepa a la luz como único factor de estímulo que al ser expuestas a frecuencias de sonido. El segundo estudio analiza el efecto del sonido en las mismas tres frecuencias que el estudio en cuestión, con variaciones en las condiciones del cultivo y la cepa de microalga, pero se puede apreciar que en las dos investigaciones con la frecuencia de 2200 Hz se obtienen los valores más altos de concentración de biomasa en g/L.

ESTÍMULO	MICROALGA	VOLUMEN DE CULTIVO (ML)	TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE BIOMASA (G/L) EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	REFERENCIA
Efectos de la intensidad de luz sobre el crecimiento y acumulación de lípidos en la Microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes intensidades de luz: 400 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 250 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 50 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$	3.88 3.62 2.28	(Liu, et al., 2012)
Efecto del sonido audible en el crecimiento de microalgas.	<i>Picochlorum Oklahomensis</i>	5000	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido: Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	1.6 1.75 2.15 1.76	(Cai, et al., 2013)
Efecto de frecuencia de sonido sobre la producción de biomasa	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido: Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	0,68 0,69 0,82 0,80	

TABLA 1. Comparación de resultados de biomasa seca final obtenida con diversos estímulos.

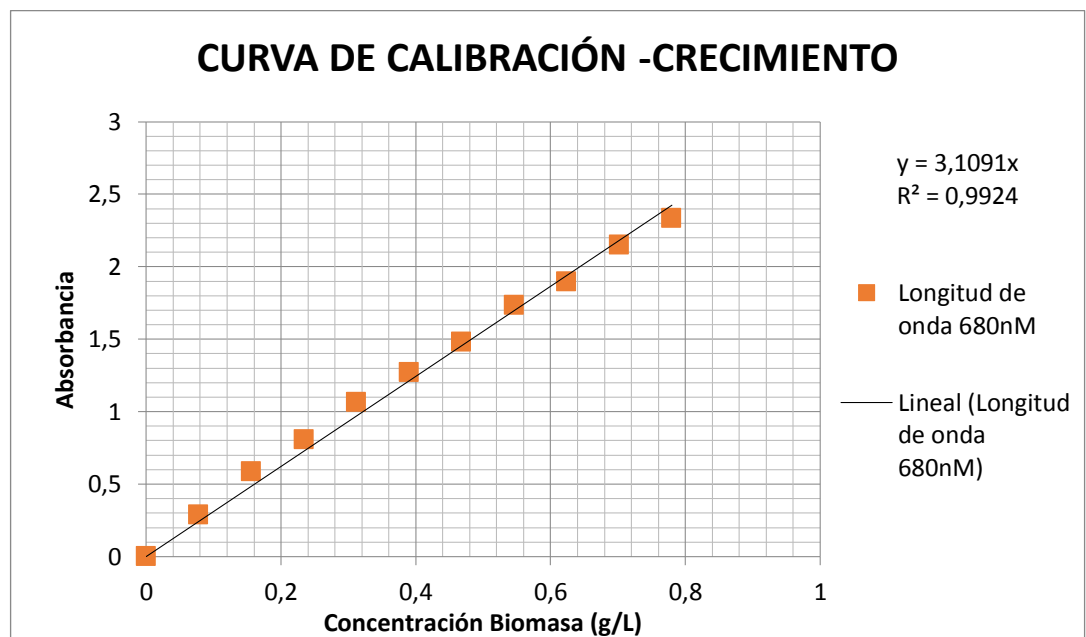


GRÁFICA 1. COMPARACIÓN CONCENTRACIÓN DE BIOMASA SECA (G/L) ENTRE LOS ENSAYOS REALIZADOS

Crecimiento de Biomasa en el tiempo

En el proceso para determinar la concentración de biomasa de cada ensayo se tomaron muestras por aproximadamente 14 días, el comportamiento de cada ensayo con respecto al tiempo se puede observar en la gráfica 2, en la cual se determina la concentración a partir de la curva de calibración (concentración de biomasa $\text{g/L} = \text{absorbancia} / 3,1091$ que se realizó a una longitud de onda de 680nm. El día 1 se ve representado como tiempo 0, esta no presenta diferencias significativas ya que se usó un inóculo con un promedio de absorbancia de 2,08 lo que minimiza el error inicial de los ensayos, como se ve representado en la tabla 2, transcurrido día y medio se ve como el ensayo de 3300Hz y el control presentan un crecimiento más acelerado con respecto a los otros ensayos con un promedio de concentración. Al tercer día dio como resultado que se obtuvo una mayor

varianza entre los datos donde se ve representado el ensayo trabajado con una frecuencia 3300Hz la más alta con un 37% por encima del promedio, en este punto el control y la frecuencia de 1100Hz tienen un comportamiento similar y el ensayo con menor crecimiento es el trabajado con una frecuencia de 2200Hz. Hasta este punto al ser tan corto el tiempo de ensayo los resultados no representan una conclusión importante, pero si se pueden ver diferencias entre sí.



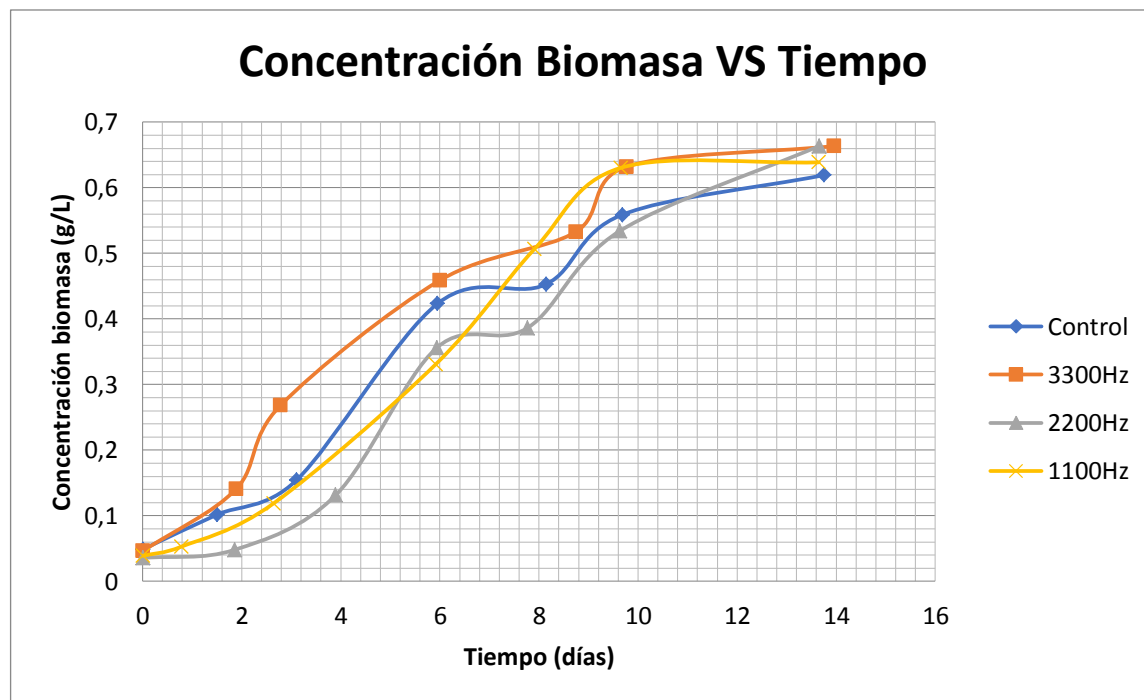
GRÁFICA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN, ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE BIOMASA (G/L).

Para el sexto día el comportamiento para todos los ensayos sigue siendo exponencial, el ensayo de 3300Hz sigue siendo el que mejor crecimiento y con respecto a los otros ensayos con una diferencia del 10% por encima del control y el ensayo que menor concentración tiene es el trabajado con una frecuencia de

1100Hz estando 21% por debajo del control y con un dato muy cercano al ensayo de 2200Hz. Para el octavo día se determinó que el ensayo de 1100Hz tiene mayor aceleramiento junto al ensayo trabajado con la frecuencia de 3300Hz y el ensayo con menor crecimiento es el trabajado con la frecuencia de 2200Hz estando 11% por debajo del control. En el décimo día el ensayo que tiene mayor aceleración es el de 2200Hz pero presenta la menor concentración siendo estadísticamente significativa con una alta varianza con respecto al ensayo de 1100Hz y 3300Hz pero entrando en su etapa de desaceleración estando 14% por encima del control. En el día catorce los ensayos de 3300Hz, 1100Hz y el control están en su etapa de desaceleración, a diferencia del ensayo de 2200Hz que sigue teniendo un comportamiento exponencial y que ha alcanzado la concentración del ensayo de 3300Hz, estos presentan un mayor crecimiento con respecto al control y el ensayo de 1100Hz encontrándose 6% por debajo de los otros ensayos. Se pudo determinar que el ensayo de 3300Hz durante el tiempo tuvo los mejores resultados de crecimiento y al final el que mayor concentración obtuvo, el ensayo de 2200Hz se encontraba por debajo del promedio pero al final fue uno de los ensayos con mayor crecimiento de biomasa, siendo el control el que menor concentración final tuvo pero no con diferencia significativa con respecto al ensayo de 1100Hz.

Concentración (g/L)				
TIEMPO (días)	Control	3300Hz	2200Hz	1100Hz
0	0,045	0,046	0,041	0,043
1,5	0,099	0,120	0,042	0,070
3	0,160	0,290	0,090	0,160
6	0,420	0,460	0,360	0,330
8	0,450	0,520	0,400	0,520
10	0,560	0,640	0,550	0,640
14	0,620	0,660	0,650	0,630

TABLA 2. Concentración de los ensayos con respecto al tiempo.

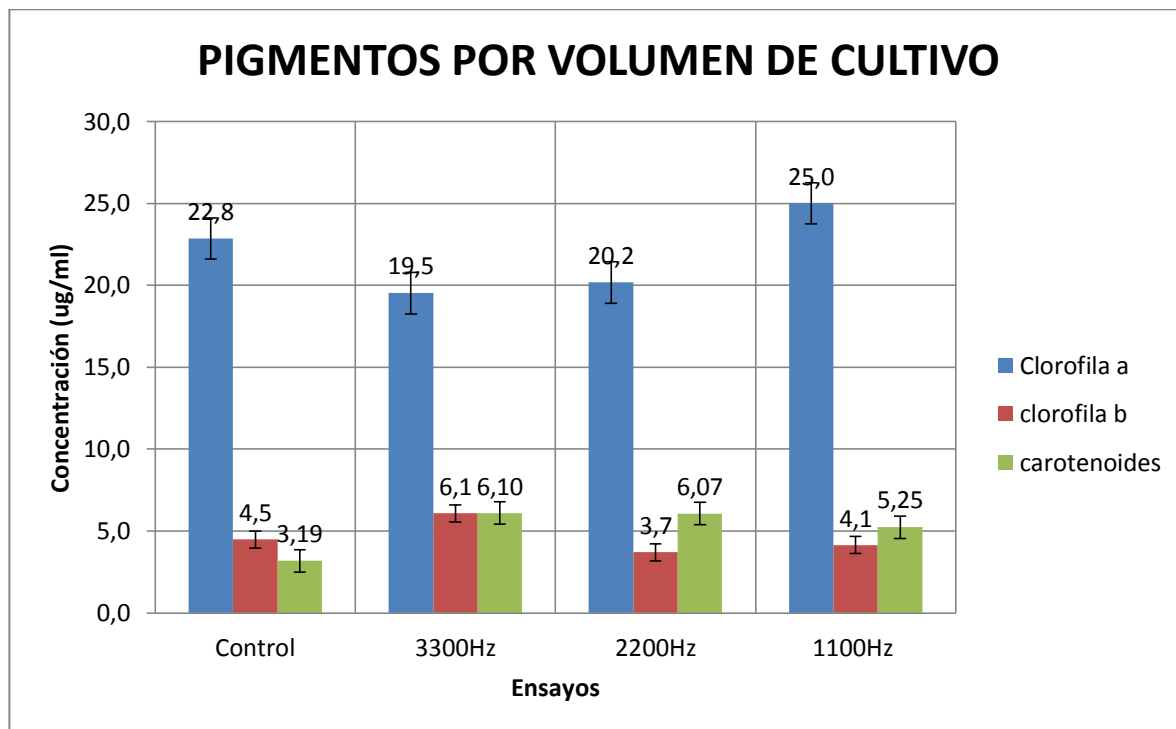


GRÁFICA 3. CONCENTRACIÓN DE BIOMASA (G/L) CON RESPECTO AL TIEMPO (DÍAS) ENTRE LOS ENSAYOS REALIZADOS.

Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides

Para la extracción de clorofilas y carotenoides fueron necesarios 20 miligramos diluidos en 5 mililitros de acetona 90%, a partir de lecturas espectrofotométricas de absorbancia, se determinó la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides. En la gráfica 3 se puede observar la comparación entre todos los ensayos realizados de la concentración en ug/ml de cultivo, mediante un análisis estadístico ANOVA se pudo determinar que para la cuantificación de clorofila a se encuentran diferencias significativas entre los ensayos, para determinar las diferencias entre los ensayos se realizó la prueba de TUKEY, dando como resultado que el ensayo de 3300Hz y el ensayo de 2200Hz no presentan diferencia entre sí, teniendo un promedio de concentración de 19,8ug/ml de cultivo, el ensayo que obtuvo mayor concentración de clorofila a fue el ensayo de 1100Hz con un promedio de 25,0 ug/ml de cultivo, el cual con respecto al resto de ensayos si presenta diferencia la cual se podría decir que la frecuencia es favorable para aumentar la concentración de clorofila a. Para la cuantificación de clorofila b, se puede observar en la gráfica 3 todos los ensayos, mediante un análisis estadístico ANOVA se determinó la diferencia significativa entre los ensayos, se puede ver que esta diferencia entre los ensayos de 3300Hz y 2200Hz con respecto a los otros, aunque no es grande se tuvo en cuenta mediante el análisis de TUKEY debido a que se puede decir que las frecuencias si interfirieron en la concentración final. Para la prueba de carotenoides también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los ensayos y el blanco, siendo 2200Hz y 3300Hz las frecuencias con resultados favorables para la

concentración final de carotenoides con un promedio de 6,01 ug/ml de volumen de cultivo.



GRÁFICA 4. COMPARACIÓN CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS POR VOLUMEN DE CULTIVO (ug/ml) ENTRE LOS ENSAYOS REALIZADOS

De acuerdo a la tabla 3 se puede ver como el ensayo trabajado con sonido con respecto a uno en el que se evaluó la intensidad de luz, para el resultado de clorofila a el ensayo con mayor cantidad fue el realizado con una frecuencia de 1100Hz con una concentración de pigmentos de 25ug/ml volumen de cultivo, estando 12% por debajo del ensayo con mejor resultado de la referencia consultada el cual se trabajó con una intensidad de luz de 50umol fotones/m² s. Si se trabajara esta intensidad de luz con la frecuencia de sonido que mejor resultado obtuvo es posible que se optimice el resultado. Para la cuantificación de clorofila b

el ensayo con mejor resultado fue el trabajado con una mayor frecuencia obteniendo una concentración de 6.1 y el de la referencia como se muestra en la tabla 2 fue el ensayo con una intensidad de luz media estando 8% por debajo del trabajado con sonido. El análisis de carotenoides con frecuencia de sonido obtuvo un mejor resultado en el ensayo de 3300Hz que con respecto al de intensidad de luz que fue intensidad media se encuentra 25% por encima, presentando mayor peso por volumen de cultivo.

ESTÍMULO	MICROALGA	VOLUMEN DE CULTIVO (ML)	TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS (ug/ml) EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	REF.
Intensidad de la luz	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes intensidades de luz: 400 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 250 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 50 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$	Clorofila a 21 26 28	(Liu, et al., 2012)
Intensidad de la luz	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes intensidades de luz: 400 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 250 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 50 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$	Clorofila b 5.2 5.6 4.5	(Liu, et al., 2012)
Intensidad de la luz	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes intensidades de luz: 400 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 250 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ 50 $\frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$	Carotenoides 4.50 4,60 4,20	(Liu, et al., 2012)
Efecto de frecuencia de sonido sobre la producción de	<i>Scenedesmus sp.</i>	600	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido:	Clorofila a 22,8	

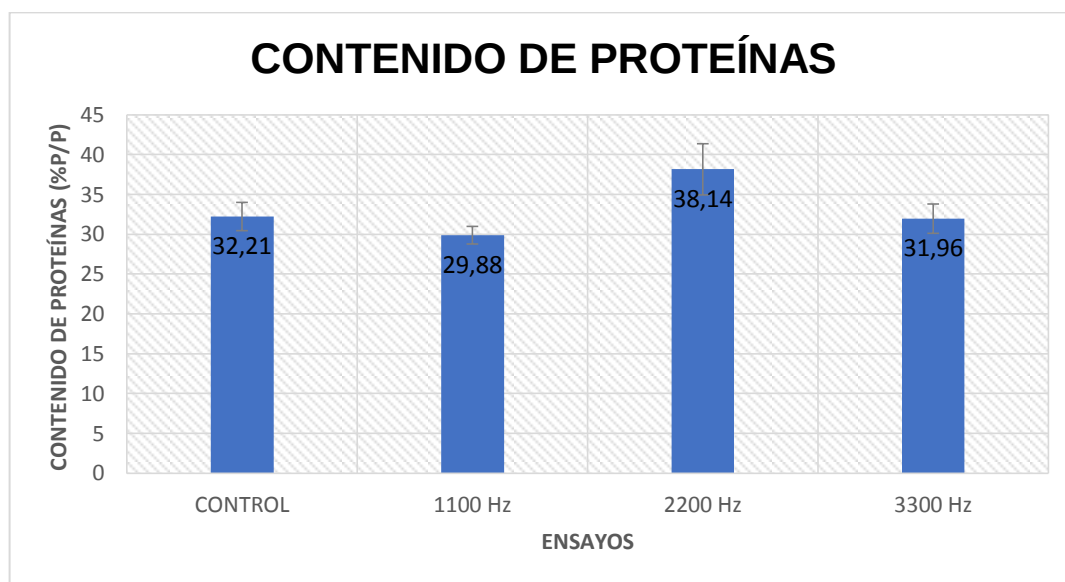
biomasa			Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	25,0 20,2 19,5	
Efecto de frecuencia de sonido sobre la producción de biomasa	<i>Scenedesmus sp</i>	600	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido: Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	Clorofila b 4,50 4,10 3,70 6,10	
Efecto de frecuencia de sonido sobre la producción de biomasa	<i>Scenedesmus sp</i>	600	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido: Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	Clorofila b 3,19 5,25 6,07 6,10	

TABLA 3. Comparación de resultados de biomasa seca final obtenida con diversos estímulos.

Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas presentes en las muestras analizadas fue determinado mediante el método de Lowry, en el cual se mide la absorbancia de la muestra de estudio mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 750 nM, además de realizar una curva de calibración con tendencia lineal para obtener los valores de concentración de los ensayos, usando albúmina de suero bovino (BSA) como solución estándar de proteína, mediante una serie de diluciones (González López et al., 2010). Para el análisis de los datos se realizó el estudio estadístico ANOVA de un factor, con un nivel de significancia $<0,05$, lo que indica que los valores obtenidos de las muestras presentan diferencias significativas para ser comparados con el control. Para identificar las diferencias se contó con la prueba

TUKEY obteniendo que el control y la frecuencia de 1100 Hz no tienen diferencias significativas, de igual manera entre el control y la frecuencia de 3300 Hz, pero en la gráfica 4 se puede evidenciar que la frecuencia de 2200 Hz es la que presenta el mayor porcentaje de proteínas y ésta presenta diferencias con respecto a los demás ensayos.



GRÁFICA 5. COMPARACIÓN CONTENIDO PRETEÍNAS (%p/p) ENTRE LOS ENSAYOS REALIZADOS

En la tabla 4 se puede encontrar los valores del contenido de proteína de dos investigaciones realizadas con diferentes tratamientos, en las cuales se puede evidenciar que el contenido de proteínas en la microalga *Scenedesmus* varía entre 25 % y 45%, valores entre los que se encuentran los resultados obtenidos de la biomasa después de ser tratada con las frecuencias de sonido analizadas.

ESTÍMULO	MICROALGA	TRATAMIENTOS	CONTENIDO DE PROTEÍNAS (% P/P)	REFERENCIA
Diferentes pretratamientos de disrupción celular	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Control Sonicación Molienda	33 29 48	(González, et al., 2010)
Niveles de nitrato.	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Concentración de nitrato: 0 g/l 0.6 g/l 1.5 g/l	8 28 41	(Wu, y Miao, 2014).
Efecto de frecuencia de sonido sobre la producción de biomasa	<i>Scenedesmus sp</i>	Concentración en las diferentes frecuencias de sonido: Control 1100 Hz 2200 Hz 3300 Hz	32,21 29,88 38,14 31,96	

TABLA 4. Comparación de resultados de contenido de proteína con diversos tratamientos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe diferencia significativa entre los valores de biomasa seca final obtenidos en las frecuencias de 1100 Hz, 2200 Hz y 3300 Hz al ser comparadas con el control, teniendo como resultado que la frecuencia de 2200 Hz presentó la mayor producción de concentración de biomasa seca.

El mayor valor de contenido de proteínas se obtuvo con la frecuencia de 2200 Hz, ya que alrededor del 38% (p/p) del contenido de la biomasa seca final es proteína.

Al evaluar el crecimiento de biomasa con respecto al tiempo de acuerdo al comportamiento de la cantidad de biomasa se evaluó estadísticamente encontrando diferencias significativas estadísticamente en su crecimiento, siendo el ensayo de 3300Hz el que mejores resultados obtuvo con respecto a los otros ensayos teniendo en cuenta que este tenía la frecuencia más alta, el ensayo de 2200Hz durante la primera semana estuvo por debajo del promedio, aunque al final su concentración no presentaba gran diferencia con respecto al de 3300Hz y no llegó a su etapa de desaceleración, obteniendo estos dos ensayos un promedio de 0,65g/L de concentración 6% por encima de los otros ensayos.

En la cuantificación de pigmentos por volumen de cultivo, se obtuvo que el ensayo de 3300Hz y el ensayo de 2200Hz no presenten diferencia entre sí, teniendo un promedio de concentración de 19,8ug/ml, pero estadísticamente si tienen diferencias con respecto al ensayo trabajado a una frecuencia de 1100Hz teniendo un promedio de 25,0ug/ml., por lo que se puede decir que las frecuencias de sonido si tienen un efecto en esta propiedad, favoreciendo bajas frecuencias.

REFERENCIAS

Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., & Morales, E. D. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. Utilizando aguas residuales de piscadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.

Artero, Ó. T. (2013). *ARDUINO. Curso práctico de formación*. RC Libros.

- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131, 246–249. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.159
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Some soil algae from enchanted rocks and related species. University of Texas Publications No. 6318. *Phycol. Stud*, 4, 1-95.
- Cai, W., Dunford, N. T., Wang, N., Zhu, S., & He, H. (2016). Audible sound treatment of the microalgae *Picochlorum oklahomensis* for enhancing biomass productivity. *Bioresource Technology*, 202, 226–230. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.12.019>
- Christwardana, M., & Hadiyanto, H. (2017). The Effects of Audible Sound for Enhancing the Growth Rate of Microalgae *Haematococcus pluvialis* in Vegetative Stage. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(3), 149-155.
- Dee, D. P., Uppala, S. M., Simmons, A. J., Berrisford, P., Poli, P., Kobayashi, S., & Bechtold, P. (2011). The ERA-Interim reanalysis: Configuration and performance of the data assimilation system. *Quarterly Journal of the royal meteorological society*, 137(656), 553-597.
- Driscoll, W. C. (1996). Robustness of the ANOVA and Tukey-Kramer statistical tests. *Computers & Industrial Engineering*, 31(1-2), 265-prot
- González López, C. V., García, M. del C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.077
- Liu, J., Yuan, C., Hu, G., & Li, F. (2012). Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under Nitrogen Limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), 2127–2137. doi:10.1007/s12010-012-9639-2
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., & Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana. Botánica*, 60(2), 83-89.
- Mubarak, M., Shaija, A., & Suchithra, T. V. (2019). Flocculation: An effective way to harvest microalgae for biodiesel production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 103221.
- Palatsi, J., Viñas, M., Guivernau, M., Fernandez, B., & Flotats, X. J. B. T. (2011). Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: main process limitations and microbial community interactions. *Bioresource Technology*, 102(3), 2219-2227.

Pardo, C. E., & Del Campo, P.C. (2007). Combinación de métodos factoriales y de análisis de conglomerados en R: el paquete FactoClass. *Revista colombiana de estadística*, 30(2), 231-245.

RATH, B. (2012). Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology*, 3(3), 299-304.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences*.

Scharff, C. (2015). Use Of Microalgae As Renewable Resources. *Journal of Central European Green Innovation*, 3(1063-2016-86218), 149-156.

Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Facultad de Ingeniería*, 24(39), 43-54.

Vega, B. O. A., & Voltolina, D. O. M. E. N. I. C. O. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 17-25.

Wu, H., & Miao, X. (2014). Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology*, 170, 421–427.doi:10.1016/j.biortech.2014.08.017

Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., & Lv, P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. *Renewable Energy*, 125, 1049-1057.