

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES AMBIENTALES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL



**“EVALUACION DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL
CRECIMIENTO POBLACIONAL DE MICROALGAS (*Chlorella sp.*)
Y DETERMINAR EL POTENCIAL ENERGETICO COMO
BIOETANOL EN LA REGION UCAYALI”**

Tesis presentada por el Bachiller:
PHILIPPE MARC RODRIGUEZ ALIAGA

Para optar el Título de:
INGENIERO AMBIENTAL

PUCALLPA – PERÚ

2016

El jurado calificador, designado por la Comisión de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Nacional de Ucayali, que dio por aprobada la tesis, tiene el agrado de presentar al:

Dr. Carlos Enrique Fachín Mattos

.....

Presidente

Ing. M.Sc. César Mori Montero

.....

Miembro

Dr. Carlos Panduro Carbajal

.....

Miembro

Ing. Melchor Herbert Dolmos Castro

.....

Asesor

Bach. Philippe Marc Rodríguez Aliaga

.....

Tesista

DEDICATORIA

*Con un profundo cariño y respeto:
A Dios,
A mis padres Rosa y Ower, los que
dedicaron su tiempo y esfuerzo en mi
superación personal y desarrollo
profesional.*

AGRADECIMIENTO

- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, IIAP - Ucayali, por permitirme el uso de los laboratorios, material y equipos durante la ejecución de la tesis.

- A los investigadores del Programa AQUAREC al Blgo Pesq. Roger Bazán Albítez y a la Blgo. Acui. Humberto Arbildo Ortiz, al personal técnico y, a la Blgo Pesq. Carmela Rebaza Alfaro que bajo la gerencia del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana IIAP-Ucayali, me dieron su voto de confianza y el apoyo otorgado a mi persona.

- A mi asesor Ing. Mg. Melchor Herbert Dolmos Castro por la paciencia y comprensión.

- A mis padres, que gracias a sus apoyo pude lograr este gran sueño.

- A la Ing. Claudia Guizado Villafane, por su apoyo y consejos para la realización de mi tesis.

- Al señor Roberto Tuesta por ayudarme en la realización de la parte experimental de esta investigación y facilitarme algunos materiales de laboratorio.

- Así mismo agradecer a todas las personas que han contribuido de una u otra manera en la culminación del presente trabajo de investigación.

INDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
 CAPITULO I	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1. Formulación del Problema	9
1.1.1. Pregunta general	9
1.1.2. Preguntas específicas.....	9
 CAPITULO II	
MARCO TEORICO	10
2.1. Antecedentes del problema.....	10
2.2. Planteamiento teórico del problema.....	12
2.2.1.Extracción y selección de cepas de microalgas	12
2.2.2. Microalgas en medio natural.....	14
2.2.3. Cultivo de microalgas en medio artificial	14
2.2.4. Métodos de cultivo.....	16
2.2.5. Crecimiento microalgal.....	19
2.2.6. Medio de cultivo	20
2.2.7. Experiencias en cultivos de microalgas	22
2.2.8. Extracción de exopolisacáridos en microalgas	25
2.2.9. Disrupción celular.....	25
2.2.10. Sacarificación de los exopolisacáridos	26
2.2.11. Fermentación alcohólica de los azúcares	27
2.2.12. Obtención del bioetanol de los polisacáridos.....	28
2.2.13. Cultivo de microalgas como MDL	30
2.2.14. Experiencias de la obtención de bioetanol de microalgas	31

2.2.15. Metodología para la extracción de exopolisacáridos de las microalgas	32
2.2.16. Metodología utilizada en el proceso de obtención en la producción de bioetanol	33
2.2.17. Medición de la pureza y calidad del etanol	34
2.2.18. Ventajas del cultivo de microalgas frente a los cultivos energéticos tradicionales para la producción de biocombustibles	34
DEFINICION DE TERMINOS BASICOS.....	37

CAPITULO III

METODOLOGIA.....	42
3.1. Método de Investigación.....	42
3.1.1. Ubicación del trabajo de investigación.....	42
3.1.2. Ecología y clima	42
3.1.3. Metodología.....	43
3.2. Población y Muestra	47
3.3. Procedimiento de recolección de datos	48
3.3.1. Conteo celular.....	48
3.3.2. Medición de los parámetros fisicoquímicos del agua.....	50
3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	50
3.4.1. Materiales	50
3.4.2. Técnicas para la recolección de datos.....	52
3.5. Procesamiento para la recolección de datos	53
3.6. Tratamiento de datos	54

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
4.1. Matriz de resultados	55

4.2. Evaluación de los factores físicos y químicos, influyentes en el crecimiento poblacional de <i>Chlorella sp.</i>	55
4.2.1. pH	57
4.2.2. Temperatura.....	59
4.2.3. Potencial redox (Eh).....	60
4.3. Determinación del crecimiento microalgal	62
4.4. Obtención de la biomasa algal húmeda y volumen	66
4.5. Sacarificación de los exopolisacáridos.....	67
4.6. Fermentación	67
4.7. Destilación de alcohol.....	69
4.8. Obtención del bioetanol combustible	70
4.8.1. Tratamiento 1	70
4.8.2. Tratamiento 2	70
4.8.3. Tratamiento 3	70
4.8.4. Testigo control	71
4.9. Comentario de los resultado obtenidos	71
 CAPITULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
5.1. Conclusiones	75
5.2. Recomendaciones	76
 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78
 ANEXOS.....	90
Iconografía.....	98

INDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadros	Pág.
Cuadro 1. Métodos de cultivo de microalgas	18
Cuadro 2. Tipos de estanques de microalgas	19
Cuadro 3. Esquema del Diseño completamente al azar (DCA)	49
Cuadro 4. Resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$) para la determinación de la concentración celular en $\text{cel} \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ durante los diferentes días	62
Cuadro 5. Resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p >$ $0,05$), para la determinación de biomasa seca, obtenido al término de la fase de cultivo (cosecha).....	66
Cuadro 6. Costos unitarios de los diversos ingredientes del medio de cultivo H.M.	99
 Tablas	
Tabla 1. Composición celular de ciertas especies microalgales	13
Tabla 2. Esquema del ANVA	47
Tabla 3. Matriz de resultados	55
Tabla 4. Parámetros físico-químicos que se registraron en los tratamientos durante el periodo de cultivo, en las instalaciones del programa AQUAREC del IIAP Noviembre Diciembre del 2015. Ucayali, Perú.....	56
Tabla 5. ANVA para el conteo celular a 1 día de iniciado el cultivo microalgal. ...	93
Tabla 6. ANVA para el conteo celular a 2 días de iniciado el cultivo microalgal. ..	93
Tabla 7. ANVA para el conteo celular a 3 días de iniciado el cultivo microalgal. ..	93
Tabla 8. ANVA para el conteo celular a 4 días de iniciado el cultivo microalgal. ..	94
Tabla 9. ANVA para el conteo celular a 5 días de iniciado el cultivo microalgal. ..	94
Tabla 10. ANVA para el conteo celular a 06 días de iniciado el cultivo microalgal.	94

Tabla 11. ANVA para el conteo celular a 07 días de iniciado el cultivo microalgal.	95
Tabla 12. ANVA para el conteo celular a 08 días de iniciado el cultivo microalgal.	95
Tabla 13. ANVA para el conteo celular a 09 días de iniciado el cultivo microalgal.	95
Tabla 14. ANVA para el conteo celular a 10 días de iniciado el cultivo microalgal.	96
Tabla 15. ANVA para el conteo celular a 11 días de iniciado el cultivo microalgal.	96
Tabla 16. ANVA para el conteo celular a 12 días de iniciado el cultivo microalgal.	96
Tabla 17. ANVA para el conteo celular a 13 días de iniciado el cultivo microalgal.	97
Tabla 18. ANVA para la determinación de biomasa microalgal.	97
Tabla 19. Datos registrados durante el conteo de células por unidad experimental, expresados en células x 10 ⁶ .ml ⁻¹ , durante la fase experimental.	98

INDICE DE FIGURAS

En el texto	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de producción de etanol a partir de algas.....	34
Figura 2. Cámara de Neubauer	49
Figura 3. Cámara de Neubauer	49
Figura 4. Distribución del área experimental.....	51
Figura 5. Influencia del pH respecto al crecimiento poblacional celular en los tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	57
Figura 6. Influencia de la temperatura respecto al crecimiento poblacional celular en los Tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	59
Figura 7. Influencia del potencial redox (Eh) respecto al crecimiento poblacional celular en los Tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de <i>Chlorella sp.</i> ...	61
Figura 8. Crecimiento poblacional de los tratamientos en estudio en el cultivo de <i>Chlorella sp.</i> Pucallpa, Perú, 2015.	63
En Iconografía	
Figura 9. Cultivo de microalgas (<i>Chlorella sp.</i>) en el día 0 en el laboratorio de Reproducción de peces en el IIAP – Ucayali, 2015.....	100
Figura 10. Cultivo de microalgas en el día 13, con los diferentes tratamientos. Se observa que tienen un color verde más intenso	100
Figura 11. Unidades experimentales que se usaron para el testigo, a los cuales no se les agregó ningún nutriente	101
Figura 12. Conteo de la densidad celular con la ayuda un microscopio y del hematocímetro (cámara de Neubauer)	101
Figura 13. Se observan microalgas de la especie <i>Chlorella sp.</i> en el microscopio. Se puede apreciar una imagen ampliada de la observación para mayor visibilidad.....	102
Figura 14. Se observan los sedimentos microalgales en la parte inferior de las unidades experimentales	102

Figura 15. Medición de los parámetros físico-químicos en las unidades experimentales.....	103
Figura 16. Sedimentos microalgales	103
Figura 17. Biomasa húmeda obtenida.	104
Figura 18. Se aprecian los Tratamientos 1 (abono foliar “Multifoliar 20-2020”) y 2 (abono foliar “Panter-A Balance”) que se utilizaron para la experimentación	104
Figura 19. Se aprecia el Tratamiento 3 (medio H.M.). Consta de cuatro patrones: superfosfato simple de calcio, cloruro férrico (FeCl ₃), cloruro de potasio (KCl) y úrea	105
Figura 20. Pesado de las biomosas húmedas obtenidas del cultivo microalgal.....	105
Figura 21. Relización del proceso de hidrólisis	106
Figura 22. Fermentación de la biomasa.....	106
Figura 23. Biomasa fermentada	107
Figura 24. Destilación del bioetanol de microalgas (<i>Chlorella sp.</i>)	107
Figura 25. Obtención del bioetanol	108
Figura 26. Medición de la concentración de alcohol mediante el uso de un alcoholímetro	108
Figura 27. Tipos de reactores para el cultivo masivo de microalgas. a) FBR tubular (http://www.ebri.org.uk/index.html); b) FBR tubular (http://www.oilgae.com/); c) Vertical Algae Technology (VAT) (http://www.valcent.net/s/Home.asp); d) FBR tipo placa (http://biofuels.asu.edu/biomaterials.shtml) y e) Lagunas abiertas (LA) también conocidas como “raceways” (http://www.aurorabiofuels.com/).....	109

RESUMEN

El siguiente estudio tiene la finalidad de evaluar tres diferentes medios nutritivos (abono foliares “Multifoliar 20-20-20” y “Panter-A Balance, en concentraciones de 0,2 ml.l⁻¹; y el medio H.M. en concentraciones por patrón son de 1 ml.l⁻¹) para evaluar el crecimiento poblacional del cultivo de microalgas (*Chlorella sp.*); para ello se empleó un diseño completo al azar (DCA) simple que está constituido por tres tratamientos y un testigo (sin nutrientes), cada uno con tres repeticiones.

El experimento fue realizado en las instalaciones del IIAP* - Ucayali, con el apoyo del programa AQUAREC; instalado el estudio, en baldes de 20 litros conectados al sistema de aireación (blower), los medios nutritivos fueron suplementados en cada UE*, según el tratamiento designado; durante 14 días se registró temperatura ambiente y de las UE (29,37 y 30,49 °C, respectivamente), pH (7,43) y potencial redox (-22,15 mV); los conteos fueron diarios expresados en células.ml⁻¹. Después se extrajeron la biomásas húmedas de cada tratamiento para la obtención de bioetanol mediante los procesos de hidrólisis, fermentación y destilación, luego se midió el grado y volumen de alcohol obtenido.

Los resultados mostraron que bajo las mismas condiciones todos crecen de una forma exponencial, sin embargo el tratamiento que hizo que hubiera mayor crecimiento poblacional fue el Tratamiento 1 (abono foliar “Multifoliar 20-20-20”), a 13 días de iniciado el cultivo, con un valor máximo de de 7,94 x 10⁶ cel.ml⁻¹. También registró que el Tratamiento 3 (medio H.M.) logró mayor cantidad de biomasa húmeda obtenida en el cultivo (4,33 g/l) y se obtuvo mayor cantidad de etanol (25,6 miligramos por litro de biomasa húmeda).

Palabras clave: Medio de cultivo, concentraciones, crecimiento poblacional celular, cultivo microalgal, carbohidratos, biomasa húmeda, bioetanol

* IIAP: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. * UE: Unidad(es) experimental(es).

ABSTRACT

The following study aims to evaluate three different nutrient media (foliar fertilizer "Multileaf 20-20-20" and "Panter-A Balance, at concentrations of 0.2 ml.l⁻¹, and the average HM in concentrations pattern are 1 ml.-1) to evaluate the population growth of cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.); for this a simple random complete design (DCA) which consists of three treatments and a control (without nutrients), each with three replicates it was used.

The experiment was conducted at the premises of RIPA* - Ucayali, with the support of AQUAREC program; installed the study, in 20 liter pails connected to the aeration system (blower), nutrient media were supplemented in each UP*, according to the designated treatment; room temperature for 14 days and UP (29.37 and 30.49 ° C respectively), pH (7.43) and redox potential (-22.15 mV) was recorded; daily counts were expressed in células.ml⁻¹. After the moist biomasses each treatment to obtain bioethanol were extracted using the processes of hydrolysis, fermentation and distillation, then the degree and volume of alcohol obtained was measured.

The results showed that under the same conditions all grow exponentially, however the treatment had made greater population growth was the Treatment 1 (foliar fertilizer "Multileaf 20-20-20"), 13 days into the culture with a maximum value of 7.94 x 10⁶ cel.ml⁻¹. Also it recorded to Treatment 3 (medium H.M.) achieved greater amount of wet biomass in the culture obtained (4.33 g/l) and more ethanol (25.6 milligrams per liter of wet biomass) was obtained.

Keywords: culture medium, concentrations, cell population growth, microalgal culture, carbohydrates, wet biomass, bioethanol

* RIPA: Research Institute of the Peruvian Amazon. * UP: unit (s) pilot (s).

INTRODUCCION

El bioetanol es un biocombustible de tercera generación identificada para ir hibridándose con las gasolinas hasta un 80% cuando este combustible fósil esté en su etapa de agotamiento en nuestro planeta, que según la secretaria de energía del gobierno de los Estados Unidos (DOE - USA, 2000) estima que esta situación se dará a partir del 2035 en la que su demanda debe ser cubierta con materias primas que no atenten contra la pirámide alimenticia de nuestro planeta en el uso de suelos conforme a la política internacional de la FAO. Las materias primas disponibles en la actualidad para la producción del bioetanol están conformada por los granos de cereales (el maíz), tubérculos, caña de azúcar y recientemente con microalgas de aguas marinas y dulces.

La tendencia actual del mercado de los combustibles fósiles, especialmente el petróleo, está caracterizado por el descenso de sus precios (US\$ 37 por barril de petróleo) y los de procedencia árabe según la OPEP (2016), puede llegar a descender hasta US\$ 20 por barril. Una de las explicaciones de esta tendencia es por el incremento en la demanda energética de los biocombustibles como alternativa global para enfrentar sobre el cambio climático que ha generado a acentuarse el tema de los combustibles híbridos con mayor presencia en la comunidad europea (para el 2016 el uso de biodiesel hasta el 16% y del bioetanol sobre el 10%). Este contexto se puede interpretar por el grado de cultura ambiental que tiene la comunidad europea basado en la promoción y práctica de: la alianza del ambiente con la energía (AEA). (Gadea, 2012)

En el caso del Perú, actualmente estamos utilizando el BD-5 (con 5% de grasas como biocombustible) y el gasohol hasta con 3% de etanol (bioetanol), en todos los tipos de gasolina que en un 99.5% proviene de la importación. La demanda de bioetanol en el Perú además tiene una situación contraria debido a que la MAPLE GAS en su

planta de bioetanol en Piura a partir del cultivo agroindustrial de azúcar (con MDL), su producción de diez mil toneladas por año está destinada exclusivamente para la exportación a la U.S.A. por 30 años. Agudizándose la demanda insatisfecha del bioetanol, estimada en 137 millones de lts/año (MINCETUR, 2006). Siendo así que para el 2012 el Ministerio de Energía y Minas (MEM) reporta que se utilizaron 1.927 millones de litros/año de gasolinas correspondiéndole 1.50 millones de litros/año de etanol para hibridarlos; esta situación nos muestra la demanda por atender el consumo actual del bioetanol. (Bedón, 2013)

Según la nota de prensa “La Primera” en la sección de economía (2012), menciona que Petro Perú comercializa más del 60% de combustible en el país, con una inversión de US\$ 700 mil dólares diarios en solo importar biodiesel y etanol (2.500 barriles diarios), por ello se firmó el Convenio Marco de Cooperación Interinstitucional para el “Apoyo a la investigación y la Promoción de la Producción y Uso de los Biocombustibles”; Petro Perú reconoció que al no importar biocombustible y comprarlo de productores nacionales, se reduciría el precio de los combustibles en el mercado nacional.

La producción de alcohol combustible en la Amazonía es muy escaso y se tiene que recurrir a utilizar suelos para cultivos agrícolas para su producción perjudicando la alimentación y nutrición de la población como es el caso del departamento de San Martín (MINAGRI, 2015), donde producen etanol a partir de los cultivos de caña de azúcar para la comercialización “casera” del etanol anhidro ofertado para atender una pequeña parte de la demanda de combustible en las motocicletas, y por otra parte, en esta Región se han desforestado miles de Has para el cultivo de la palma aceitera haciendo que los monocultivos de caña de azúcar y palma aceitera estén generando

impactos ambientales negativos en el ecosistema de esta región, tan solo por no explorar alternativas para la generación de biocombustibles para la tercera generación (estando operando 28 plantas produciendo grasa de palma).

Producir microalgas en la selva es viable económicamente y con la ejecución del presente estudio se dispondrá de un referente para usar especies silvestres. También se dispondrá de una alternativa inteligente para hacer de esta nueva actividad un mecanismo de desarrollo limpio (MDL) para toda la Amazonía con miras a la producción del bioetanol, más significativo que solo cultivar y utilizar a las microalgas como alimento en las piscigranjas que muy eficientemente lo está realizando el Instituto de Investigación de la Amazonia (IIAP). Por otra parte, la crianza de microalgas en estanque significa doble MDL porque demanda el consumo del CO₂ acuático que tiene como una fuente mayor en la descarga atmosférica en el ambiente agua de nuestra superficie terrestre; mereciendo un nuevo CER (Post – Kyoto) por la reducción del CO₂ de la atmósfera mediante el agua (Marcos, 2013), así mismo genera oxígeno limpio para la flora y fauna íctica.

El presente estudio tiene como objetivos: Evaluar el tratamiento más óptimo para realizar el cultivo de *Chlorella sp.*, con el propósito de determinar su potencial energético como bioetanol, biocombustibles de tercera generación.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según Rühl (2013), menciona que el consumo de combustibles fósiles se triplicó en 50 años, por lo tanto, se triplicó los niveles de demanda que había hace apenas medio siglo. La contaminación atmosférica, actúa de forma letal en los últimos tiempos, siendo así que la Organización Mundial de la Salud (OMS), informó que en el año 2013 se produjo el triple de muertes por contaminación atmosférica, respecto, al número de muertes ocasionadas por accidentes de tránsito en todo el mundo. Asimismo, según Picazo (2015), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente reporta que la concentración de CO₂ en la atmósfera con el medidor también se aumentó, teniendo como dato base de 1990 en la cual se determinó en la curva de Keeling la presencia de CO₂ en 3×10^{19} TM (250 ppm) y para el 2014 se determinó en 410 ppm, siendo el impacto ambiental, el cambio climático en nuestra atmósfera. Siendo también el otro impacto ambiental más letal, pues en nuestra atmosfera, tal como lo menciona Otero (2016), la presencia de oxígeno en nuestra atmosfera va disminuyendo conforme se aleja de la superficie, es así que para altitudes superiores a los 6,000 m, tiende a desaparecer, esta situación explica por qué los alpinistas del Everest usan balones de oxígeno para continuar escalando esta montaña.

Por otra parte, la reserva mundial de los combustibles fósiles se prevee que se agotarán en sólo 40 años (FAO, 1997; en Díaz, 2012). Mientras la demanda para el sistema de transporte para el año 2022 se estima en 36 millones de galones de biocombustible sólo para la USA. Propiciando la tendencia al futuro del biodiesel y por sobre todo para el bioetanol a la mayor demanda de los biocombustibles.

Existe, también, la preocupación por el impacto de los biocombustibles en la seguridad alimentaria. En primer lugar, a causa de la presunta influencia de las políticas de biocombustibles en el aumento de los precios de los alimentos. En segundo lugar, debido a la perspectiva generalizada, de que el desarrollo de los biocombustibles ha disparado las inversiones a gran escala en detrimento de la producción de alimentos, en algunos lugares asociado a la adquisición de tierras. (Tikhonovich, 2012, ¶ 9)

Esto ha suscitado importantes dudas acerca de los riesgos que podrían plantear los biocombustibles para la seguridad alimentaria, en un contexto en el que actualmente hay millones de personas desnutridas en el mundo y, según las estimaciones de la FAO (2011) –y sin tener en cuenta los biocombustibles-, es probable que la demanda de alimentos aumente en un 60-70% para 2050 debido a la evolución demográfica y al efecto del crecimiento económico. También preocupa en la actualidad las pérdidas considerables de alimentos y residuos, estimadas por la FAO y HLPE (2011) en aproximadamente un tercio de los alimentos producidos en el mundo para consumo humano cada año, equivalentes a unos 1,3 millones de toneladas (mucho más que la cantidad de maíz que se utiliza actualmente para la producción de etanol). (Tikhonovich, 2012, ¶ 10)

Según NextFuel (2006) el Biodiesel no contiene petróleo, pero puede ser mezclado en cualquier nivel con diésel del petróleo para crear las mezclas, generalmente llamadas BD-20 o BD-5. El Biodiesel también ha demostrado mejorar el funcionamiento del vehículo con más lubricidad y la reducción de emisiones. Es simple de utilizar, biodegradable, no tóxico, y esencialmente libre de sulfuro y de compuestos aromáticos. Por otra parte, Cruz (s.f., ¶ 5) indica que: “Actualmente, y cada vez con mayor

frecuencia, se utilizan alcoholes mezclados con diésel o gasolina en diferentes proporciones como combustibles alternativos.”

Asimismo, “aunque las mezclas de etanol con gasolina son aparentemente homogéneas, la práctica demuestra que su estabilidad influye apreciablemente en el proceso de combustión y por tanto en los parámetros de operación de los motores; este hecho vivencial, así como la necesidad de evaluar la influencia de la proporción de etanol en la estabilidad de la mezcla, justifican un estudio básico de este fenómeno a escala de laboratorio.” (Cruz, s.f., ¶ 6)

Para Tikhonovich (2012) el cultivo actual de biocombustibles constituye una amenaza para la seguridad alimentaria, además afirma que los monocultivos que están incrementándose por la gran demanda de los biocombustibles (en Europa para el 2016 utilizarán el BD-20), son los que más rápidamente degradan a los suelos y en la actualidad más del 30% de los suelos del planeta se encuentran deteriorados. Esta nueva amenaza, ha merecido que en la COP-20 (Lima, Diciembre del 2014) un grupo de ONGs han identificado este problema, y han correlacionado con el cambio climático como las causas de la mayor velocidad del deterioro de los suelos; logrando consensuar entre 20 países latinoamericanos y constituyeron la iniciativa 20x20 a fin de recuperar el 20% de sus suelos degradados para aprovechar en mejorar la pirámide alimentaria en Latinoamérica ¿será acaso esta tendencia y política que otros gobiernos la adoptarán? Iniciativa 20x20 fue lanzada formalmente en la Conferencia de las Partes de las Naciones Unidas para el Cambio Climático (COP-20) que se realizó en Lima, Perú entre el 1 y el 12 de diciembre. El objetivo es detener el problema del cambio en el uso del suelo, que se considera como causante de cerca de la mitad de las emisiones de gases de efecto invernadero en la región. La **Iniciativa 20x20** es un compromiso

de **ocho países de América Latina y el Caribe** y dos programas regionales para **restaurar 20 millones de hectáreas de suelo para 2020**. En el caso del Perú se comprometió a recuperar las tierras deterioradas de 3.2 millones de hectáreas. (Benito, 2014).

Por otra parte existen nuevas opciones de aprovechar la biomasa de los residuos de la transformación primaria de la madera. Dancé (2009) lo menciona en su informe sobre estudio de la viabilidad técnico-económica para el uso de residuos, derivados de las industrias de aserrío y laminado en los departamentos de Ucayali y Loreto. El menciona que de los residuos de la madera se puede generar variedad de biocombustibles, uno de ellos es el bioetanol como la forma más avanzada que demanda tecnologías comerciales.

De ser positiva esta tendencia, surgirá otra pregunta: ¿se estará iniciando la sustitución de los biocombustibles de primera generación por los biocombustibles de segunda generación? Son problemas mayores de carácter global y/o continental y este último problema también nos invita a formularnos la siguiente pregunta: ¿También sucederá lo mismo con los biocombustibles de segunda generación para ser sustituidos por los de tercera generación? Es decir, esta cadena de sucesiones de los biocombustibles se dará hasta que la humanidad utilice como combustible universal al hidrógeno cuando social, económica y ambientalmente sea manejado. En esta lógica de visiones se encuentra el uso de las microalgas para la generación de biocombustibles grasos y el bioetanol cuya factibilidad concita el interés científico como se demuestra en las 3 últimas ferias internacionales de bioenergía de la comunidad europea el interés por las microalgas. Avances científicos en nuestro país se aperturan promisoriamente al uso de microalgas como fuentes de grasa; como el proyecto IMARPE – FINCYT (2008)

donde reportó que por cada 2000 litros de cultivo microalgal, en agua marina, obtuvieron 200 gramos de biomasa seca y a partir de ésta, 20 mililitros de aceite microalgal.

Las algas se puede utilizar también para producir bioetanol, ya que en su mayoría especies de algas marinas: *Sargassum*, *Glacilaria*, *Prymnesium parvum* y *Euglena gracilis*) son ricas en polisacáridos (tipos de hidratos de carbono, tales como almidón, celulosa y pentosas) y tienen pared celular delgada, es así que: .En la universidad de Antioquía (Colombia, 2012) se logró obtener etanol a partir del cultivo de la microalga *Brotryococcus braunii*. En el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – Ucayali) se están realizando investigaciones del cultivo de microalgas para la alimentación de post – larvas de peces; sin embargo no se realizaron estudios de microalgas de la región para la producción de bioetanol. En este sentido están estudiando nuevas cepas de microalgas desde el 2012 debiendo iniciar los estudios de cultivos y generación de los correspondientes protocolos de nuevas cepas que permitirán dar continuidad a la exploración del cultivo de microalgas de agua dulce de nuestra Amazonía para la extracción de sus exopolisacáridos, materia prima para la producción de bioetanol de microalgas. (Anónimo, 2009)

Por lo expuesto hay una necesidad de conocer nuestras microalgas de agua dulce que de acuerdo a los reportes científicos; IMARPE, IIAP, Universidad de Antioquía, se concluye que las microalgas de agua dulce tienen contenido mayores de exopolisacáridos, grasas y proteínas respecto a las microalgas de aguas marinas; en consecuencia ya es tiempo de estudiar nuestras microalgas silvestres debidamente aisladas con el propósito de determinar su conversión en bioetanol, existiendo ya protocolos de aislamiento para fines piscícolas solamente y que facilitan los estudios

para las determinaciones para la producción de proteínas, grasa y bioetanol. En general podemos enfocar el problema con: ¿la obtención del bioetanol a partir de microalgas de agua dulce podrían ser optimizadas si se logra conocer las condiciones para obtener mayor biomasa de estas microalgas?

1.1. Formulación del problema

1.1.1. Pregunta General

¿En qué medios de cultivo se generaría el mayor potencial energético como bioetanol en la región de Ucayali a partir del cultivo de microalgas (*Chlorella sp.*)?

1.1.2. Preguntas específicas

- ¿Qué tratamiento es el más adecuado para conocer su adaptación al medio ambiente de la región de Ucayali para el cultivo de *Chlorella sp.*?
- ¿Cuál sería el medio de cultivo aplicado en el cultivo para el mejor crecimiento poblacional de microalgas (*Chlorella sp.*)?
- ¿Cuál sería el potencial en bioetanol del cultivo de la microalga *Chlorella sp.* en la región Ucayali?

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Díaz (2012) reporta que se tienen avances en producción de bioetanol de tercera generación mediante la bioconversión de exopolisacáridos (EPS) extraídos del cultivo in vitro de una microalga verde (*Chlorophyta*) en la Universidad de Antioquía, Colombia.

La verdad es que el bioetanol se presenta muy apetecible como sustituto, al menos parcial, de petróleo. Actualmente – y está en vías de mejora – el etanol es susceptible de mezclarse con gasolina y llegar a reducir su consumo en un 15% para obtener el mismo resultado energético y como un coste inferior con los actuales precios del petróleo. Además la combustión de etanol produce únicamente dióxido de carbono y agua, lo cual lo hace ecológicamente muy deseable. (Cruz, s.f.)

Pero, ¿qué ocurriría si el precio del petróleo subiera a 150 dólares por barril o más desde los 37 dólares actuales? Este escenario ya ocurrió entre 2007 y 2008, cuando el petróleo rondó los 145 dólares. Aumentó el uso de etanol – fenómeno fácilmente predecible por la teoría económica – y, junto a las condiciones meteorológicas adversas y políticas restrictivas, el precio de los alimentos subió dramáticamente, con la consiguiente hambruna de 2008. Un problema ético que se puede repetir ahora, o el futuro. (Melé, 2012, ¶ 6)

Sin embargo, En la actualidad los biocombustibles en los cuales se ha invertido el mayor esfuerzo son el bioetanol y el biodiesel, que se obtiene a partir de soya, girasol y canola. Las microalgas oleaginosas –dinofíceas y clorofíceas- son consideradas como fuente de biocombustibles y contribuyen en el ambiente ecológico de manera

importante para la fijación de dióxido de carbono (CO₂). Pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de combustibles como bioetanol, biodiesel y biometano. Se han reportado 30 especies de microalgas de origen marino o dulceacuícola que podrían ser utilizadas para la extracción de biocombustibles (Medina *et al*, 2012). La transformación de la biomasa para biocombustibles está aún en los primeros estadios de desarrollo y apenas se ha demostrado eficientemente a escala de laboratorio. En cualquier caso, la sinergia de los sistemas biológicos de captura del CO₂ y el desarrollo de biocombustibles parece clara. El CO₂ generado en procesos industriales de fermentación y de combustión puede ser capturado produciendo biomasa, carbohidratos, aceites, alimento animal y, adicionalmente, otros productos de valor añadido que pueden ser utilizados en las plantas de bioetanol como materia prima, disminuyendo la emisión de GEI asociada a la actividad productiva. El objetivo final de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías (ABNT) es estudiar la viabilidad técnico-económica del proyecto y desarrollar, en consecuencia, la tecnología adecuada para la fijación del CO₂ y la producción de biocarburantes y alimento animal a partir de biomasa de microalgas y cianobacterias. (Abengoa, 2010)

Para el éxito de estas actividades de investigación y desarrollo, ABNT ha creado un departamento propio de biotecnología de microalgas multidisciplinar, formado por ingenieros y biólogos que colabora estrechamente con otros centros de I+D, universidades y empresas de reconocida experiencia en este campo. Esta red de conocimiento, junto con la amplia experiencia y liderazgo de Abengoa en el desarrollo de soluciones innovadoras para el desarrollo sostenible en la industria solar, en ingeniería y construcción, en control de procesos y

tratamiento de aguas, desempeñarán un papel clave en el desarrollo futuro de esta tecnología. (Abengoa, 2010, párr. 14)

Finalmente, menciona que la ejecución de gran parte de estas actividades de transformación de biomasa en biocombustibles se encuentra reflejada en los proyectos Cenit Sost-CO₂ y BioSos, liderados por Abengoa Bioenergía y desarrollados en el marco de Consorcios Estratégicos Nacionales de Investigación Técnica (CENIT), que tiene como objetivo aumentar la cooperación pública y privada en I+D+i.

2.2. PLANTEAMIENTO TEORICO DEL PROBLEMA

2.2.1. Extracción y selección de cepas de microalgas

Es necesario el aislamiento de una unidad algal y la colocación de la misma en un medio de cultivo adecuado para su multiplicación, a fin de establecer un cultivo unialgal (monoespecífico). El término “unidad” se refiere a cualquier célula, colonia, filamento, pieza o parte del talo y cuerpo reproductivo. Un cultivo unialgal establecido es necesario para preparar un cultivo axénico. De todos los métodos para aislamiento el de pipeta capilar y el de rayado en agar son los más empleados para este fin. Las algas menores a 10 μ difícilmente son aisladas con pipeta capilar. Filamentos pueden aislarse con pipeta capilar. Utilizando los protocolos en la extracción y selección de cepas de microalgas de agua marina.

(Burgos, 2013)

Por otro lado, cabe resaltar la importancia que se da al cultivo de microalgas como acumuladores de compuestos bioactivos, entre ellos los lípidos, que en la mayoría de estos microorganismos el contenido sobrepasa el 20% (Tabla 1); siendo estos químicamente similares al de vegetales comunes, por lo cual se les

considera como fuente potencial de biocombustible. (Chisti, 2007 & Sheng-Yi *et al.*, 2009).

Tabla 1. Composición celular de ciertas especies microalgales.

Cepa (algas de agua dulce)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Scenedesmus acutus</i>	50–56	10–17	10-11
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8–18	21–52	16-40
<i>Chlamydomona srheinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14-22
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	04	08
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	22-38
<i>Prymnesium parvum</i>	28–45	25–33	22-38
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	03
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	09-14
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	08–14	04- 09
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	13–16	06- 07
<i>Anabaena cylindrical</i>	43–56	25–30	04- 07

Fuente: Becker, 1994.

Dentro de las ventajas que nos proporciona el cultivo de microalgas relacionado al campo energético, es el corto tiempo de producción de la biomasa, el espacio reducido en la cual esta se obtiene y, el elevado contenido lipídico que se extrae para ser transformado a combustible, lo cual representa todo un proceso

no contaminante, además que no interfiere con los lípidos relacionados al sector nutricional.

2.2.2. Microalgas en medio natural

Las **microalgas** son microorganismos microscópicos (2-200 μm) fotosintéticos, también son polifiléticos y eucariotas, (excluyen, por tanto, las cianobacterias, que dejaron de considerarse auténticas algas al pasar al reino procariota) que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En general son altamente eficientes en la fijación de CO_2 y utilización de la energía solar para producir biomasa. Están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditados solo al agua. Se encuentran presentes en el suelo y la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos, lo cual permite encontrarlas ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones. Así como son ubicuos (es decir que están presentes en muchos ambientes), así mismo tienen una gran diversidad taxonómica. (Wikipedia, 2014)

Para su desarrollo requieren de CO_2 , nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros nutrientes menores como metales, los cuales son esenciales porque actúan como cofactor de enzimas esenciales del metabolismo de las microalgas. (Wikipedia, 2014)

2.2.3. Cultivo de microalgas en medio artificial

Para Torrentera & Tacón (1989) se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua

de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural que entre otros factores depende del lugar donde se colecta ésta, y el tiempo de almacenamiento de la misma.

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, ya que como se ha mencionado, brinda resultados constantes, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos que afectan su crecimiento, las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schreibler de 1934, hasta fórmulas específicas para familias como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas, Provasoli *et al.*, 1975; Matthiesen & Thorner, 1966; McLachlan, 1973; Guillard F., 1973; Droop, 1975, 1979; Schoene, 1982, etc. Las principales formulaciones de los medios de cultivo, tanto de mantenimiento de cepas como de producción masiva (minerales, enriquecidos y orgánicos).

El fitoplancton se desarrolla y multiplica en relación de las condiciones fisicoquímicas del medio. En términos generales son los macronutrientes o factores limitantes del crecimiento el carbono, Nitrógeno, Fósforo, Silicio, Magnesio, Potasio y Calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes (Fierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Sodio, Molibdeno, Cloro y Cobalto) se necesitan en menores cantidades.

Existen otros medios que incluyen en su composición sustancias orgánicas (vitaminas, aminoácidos) necesarios para aquellas especies de microalgas Auxótrofas, es decir que no sintetizan por medio de la fotosíntesis este tipo de

compuestos y resultan factores que pueden limitar su crecimiento; tal es el caso de Platimonas, Chrysophytas y algunas Bacillariophyceas.

Las microalgas crecen de manera espontánea en ambientes acuáticos y húmedos. Sin embargo pese a su abundancia en la naturaleza, para la producción de biocombustibles en masa se lleva a cabo su cultivo controlado en plantas en tierra firme. Diversas son las causas que llevan a ello:

Por un lado se asegura la obtención de la variedad de microalgas adecuada en función de la utilidad que se quiera obtener de ella. Se estima que existen más de 300 000 especies de algas, pero pocas de ellas poseen las características necesarias para hacer viable la producción de biocombustibles con fines comerciales.

Por otro lado, “el cultivo asegura la producción del volumen de microalgas necesario controlando aspectos como la extensión del cultivo y su rendimiento. Optimizando las necesidades vitales de las microalgas es posible obtener una reproducción mucho más rápida de lo que se obtendría en estado natural.” (Cañavate, 2008)

2.2.4. Métodos de cultivo

Según Barraza (2009); indica que entre las formas de producir microalgas se pueden encontrar:

A. Estanques de microalgas

A.1. Cultivo en estanques al aire libre: La forma más simple de cultivo. Se trata básicamente de piscinas descubiertas expuestas al sol. Al agua de estas

piscinas se suministra nutrientes para que las microalgas puedan reproducirse a un ritmo acelerado. Es el sistema menos eficiente aunque el más económico. Sin embargo, a nivel industrial no resulta rentable.

A.2. Cultivo de tanques en invernadero: Los tanques de agua en los cuales se reproducen las microalgas están protegidos por invernaderos. Las ventajas de este sistema son un mejor control de la temperatura y una pérdida muy reducida de agua. Estos factores favorecen una mayor reproducción de las algas y por lo tanto un mayor rendimiento. Existen empresas productoras que optan por este sistema por considerarlo en un buen equilibrio entre la eficiencia de producción y los costes.

B. Los fotobiorreactores

B.1. Cultivo en fotobiorreactores: Los fotobiorreactores son conductos transparentes aislados del exterior en los cuales se desarrollan las microalgas. Estos tubos se colocan al exterior para captar mayor cantidad de radiación solar. En los fotobiorreactores las microalgas no sólo reciben la radiación natural, sino que aprovechan también la radiación artificial. Esta es su gran ventaja frente a los estanques. Sin embargo, ello supone unas instalaciones y unos costes económicos y energéticos adicionales que son muy importantes. Los fotobiorreactores pueden ir situados también dentro de invernaderos de plástico o de cristal, para así disponer de una temperatura ambiente más elevada.

B.2. Tipos de fotobiorreactores:

- Tubos plásticos o de vidrio de forma triangular: Gases como CO₂ y O₂ se hacen fluir desde la parte baja de la hipotenusa y algas con medio de cultivo se hacen fluir en el sentido opuesto.

- Fotobiorreactores tubulares en forma horizontal: Son tubos de acrílico en el que se hace circular en forma horizontal medio de cultivo más algas para que están no precipiten y todas reciban la misma cantidad de luz y nutrientes.

- Columna vertical de burbujas: Se genera circulación del medio con algas en una columna vertical a través del flujo de gases como dióxido de carbono. Se ilumina a través de tubos de luz a lo largo del tubo, cuyo objetivo es disminuir el costo del cultivo de algas a gran escala y hacerlo más simple.

- Equipos de fermentación: Algunas compañías obtuvieron aceite de algas sin crecimiento fotosintético, sino alimentando a las algas con azúcares que luego estas fermentaban. Una de estas compañías se llama Solazyme, una empresa de biotecnología que está desarrollando técnicas para producir combustible para autos y aviones a partir de algas.

Cuadro 1. Métodos de cultivo de microalgas.

Sistemas de producción de microalgas para biodiesel o bioetanol			
Sistema			
Estanques	Al aire libre, abiertos		Con remoción de agua
			Sin remoción de agua
	En invernadero	De cristal	Con remoción de agua
			Sin remoción de agua
		De plástico	Con remoción de agua
			Sin remoción de agua
Biorreactores y forobiorreactores	Plásticos		
	Vidrios		

Cuadro 2. Tipos de estanques de microalgas.

Sistemas de producción de microalgas para biocombustibles en estanques			
Sistema		Ventajas	Inconvenientes
Al aire libre, abiertos (open)		Costes de instalación menores	Control de CO ₂
		Costes de mantenimiento mayores	Control de otras variables
En invernadero	De cristal	Mejor control de variables, se intentan asemejar a los biorreactores	Costes de instalación y mantenimiento más altos. Más duraderos
	De plástico		Costes de instalación y mantenimiento más bajos. Menos duraderos.

2.2.5. Crecimiento Microalgal

Según Cañavate (2008); menciona que las microalgas son organismos que viven en el agua (agua dulce o agua salada) o en ambientes terrestres de elevada humedad.

El papel de las algas en la naturaleza es de suma importancia ya que, gracias a la fotosíntesis, son capaces de transformar la materia inorgánica en materia orgánica utilizando para ello la energía del sol.

En el proceso de la fotosíntesis, empleando la energía del sol, se combina el CO₂ atmosférico con el agua y como resultado se produce oxígeno que se libera a la atmósfera y azúcares que la microalga empleará para producir distintas sustancias como celulosa que conforma su estructura, aceites, etc.

Se ha demostrado que factores ambientales como el pH, la salinidad, temperatura, intensidad de luz y nutrientes en el medio afectan la productividad de biomasa y lípidos, que son los principales factores que limitan la producción a nivel industrial de biocombustibles a partir de microalgas. (Huang *et al*, 2010) Asimismo, se necesita aireación para forzar el movimiento de las microalgas

para que puedan captar eficientemente los nutrientes. El aire puede ser distribuido por un aireador (blower). Para distribuir el aire en los sistemas de cultivo es común utilizar líneas de PVC con válvulas y se recomienda la utilización de filtros. Existen gran variedad de tipos de filtros que se pueden utilizar por mencionar: millipore, de fibra, de tierra de diatomeas, empaques de algodón y carbón activado. Además de estos filtros, una manera confiable, barata y sencilla de hacer un filtro es utilizar un tubo de PVC, relleno de algodón en sus extremos y carbón activado en el centro. El utilizar filtros ayuda a disminuir la carga bacteriana y partículas que entren evitando así el contacto con el cultivo. (TECNOPLADES, s.f.)

2.2.6. Medio de cultivo

Menciona Barraza (2009) que las materias primas para la producción de biodiesel con microalgas debemos contar con los siguientes productos:

-Agua

Para los cultivos de microalgas es necesario contar con grandes volúmenes de agua, para el crecimiento y producción de etanol. Las fuentes de agua pueden ser: aguas salinas provenientes del mar, aguas dulces (ríos, lagos u otros) o aguas residuales provenientes del sector agropecuario. En el caso de aguas residuales, las cuales poseen nitrógeno y fósforo el aporte de nutrientes es menor. Debido a que el agua no se contamina en el proceso de producción de etanol, es reutilizable casi en su totalidad. Por lo que no es un requisito estar en presencia de un flujo continuo de agua.

-Nutrientes:

Según F. Merino (comunicación personal, 12 de febrero, 2015), se utilizará Urea como fuente de Nitrógeno (N), Cloruro de potasio (KCl) como fuente de Potasio (K), Superfosfato simple de calcio (SPC) como fuente de Fosforo (P) y el Patrón Clavo como fuente de Hierro (Fe).

Para la preparación de las soluciones de N, K y P, se realizara la dilución de los insumos con agua destilada teniendo en cuenta las siguientes proporciones:

- Se preparara aprox. 1Lt. de SOLUCION NITROGENO, para lo cual se pesará 352 gr. de Urea y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.
- Se preparara aprox. 1Lt. de SOLUCION POTASIO para lo cual se pesara 380 gr. de Cloruro de potasio y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.
- Se preparara aprox. 1Lt. de SOLUCION FOSFORO para lo cual se pesara 110.8 gr. de Superfosfato simple de calcio y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.

Para la preparación del Patrón Clavo se utilizara 5 gr. de clavos (pul. 000) y serán desintegrados en 200 ml ac. Muriático para luego aforar en 1 Lt. de agua destilada.

Para Obtener de esta forma los medios que serán utilizados como fuente única de nutrición para el desarrollo poblacional de las microalgas, siendo conservadas a 1°C.

De la misma manera, H. Arbildo (comunicación personal, 20 de mayo, 2015) menciona que se pueden utilizar fertilizantes comerciales, como el abono foliar (medio NPK) que se pueden adquirir en las tiendas de agro-veterinaria.

2.2.7. Experiencias en cultivos de microalgas

Presumiblemente, el primer uso de las algas fue como comida. Un ejemplo es la envoltura del sushi. Otras especies también son comestibles, tal como la Spirulina y la Dulce (*Palmaria palmata*). La Dulce es un alga roja comercializada particularmente en Irlanda y Canadá atlántico. Se come cruda, fresca, seca o cocinada como espinaca.

La Spirulina es un alga cianófito con una gran historia como fuente de alimentos en África Oriental y México precolonial. Debido a su alto contenido en proteínas y otros nutrientes, se usa comúnmente como suplemento alimenticio y como tratamiento para la desnutrición.

La Chlorella, otra microalga popular, tiene una composición nutricional similar a la de la Spirulina, pero es única por ser la fuente del "factor de crecimiento de la "Chlorella", un fitoquímico potente que ha mostrado el aumentar el crecimiento en animales y niños, y una pared celular con afinidad para los metales pesados y venenos, particularmente Mercurio (elemento). La pared celular se une a la toxina y la remueve del cuerpo. La Chlorella es muy popular en Japón y es uno de los suplementos más prescritos en el país.

La Porphyra, también es recolectada y usada en varias de formas. La industria de gomas marinas o ficocoloides requiere de la producción sostenida de algas marinas, las cuales en su mayoría provienen de granjas en el mar. En las regiones tropicales, el cultivo de algas marinas tiene un gran impacto socioeconómico debido a que genera empleo directo a más de 60 mil familias en el SE de Asia (principalmente Filipinas, Indonesia, Malasia y Vietnam), África Oriental y más recientemente en la India. La principal especie que se cultiva es

el alga roja *Kappaphycus alvarezii* productora de kappa-carragenina, una goma o coloide de amplio uso como estabilizante en la industria de alimentos, cosméticos y medicamentos.

En la región del Caribe y Brasil, *K. alvarezii*, también conocida comercialmente como *Eucheuma cottonii* o simplemente *cottonii*, ha sido introducida desde hace más de 20 años con miras a generar empleo y diversificar las actividades económicas de comunidades costeras deprimidas. Experiencias en la península de Yucatán (México), Cuba, Venezuela, Colombia y Brasil han dado resultados favorables y es posible crear nuevas industrias con integración vertical para su procesamiento local y sustitución de importaciones.

Los métodos y sistemas de cultivo de algas empleados en mar abierto son simples y económicos, ya que no requieren los insumos tradicionales de la agricultura, evitando el uso de fertilizantes y pesticidas. Se usan balsas flotantes de madera y PVC con cuerdas de polipropileno para sujetar los implantes que crecen de manera vegetativa con ciclos de producción que varían entre 4 y 6 semanas, dependiendo de la fertilidad de lugar, la época del año y la cepa utilizada.

Desde el punto de vista ambiental y ecológico, el cultivo de algas marinas sirve de sustrato y refugio a muchas especies de peces e invertebrados que cumplen parte de su ciclo de vida, las algas además generan oxígeno disuelto aumentando la productividad primaria.

Un equipo de expertos de la Universidad de Jaén (UJA), encabezado por Sebastián Sánchez Villasclaras, ha iniciado un estudio de investigación dirigido

a la limpieza de aguas residuales terciarias a través de la microalga *Botryococcus braunii*, que produce grandes cantidades de hidrocarburos líquidos.

Las empresas de capital riesgo de Estados Unidos han decidido dar la espalda al etanol procedente del cultivo de maíz e invertir en productores que utilicen algas.

La ministra de Ciencia e Innovación, Cristina Garmendia, dentro del presupuesto extraordinario de 490 millones de euros que su departamento destinará a inversiones del Plan E (Plan Español para el Estímulo de la Economía y el Empleo), 23 millones tendrán como objetivo la construcción de un centros de investigación de algas para la captación de CO₂ y producción de biocarburantes.

El reto de la producción a gran escala de microalgas con fines energéticos ha sido asumido a escala global por un gran número de empresas, y los avances en este campo se producen con rapidez. Algunos ejemplos son el reciente anuncio, realizado por la empresa Solazyme, de producción del primer keroseno de aviación producido a partir de biomasa de algas; la iniciativa del Carbon Trust británico destinando 26 millones de libras al desarrollo de estas tecnologías o bien el interés de la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzados de Defensa (DARPA) norteamericana en las aplicaciones en el ámbito militar.

Actualmente, el desarrollo en España de tecnologías de producción de algas para su uso energético empieza a salir del ámbito de la investigación pura con el anuncio de la puesta en marcha de las primeras plantas comerciales. Estas son las de Muchamiel, que promueve la empresa alicantina BFS con el objetivo

de producir energía eléctrica en una instalación de 30 MW de potencia, y la de Jerez de la Frontera, donde Aurantia, a través de la sociedad Celulosa Investment, pretende producir biocarburantes y otros productos en una instalación que serviría a la vez como sumidero de parte del CO₂ emitido por la fábrica de cemento que Holcim tiene en esa localidad andaluza. (Wikipedia, 2014)

A nivel nacional el IMARPE realiza estudios del cultivo de microalgas en fotobiorreactores. En una de las investigaciones como en el caso de Ynga (2011) evaluó la influencia del impacto lumínico-térmico y el pH, donde los valores de pH promedio estuvieron entre 8 y 10,6; mientras que la temperatura promedio osciló entre los 22 y 30 °C, en la producción masiva de la microalgas *Nannochloropsis sp.* cepa IMP-LBA-009, en biorreactores tubulares verticales al interior de un invernadero, donde obtuvo biomasa seca y húmeda con un promedio de 0,13 y 0,48 g/L con una razón del 28% de conversión.

2.2.8. Extracción de exopolisacáridos en microalgas

El procedimiento que empleó Díaz (2012) para extraer los exopolisacáridos del cultivo fue el de centrifugación, filtrado, dializado y liofilización de la biomasa seca.

2.2.9. Disrupción celular

Los procesos claves implicados en la cadena de producción de bioetanol a partir de microalgas son el cultivo, cosecha, extracción (disrupción celular) y la extracción de los exopolisacáridos. Aunque todos estos pasos son esenciales,

la disrupción celular es particularmente importante ya que el rendimiento de los procesos de extracción está íntimamente relacionado con este paso. (Lee *et al*, 2010)

La disrupción de las células se efectúa con el propósito de liberar los productos intracelulares de interés (Brenan y Owende, 2010) Entre los métodos más usados para este fin se encuentran métodos físicos y químicos, como el ultrasonido, autoclave, homogeneizadores de alta presión, lisis ácida, lisis alcalina, y choque osmótico (Mata *et al*, 2010).

A. Disrupción celular térmica

Sarmiento y Amaya (2010) sometieron 3 g de biomasa seca a un proceso de disrupción celular térmica en autoclave esterilizadora eléctrica a 15 psi y 121 °C durante un tiempo de 1 h y 3 h respectivamente. Concluyendo que el tiempo más óptimo para la disrupción celular es de 3 horas.

B. Disrupción celular química

Sarmiento y Amaya (2010) trataron con 3 g de biomasa con diferentes concentraciones de HCl: 0,1 M; 0,5 M; 1 M y 3M; concluyendo que a concentraciones mayores a 0,5 M este efecto es menos pronunciado con tendencia a estabilizarse.

2.2.10. Sacarificación de los exopolisacáridos

La sacarificación es un procedimiento mediante el cual los almidones y materias celulósicas se hidrolizan y convierten en azúcares fermentables.

Los agentes empleados en la sacarificación son químicos o enzimáticos o bien una combinación de los dos. Entre los primeros está la utilización de

ácidos diluidos, particularmente el HCl. Entre los procedimientos enzimáticos están la malta y otras de origen microbiológico como el salvado enmohecido y la amilasa de los mohos.

El salvado enmohecido se obtiene por crecimiento de *Aspergillus orizae* sobre salvado esterilizado y húmedo. Para sacarificar una determinada cantidad de masa de cereal se requiere menos salvado enmohecido que malta; al final los rendimientos son similares.

Las amilasas de hongos se emplean en la sacarificación de granos para la producción de alcohol industrial. El hongo empleado en la obtención de estas amilasas es el *Aspergillus niger*. (UNAD, 2009)

2.2.11. Fermentación alcohólica de los azúcares

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno - O₂), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, sirve con cualquier sustancia que tenga la forma empírica de la glucosa, es decir, que sea una Hexosa.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: CH₃-CH₂-OH), dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se

empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible. (Wikipedia, 2015)

2.2.12. Obtención del bioetanol de los polisacáridos

El bioetanol se puede producir por diferentes vías, que pueden ser: biológicas, químicas y térmicas. Los principales procesos de obtención son fermentación biológica o síntesis química. (The Royal Society, 2008).

Las rutas térmicas y químicas dependen de la gasificación de la biomasa para utilizarla en la síntesis del etanol.

- **Conversión por gasificación térmica:** reduce la materia orgánica (biomasa) en gas de síntesis, que está compuesto por una mezcla de hidrógeno y monóxido de carbono. El etanol puede ser sintetizado directamente del gas de síntesis mediante un proceso químico o, el gas podría alimentar a un proceso de fermentación biológica. (Subramani & Gangwal, 2008).

- **Síntesis química:** El etileno es modificado químicamente por hidratación catalítica con ácido sulfúrico como catalizador, obteniendo una mezcla de etanol y agua que posteriormente se destila para su purificación. Dentro de sus ventajas se encuentra que es más económico que la fermentación tradicional, sin embargo, no es muy utilizado (5% de producción mundial). (Demirbas, 2005).

- **Fermentación biológica:** Consiste en utilizar microorganismos que procesan los azúcares fermentables para su alimentación, obteniendo como productos alcohol etílico y otros subproductos. Todo el proceso de fermentación utiliza tres pasos: (a) preparar una solución de azúcares fermentables, (b) la

fermentación de los azúcares para bioetanol, y (c) la separación y purificación del etanol, por lo general por destilación. La fermentación biológica es el proceso más utilizado para obtener etanol. (The Royal Society, 2008).

Todo tipo de biomasa puede ser utilizada en cualquiera de los métodos, aunque para el caso de alimentos con azúcares y almidón tiende a utilizarse el proceso biológico. La fermentación puede ser realizada en forma directa por azúcares fermentables, o de manera indirecta convirtiendo hidratos de carbono como el almidón y la celulosa, por hidrólisis, en azúcar. La hidrólisis es un proceso de tratamiento de la materia prima que consiste en romper los enlaces O-glucosídicos de las fracciones de la hemicelulosa y la celulosa en componentes monoméricos como: pentosas y hexosas, que después del tratamiento pueden ser fermentadas para producir el bioetanol. (Galbe & Zacchi, 2002). La hidrólisis se clasifica en dos tipos: hidrólisis química y enzimática. La hidrólisis química se lleva a cabo en medio ácido (diluido ó concentrado), un ejemplo es el tratamiento del almidón ó celulosa, mientras que la hidrólisis enzimática utiliza extractos de enzimas para descomponer los polisacáridos, ejemplo el tratamiento de la malta. (Regalbutto, 2009).

La producción de etanol a partir de algas es principalmente por su fermentación de azúcares. Sin embargo, en detalle, que sigue los siguientes pasos: primero las especies cultivadas fueron mencionados por la acuicultura, después de que se cosechan y se descomponen por romper las paredes de las células y la liberación de polisacáridos. Se hace la sacarificación de almidón y, finalmente, para utilizar microorganismos tales como levaduras y bacterias, para

llevar a cabo la fermentación de la descomposición de la biomasa. Por lo tanto, el etanol se produce y se separa del resto de la solución. (Yo As, 2014)

2.2.13. Cultivo de microalgas como MDL

Las aplicaciones productivas y comerciales de las microalgas son numerosas, van desde la producción de suplementos alimenticios y nutricionales de consumo humano y animal hasta la obtención de productos activos para la industria farmacéutica y cosmética.

Las microalgas pueden llegar a ser una fuente renovable de bio-combustible pues producen, biodiesel, bioetanol, metanol e hidrógeno, además de servicios medio ambientales como tratamiento de aguas residuales. Aunque el tema no ha sido profundizado en Colombia, las condiciones climáticas del país lo hacen apto para su producción y así determinar la viabilidad del proceso. Su aplicación traería beneficios económicos y ambientales a las industrias nacionales al efectuar proyectos de Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL), y a su vez se pueden obtener subproductos del cultivo de microalgas de gran valor.

El dióxido de carbono es uno de los Gases Efecto Invernadero (GEI) que se genera debido a las diferentes actividades realizadas por las industrias, que incrementan su concentración en la atmósfera y contribuyen al calentamiento global.

La aplicación de esta tecnología por las industrias nacionales les permitiría implementar proyectos de Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL), crear un bien ambiental viable, una asistencia financiera para la promoción del desarrollo sostenible y beneficios adicionales según los protocolos de Kyoto y

Copenhague. Por otro lado, se puede obtener subproductos como fertilizantes, alimento para animales, bio-combustible, según el del microorganismo empleado. (Cynthiana, 2014)

2.2.14. Experiencias de la obtención de bioetanol de microalgas

En la universidad de Medellín, Colombia, en el año 2012, se realizó un proyecto de producción de bioetanol de tercera generación mediante la extracción de exopolisacáridos del cultivo de la microalga *Botryococcus braunii*.

Chile es el más nuevo en este transitar por las energías [renovables](#). [SciDev.Net](#) reseña que con una inversión público-privada de US\$ 31,6 millones, este país apostará por la investigación y el desarrollo de tecnologías con algas y estiman contar, en tres o cuatro años, con éstas como fuentes renovables de biocombustibles. Lance Ayrault de Biofiels, responsable de este proyecto, anunció que esperan “producir hasta 50 millones de galones de etanol al año, equivalente al 5% del total de gasolina que emplea Chile actualmente”. (Velazco, 2013)

Existen docenas de compañías en el mercado intentando la producción de biocombustible a partir de algas, pero la mayoría se ha centrado en el cultivo de microorganismos de los que extraer los aceites que serán refinados en biodiésel o combustible para aviación. Algenol, sin embargo, selecciona algas marinas que genéticamente reúnen las mejores condiciones para convertir la mayor cantidad posible de CO₂ en etanol, usando un proceso que no requiere cosechar para recoger el combustible. Las cianobacterias producen pequeñas cantidades de

etanol de manera natural, pero sólo bajo condiciones anaerobias, cuando el alga carece de alimento o está en la oscuridad. (Anónimo, 2009)

2.2.15. Metodología para la extracción de exopolisacáridos de las microalgas

Según Gonzáles (2013) se realiza un cultivo de las cepas, utilizando 50 ml como inóculo de cada cepa para erlenmeyers de 500 mL, luego se realiza una agitación: 100 rpm, bajo condiciones de luz: blanca ($2 \pm 0,1$ KLuxes) para realizar un foto-período continuo con una temperatura del laboratorio entre 25-30°C además de un suministro periódico de CO₂ 1% y una fuente de nitrógeno 8 mM Nitratos

Luego se realiza un monitoreo de producción de biomasa, cada 3 días durante 45 días. Luego para una Muestra de 2 mL se procede a realizar una centrifugación a 12000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Y luego se seca a 70°C durante 12 h.

Se realiza un cultivo en fotobiorreactor de Columna de burbujeo de 10L, con las mejores condiciones de cultivo y se usa a un 80% de volumen de trabajo con todos los parámetros críticos debidamente controlados (pH, temperatura, agitación, condiciones de iluminación, etc.)

Para la extracción de polisacáridos Muñoz (2006) empleó la siguiente metodología:

Diez gramos de cada alga seca y molida se extraen individualmente con 200 mL de agua destilada con agitación continua por 4 h a 25°C. El tejido algal se remueve por filtración simple, para ser utilizado a un segundo paso de extracción con agua destilada a 80°C y agitación continua por 2 h. Ambos

extractos acuosos se centrifugan individualmente hasta obtener soluciones clarificadas. Cada extracto se precipitó por adición de 3 volúmenes de etanol. El precipitado se recupera por centrifugación y se seca en una estufa eléctrica a 50°C.

2.2.16. Metodología utilizada en el proceso de obtención en la producción de bioetanol

Según González (2013) una metodología utilizada en el proceso de obtención de etanol es la siguiente:

Para conversión y fermentación de los exopolisacáridos se utilizan catalizadores inorgánicos (ácidos o bases fuertes). Luego se realiza una fermentación mediante levaduras luego se realiza una centrifugación, destilación y deshidratación para finalizar determinando pureza y calidad en términos de pH, porcentaje de humedad y % de cloruros, sulfuros, metanol, mediante HPLC.

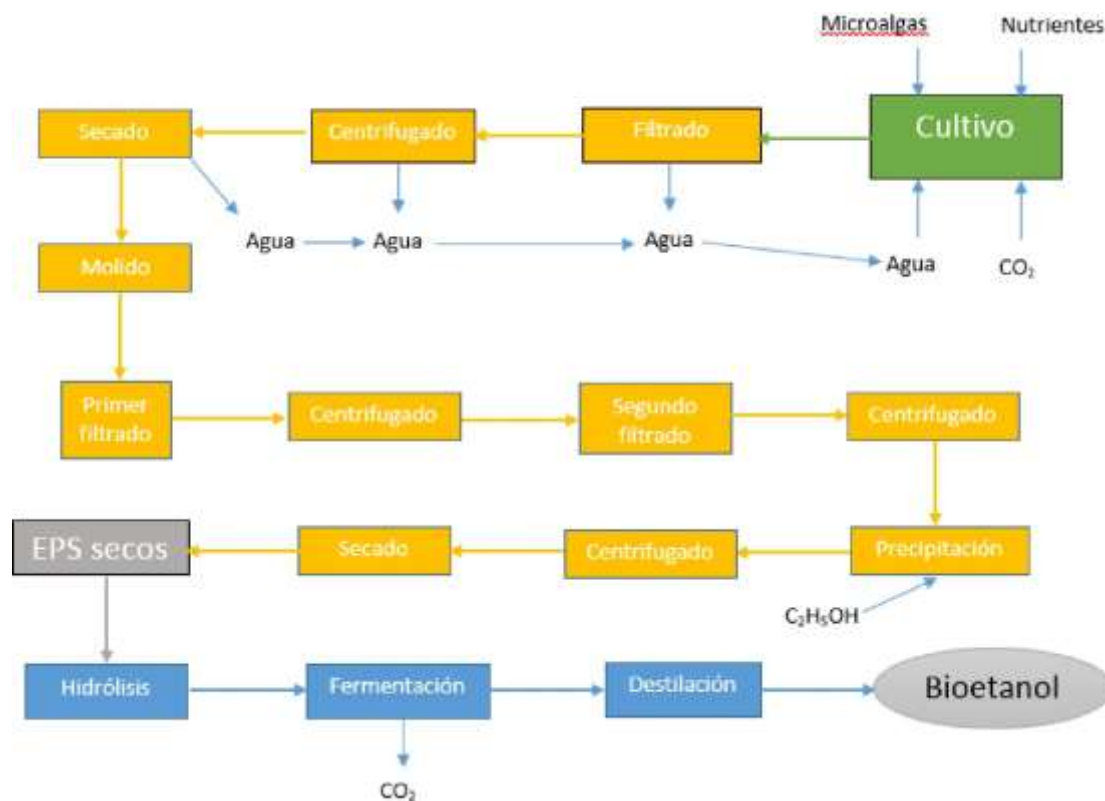


Figura 1. Diagrama de flujo de producción de etanol a partir de algas

2.2.17. Medición de la pureza y calidad del etanol

Se medirán en términos de pH, porcentaje de humedad y % de cloruros, sulfuros, metanol, etc. (Díaz, 2012)

2.2.18. Ventajas del cultivo de microalgas frente a los cultivos energéticos tradicionales para la producción de biocombustibles

Sitio Solar (2012) menciona que para la producción de biocombustibles las microalgas presentan una serie de ventajas importantes con respecto a los otros productos agrícolas que se emplean en la actualidad:

-El nivel de productividad es mucho mayor que empleando cualquier otro tipo de materia prima. Las microalgas son organismos que en condiciones

adecuadas se desarrollan a gran velocidad y completan su ciclo de vida en un tiempo mucho menor que los cultivos tradicionales. Se estima que la productividad de biocombustibles a partir de las microalgas es de entre 20 y 80 veces superior que a los producidos a partir del maíz, la soja o la caña de azúcar. Algunas empresas aseguran que con sus métodos, la producción de biomasa de algas (de la cual se pueden extraer diversos productos) es miles de veces superior que en el caso de los cultivos de soja, girasol o palma. Conviene, sin embargo, a falta de más información, estimar como más fiable el primer dato ofrecido.

-No se emite CO de más a la atmósfera. Las microalgas en su desarrollo requieren CO₂ que toman de la atmósfera capturándolo en sus moléculas. En el momento de su combustión ese CO₂ tomado se libera devolviéndolo al aire. Por lo tanto se libera tanto CO₂ como el que el alga tomó en su desarrollo resultando el balance final igual a cero. Varios diseños de plantas de producción de microalgas proyectan emplear las emisiones de CO₂ de las centrales termoeléctricas para insuflarlas en los cultivos y acrecentar la producción.

-La producción de biocombustible a partir de microalgas no afecta en absoluto al mercado de alimentos. Actualmente se están destinando grandes partidas de cereales para producir bioetanol y biodiesel lo que provoca que estos escasén y que se eleve su precio en perjuicio de la industria alimenticia y sobretodo de las sociedades más pobres. Obtener combustibles a partir de las algas permitirá que los cereales se usen exclusivamente para fines alimentarios y que los precios se mantengan más bajos.

-Para el cultivo de microalgas no se destruyen bosques ni selvas. La inmensa demanda de biocombustibles elaborados a partir de cultivos tradicionales provoca la destrucción amplias zonas selváticas y forestales con el fin de ampliar la superficie cultivable. Esto repercute muy negativamente en nuestros ecosistemas.

Es perfectamente posible realizar el cultivo de microalgas en estanques localizados en áreas desérticas o en terrenos improductivos para cualquier otro tipo de vegetal. Existen de hecho en ejecución centrales de producción de microalgas para biocombustibles en desiertos aprovechando las excelentes cualidades de insolación que ofrecen.

DEFINICION DE TERMINOS BASICOS

- **Bioetanol:** Alcohol etílico que se obtiene a partir de biomasa de origen vegetal que contenga azúcares simples o algún compuesto que pueda convertirse en azúcares, como el almidón o la celulosa.

- **Bioquímica de la fermentación:** Proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno - O₂), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, sirve con cualquier sustancia que tenga la forma empírica de la glucosa, es decir, que sea una Hexosa.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: CH₃-CH₂-OH), dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible. (Wikipedia, 2015)

- **Biotecnología de punta:** Tecnología que fue desarrollada en forma reciente y que es de avanzada (es decir, que supone un adelanto o algo innovador respecto a los productos ya existentes) basada en la biología, especialmente usada en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, medio ambiente y medicina. Se desarrolla en un enfoque multidisciplinario que involucra varias disciplinas y ciencias como biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, física, química, medicina y veterinaria entre otras. Tiene gran repercusión en la farmacia, la medicina, la

microbiología, la ciencia de los alimentos, la minería y la agricultura entre otros campos.

- **Cepa de microalgas:** Conjunto de especies microalgales que comparten, al menos, una característica.

- **Centrifugación:** Método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria. La fuerza centrífuga es provista por una máquina llamada centrifugadora, la cual imprime a la mezcla un movimiento de rotación que origina una fuerza que produce la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad.

- **Cultivo de microalgas:** Actividad que consiste en la producción de organismos autótrofos que son el primer eslabón de la cadena trófica acuática (microalgas). Son una fuente directa de alimento de muchos animales filtradores (fitófagos) y larvas de peces carnívoros. También tienen otros usos para alimento humano, producción de biocombustibles, etc.

- **Destilación:** La destilación es una operación unitaria que consiste separar los distintos componentes de una mezcla mediante el calor. Para ello que se calienta esa sustancia, normalmente en estado líquido, para que sus componentes más volátiles pasen a estado gaseoso o de vapor y a continuación volver esos componentes al estado líquido mediante condensación por enfriamiento. El principal objetivo de la destilación es separar los distintos componentes de una mezcla aprovechando para ello sus distintos grados de volatilidad. Otra función de la destilación es separar los elementos volátiles de los no volátiles de una mezcla.

- **Disrupción celular:** También conocida como la **lisis celular**, que es el proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular.

a **Dializado:** Proceso que consiste en la separación de moléculas grandes de las pequeñas por filtración mediante un conjunto de pequeñas capas. También se pueden separar microorganismos de pequeñas moléculas como el agua.

a **Estanque:** Depósito artificial de agua con fines ornamentales o prácticos, como la cría de peces, el riego o cultivo de microalgas.

a **Etanol:** Compuesto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que puede utilizarse como combustible, solo, o bien mezclado en cantidades variadas con gasolina, y su uso se ha extendido principalmente para reemplazar el consumo de derivados del petróleo.

a **Exopolisacáridos (EPS):** Hidratos de carbono complejos que se excretan y acumulan por fuera de las células y dan al cultivo un aspecto mucoso.

a **Fermentación:** Proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere oxígeno, y el producto final es un compuesto orgánico.

a **Filtrado:** Proceso unitario de separación de sólidos en una suspensión por medio de un medio mecánico poroso, también llamados tamiz, criba, cedazo, filtro. En una suspensión en un líquido mediante un medio poroso, retiene los sólidos mayores del tamaño de la porosidad y permite el paso del líquido y partículas de menor tamaño de la porosidad.

a **Hidrólisis:** Reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química.

a **HPLC:** La cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a

veces cromatografía líquida de alta presión o cromatografía líquida de alta resolución (*high pressure liquid chromatography*) (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

- **Microalgas:** Microorganismos microscópicos (2-200 μm) fotosintéticos, también son polifiléticos y eucariotas, (excluyen, por tanto, las cianobacterias, que dejaron de considerarse auténticas algas al pasar al reino procariota) que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En general son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilización de la energía solar para producir biomasa.

- **Medio de cultivo:** Solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento microalgal.

- **Molido:** Consiste en el machacado de la biomasa seca. Se usa para obtener la harina de microalgas.

- **Precipitación:** Consiste en el humedecimiento de la biomasa seca algal.

- **Liofilizado:** Proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación.

- **Tratamiento de cultivo de cepas:** Operación que consiste en dar las condiciones que permitirán que las cepas puedan reproducirse en el cultivo.

- **Potencial energético como bioetanol:** Es la estimación de la cantidad de bioetanol producido para utilizar como biocombustible, a partir de materias primas que contiene carbohidratos; tales como: maíz, yuca, papa, caña de azúcar y las microalgas, que para el caso de la fuente de microalgas se mide en mg de etanol/l de biomasa

húmeda. Las microalgas de agua marina contienen un bajo contenido de exopolisacáridos en tanto que las microalgas de agua dulce tienen altos contenidos.

- **Potencial redox:** Forma de medir la energía química de oxidación-reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica. El potencial redox es positivo cuando se produce una oxidación y negativo cuando se produce una reducción. Normalmente, las reacciones redox vienen acompañadas de cambios de pH en el medio.

- **Sacarificación:** Procedimiento mediante el cual los azúcares, almidones y materias celulósicas se hidrolizan para convertirse en azúcares fermentables.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. METODO DE INVESTIGACION

El presente trabajo es un tipo de investigación **exploratoria experimental**.

3.1.1. Ubicación del trabajo de investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Artificial de Peces Amazónicos del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana ubicada en el Km 12,400 de la carretera Federico Basadre.

Correspondiendo la referenciación en las coordenadas de 08°23 39.6” de latitud sur 74° 34 39.8” longitud oeste, a 154 m.s.n.m.

3.1.2. Ecología y clima

Según el Sistema Holdrige, se clasifica como “bosque húmedo tropical” y según la clasificación de los bosques amazónicos pertenece al ecosistema “bosques tropicales semi-siempre verde estacional”. (Cochrane *et al*, 1982)

Las condiciones climáticas promedio, según Weatherbase (2007) para la zona de Pucallpa son:

- ◆ Temperatura máxima anual 37 °C.
- ◆ Temperatura media anual 30 °C.
- ◆ Temperatura mínima anual 21 °C.
- ◆ Temperatura mínima absoluta 11 °C.
- ◆ Precipitación promedio anual 130 mm.

◆ Horas de sol anual	112.8.
◆ Humedad relativa	80%.

3.1.3. Metodología

El trabajo de investigación se desarrolló de la siguiente manera:

A. Obtención de la cepa de microalgas

Se obtuvo la cepa del Banco de Cepas del IIAP – Ucayali, debidamente identificada para iniciar en detalle su cultivo a fin de lograr los objetivos propuestos en el estudio.

B. Preparación de los medios de cultivo

Se utilizaron los patrones: Urea como fuente de Nitrógeno (N) y CO₂ (por descomposición espontánea), Cloruro de potasio (KCl) como fuente de Potasio (K), Superfosfato simple de calcio (SPC) como fuente de Fosforo (P) y clavo como fuente de Hierro (Fe).

Para la preparación de las soluciones de N, K y P, se realizó la dilución de los insumos con agua destilada teniendo en cuenta las siguientes proporciones, conforme al protocolo del IIAP - Ucayali:

- Se prepara aprox. 1Lt. de SOLUCION NITROGENO, para lo cual se pesará 352 g de Urea y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.
- Se prepara aprox. 1Lt. de SOLUCION POTASIO para lo cual se pesa 380 gr. de Cloruro de potasio y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.

- Se prepara aprox. 1Lt. de SOLUCION FOSFORO para lo cual se pesa 110,8 g de Superfosfato simple de calcio y se diluirá en 1 Lt. de agua destilada.

- Para la preparación del Patrón Clavo se utiliza 5 gr. de clavos (pul. 000) para ser desintegrados en 200 ml ac. Muriático para luego aforar en 1 Lt. de agua destilada.

Luego de obtener de esta forma las soluciones de macro y micronutrientes que conforman el Medio H.M. la cuál fue utilizada como fuente de nutrición para el desarrollo poblacional de las microalgas, siendo conservadas a 1°C.

C. Producción masiva de microalgas

Es de gran importancia manejar las proporciones de agua e inóculo (cepas de microalgas) para su posterior y continuo desdoble.

Condiciones Químicas

Se tuvo que en cuenta la siguiente proporción para los cultivos:

Se agregaron conforme al modelo estadístico: 0.2 ml/l de abono foliar PANTER-A BALANCE, 0.2 ml/l de abono foliar MULTIFOLIAR 20-20-20. También: 1 ml. de SOLUCION NITROGENO+ 1 ml de SOLUCIONxs11 POTASIO + 1 ml. de SOLUCION FOSFORO + 1 ml de PATRON FIERRO se disolvieron en 1 l de agua más inóculo. Al testigo no se agregó ningún nutriente.

Condiciones Físicas

La aireación se realizó a través de una bomba de aire y sistema de aireación masiva (Blower) que ofrece una aireación constante durante las 24 horas del día.

El sistema de iluminación se realizó de forma artificial (fluorescentes), obteniendo un fotoperiodo de 24 horas ya que estas microalgas realizan la fotosíntesis para obtener la energía que les permita multiplicarse.

Conteo celular

El conteo celular es básico durante el manejo del cultivo en estudio, ya que ayuda a ver el comportamiento en cuanto a la velocidad de crecimiento poblacional expresado en células/campo. Para el conteo celular se requiere de una cámara Neubauer y un microscopio, para obtener conteos de células/campo de forma precisa.

D. Producción de etanol

Primera fase: Obtención de la biomasa húmeda

Se desconecta el sistema de aireación para dejar sedimentar la biomasa algal húmeda, después se procedió a extraerlo mediante sifoneo.

Segunda fase: Producción de etanol

-Hidrólisis: En un vaso de 1000 ml se introdujo la biomasa húmeda. Se usó para la hidrólisis HCl concentrado en solución acuosa, para la conversión de EPS a azúcares. Se ajustó a 3,5 debido a que es un valor óptimo para realizar posteriormente la fermentación con levadura, tal como lo menciona Verónica (2008) y se calentó a 100 °C durante 1 1/2 horas.

-Fermentación: La biomasa hidrolizada se colocó dentro de un balón de 1000 ml. Se usaron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* al 5% w/w, tal como lo menciona Harun *et al* (2012) y se cerró herméticamente conectando a una manguera, el otro extremo se introdujo en un recipiente con agua, para asegurar la salida del CO₂ y evitar el ingreso de oxígeno, tal como se ilustra en la Figura 24 (ver Anexos) por 3 días.

-Destilación: Se utilizó un equipo de destilación para la separación de la solución y el etanol.

-Rendimiento y pureza de alcohol combustible: Se midió la cantidad de alcohol producido mediante un alcoholímetro.

E. Diseño estadístico

Se empleó el diseño completo al azar (DCA) indicando como tratamiento 3 medios de cultivo, teniendo tres repeticiones como las observaciones para determinar el rendimiento en bioetanol. También se utilizaron las pruebas de rangos múltiples de LSD Fisher con 95% de grados de libertad para el tratamiento de las medias y con un $\alpha = 0.05$ utilizando el software InfoStat.

Modelo matemático

$$Y_{ij} = U + T_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : observación cuales quiera de la unidad experimental, que corresponde al i -ésimo tratamiento.

i : i -ésimo factor, 1 hasta n .

j : j -ésimo factor, 1 hasta n .

t : número de tratamientos.

n : número de repeticiones por tratamiento.

Donde:

U : Es el efecto medio.

T_i: Es el efecto del i-ésimo tratamiento

e_{ij}: error experimental.

Cuadro 3. Esquema del Diseño completamente al azar (DCA).

Observaciones (j)	Tratamientos (i)					Total
	1	2	3	...	t	
	Y ₁₁	Y ₂₁	Y ₃₁	...	Y _{t1}	
	Y ₁₂	Y ₂₂	Y ₃₂	...	Y _{t1}	
	Y ₁₃	Y ₂₃	Y ₃₃	...	Y _{t1}	
	⋮	⋮	⋮	
	Y _{1n}	Y _{2n}	Y _{3n}	...	Y _{tn}	
Total	Y ₁₁	Y ₂₁	Y ₃₁	...	Y _t	Y _{..}
Número de observaciones	N	N	N	...	n	
Media	Y _m	Y _m	Y _m	...	Y _m	Y _{m..}

Tabla 2. Esquema del ANVA.

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)
Tratamientos	3
Error	8
Total	11

3.2. POBLACION Y MUESTRA

Constituyen la población en la región Ucayali todas las microalgas de la especie *Chlorella sp.* La muestra fue proporcionada por el IIAP, debidamente identificada y correspondiendo a su extracción entre los meses de Julio y Agosto de 2014 de la

piscigranja 13. Las cepas se estudian para generar el crecimiento de microalgas que se utilizan en la alimentación de los peces en la fase post-larvaria.

3.3. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

3.3.1. Conteo celular (Aguilar, 1995)

La densidad celular se determinó mediante el uso de un Hematócmetro o cámara de conteo celular de Neubauer que es un dispositivo, mediante el cual se puede determinar el número de partículas suspendidas en un volumen conocido y de esta manera saber el número en el recipiente original.

La cámara de Neubauer es un portaobjetos de conteo para su uso en el microscopio óptico, con una depresión central en el fondo de la laminilla, en la que se ha marcado una retícula micrométrica. Es un cuadrado de 3 mm x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues, el área sombreada corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que, cuando se coloca el cubreobjetos, este dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la laminilla y el área reticulada es de 0.1 milímetro cúbico.

El proceso de conteo celular es el siguiente:

- Tomar 1 ml de la muestra del cultivo con la ayuda de una pipeta pasteur y colocarla en un vial.
- Fijar la muestra con lugol concentrado (1 gota) y homogenizar.
- Limpiar la cámara de conteo.
- Colocar una gota de la muestra en la cámara de conteo, tratando de que ésta se extienda uniformemente en toda el área.

- Observar la muestra a través del microscopio para la realización del conteo por triplicado, dicho conteo se realiza en los cuadrados del centro (Fig. 1), luego del cual se obtiene la media aritmética de sólo 5 cuadrantes y se lleva a la siguiente fórmula:

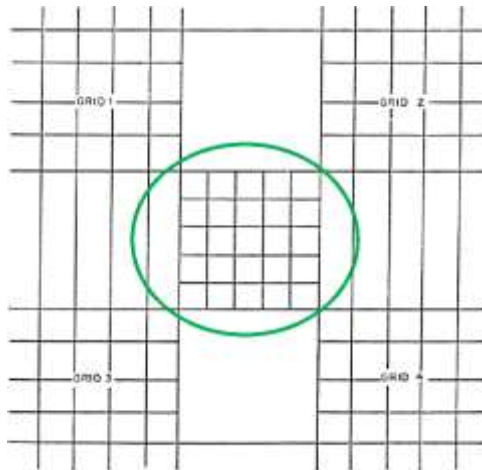


Figura 2. Cámara de Neubauer

$$\text{N}^\circ \text{ células por ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células de 5 cuadrantes centrales} \times 250000}{5}$$

Sin embargo, Burgos (2013) menciona que si la concentración es baja se contarán los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 como se muestra en la figura:

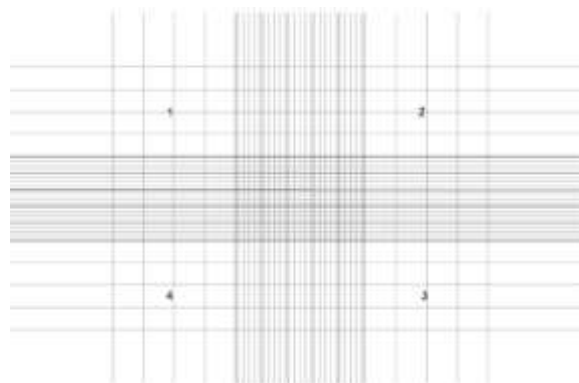


Figura 3. Cámara de Neubauer

Y se aplica la siguiente fórmula:

$$\#cel/ml = C \times 10000$$

Donde:

- C es el promedio de células contadas.

3.3.2. Medición de los parámetros fisicoquímicos del agua

Se usó un instrumento multiparamétrico donde se registraron pH, temperatura del cultivo (°C), temperatura ambiente (°C) y potencial redox (mV).

3.4. TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE

DATOS 3.4.1. Materiales

A. Material biológico y orgánicos (Microalgas)

- 1 cepa de microalgas (*Chlorella sp.*).

B. Materiales de escritorio

- Cuaderno de apuntes y lapicero.
- Guardapolvo de laboratorio.
- Guantes quirúrgicos.
- Cámara fotográfica.
- Etiquetas plastificadas.
- Tijera.
- Cinta de embalaje.
- Cinta masking tape.
- Pizarra acrílica.
- Plumones acrílicos.

C. Materiales de vidrio

- Vasos de precipitación (capac. de 250, 500 y 1000 ml).
- Pipetas (capac. de 1, 2, 5 y 10 ml).
- Balones (capac. de 250, 500 y 1000 ml).
- Porta y cubre objeto.
- Probeta (100 y 300 ml).

D. Materiales para la preparación de los medios de cultivo

- Urea.
- Cloruro de potasio.
- Clavo de 0.5 gr.
- Agua destilada.
- Ácido muriático.
- Medios NPK (abono foliar “PANTER-A BALANCE” y “MULTIFOLIAR 20-20-20”).

E. Materiales para el cultivo de microalgas

- Botellas plásticas de aprox, 3 y 7 litros.
- Baldes de 20 lt.
- Pali globos (blanco).
- Fluorescente.
- Termómetro.
- Piedras difusoras de aire.
- Manguera de silicona.
- Válvulas plásticas T para regular salida de aire.
- Paso de aire en formas T y X platicas.

-Ligas.

F. Materiales para la producción de etanol

-Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. -HCl

al 38%.

G. Equipos de

laboratorio -

Microscopio.

-Multiparámetro.

-Aireador (blower). -

Cámara de Neubauer.

3.4.2. Técnicas para la recolección de datos

- Instalar el sistema de cultivo conectando las mangueras de plástico con el aireador, luego estas se unen a los conectores de plástico de tipo válvula, y luego de tipo “t” o de tipo cruz. Estos conectores se pueden conseguir en tiendas para acuarios.

- Al agregar el inóculo para el cultivo previamente se debe agregar el medio nutritivo para enriquecer el agua con nutrientes.

- Para obtener mayor visibilidad en el comportamiento del cultivo con los tratamientos (aumento del verdor) se realizaron los cultivos en baldes de 20 litros donde fue evaluado el crecimiento poblacional de las microalgas con cada tratamiento.

- Se debe registrar el volumen y peso de la biomasa húmeda que se obtiene de los sedimentos.

- Medir el volumen de la muestra que será sometida a hidrólisis y del ácido que se usará.
- Se hizo un calentamiento lento en la destilación de tal manera que la temperatura de la muestra llegue a 80 °C sin que sobrepase.

3.5. PROCESAMIENTO PARA RECOLECCION DE DATOS

La distribución de los tratamientos se indica en el siguiente gráfico:

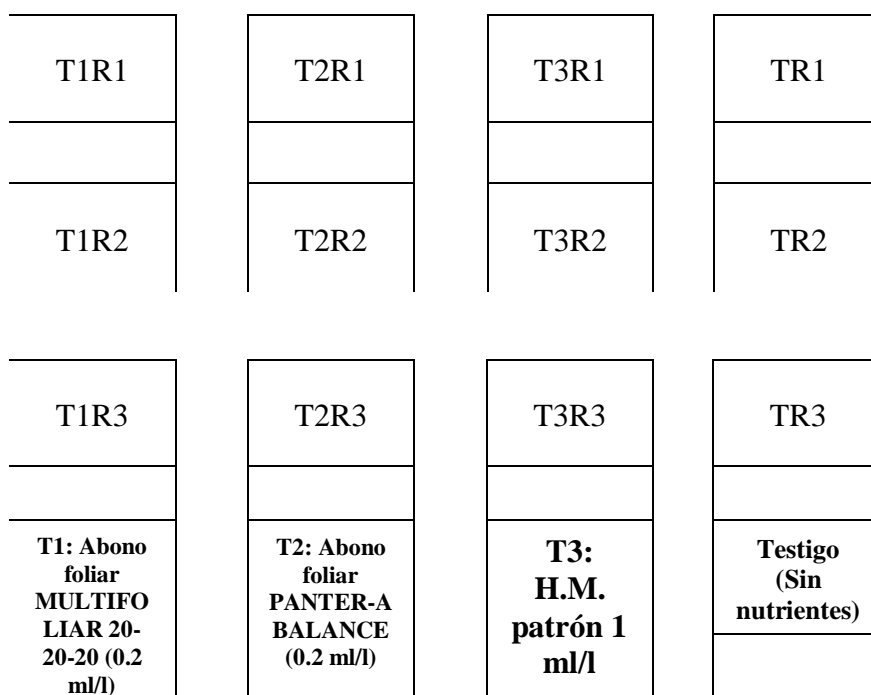


Figura 4. Distribución del área experimental

Unidades experimentales

Se utilizaron para las unidades experimentales baldes de 20 litros que estuvieron conectados al sistema de aireación “blower”.

3.6. TRATAMIENTO DE DATOS

Los resultados se presentan en Microsoft Excel y son representados conforme demande el análisis para la discusión correspondiente utilizando la disponibilidad que tiene el software InfoStat.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Matriz de resultados

El cuadro siguiente resume los resultados del presente estudio, los cuales se irán analizando conforme a todas las etapas que se trabajó:

Tabla 3. Matriz de resultados.

Biomasa	T1	T2	T3	Testigo (sin tratamientos)
Biomasa húmeda (g/lc)	3,96	2,63	4,33	0,39
Humedad (%)	72,5	75,35	70,15	78,25
Biomasa seca (g/lc*)	1,09	0,65	1,29	0,08
Alcohol (g/lbh**)	0,0232	0,0152	0,0256	0,00187

*lc: litros de cultivo.

**lbh: litros de biomasa húmeda.

4.2. Evaluación de los factores físicos y químicos, influyentes en el crecimiento poblacional de *Chlorella sp.*

Se registraron los factores físicos y químicos durante la fase experimental, teniendo en cuenta el pH, la temperatura y el potencial redox.

Tabla 4. Parámetros físico-químicos que se registraron en los tratamientos durante el periodo de cultivo, en las instalaciones del programa AQUAREC del IIAP Noviembre – Diciembre del 2015. Ucayali, Perú.

Día	Tratamiento 1				Tratamiento 2				Tratamiento 3				Testigo control			
	pH	T° cultivo (°C)	T° ambiente (°C)	Potencial redox (mV)	pH	T° cultivo (°C)	T° ambiente (°C)	Potencial redox (mV)	pH	T° cultivo (°C)	T° ambiente (°C)	Potencial redox (mV)	pH	T° cultivo (°C)	T° ambiente (°C)	Potencial redox (mV)
0	7.08	28.47	27.20	-12.77	7.13	28.20	27.20	-50.37	7.62	28.67	27.20	-76.07	7.81	28.50	27.20	-44.87
1	7.32	27.30	26.47	-27.07	8.37	27.90	26.47	-78.13	7.89	27.93	26.47	-49.53	7.65	29.30	26.47	-36.03
2	8.86	29.47	28.20	-102.70	7.95	29.13	28.20	-51.30	7.81	29.37	28.20	-42.73	7.48	30.03	28.20	-26.07
3	8.78	29.83	28.60	-81.33	7.65	29.30	28.60	-26.00	7.78	29.53	28.60	-37.83	7.55	29.60	28.60	-42.4
4	8.38	29.73	29.30	-73.70	7.02	30.77	29.30	-2.27	7.76	30.33	29.30	-35.90	7.59	30.40	29.30	-47
5	8.19	29.80	28.70	-68.77	6.53	30.60	28.70	29.20	7.56	30.00	28.70	-30.67	7.48	29.93	28.70	-26.63
6	8.44	30.83	29.50	-63.07	6.43	30.47	29.50	34.70	7.68	30.43	29.50	-17.77	7.14	28.87	29.50	-6.47
7	8.32	30.70	29.70	-65.83	6.39	30.63	29.70	37.83	7.61	30.53	29.70	-4.63	7.04	27.67	29.70	3.3
8	7.56	30.93	29.70	-47.10	6.33	31.93	29.70	41.07	7.56	31.00	29.70	14.00	7.33	30.87	29.70	-24.5
9	7.45	32.60	31.40	-27.03	6.31	32.33	31.40	39.67	7.55	32.47	31.40	-7.10	7.24	32.50	31.40	-20.67
10	7.40	32.40	31.20	-17.30	6.22	32.20	31.20	36.97	7.64	32.60	31.20	-14.97	7.10	32.37	31.20	-7.73
11	7.39	31.70	30.60	-18.33	6.21	31.67	30.60	36.37	7.53	31.57	30.60	-30.87	7.10	31.37	30.60	-12.77
12	7.33	32.60	31.63	-6.63	6.60	32.50	31.63	27.17	7.70	32.73	31.63	-35.13	7.04	32.73	31.63	3.3
13	7.36	30.23	29.00	-2.80	6.62	31.27	29.00	23.83	7.64	30.20	29.00	-35.37	7.36	30.53	29.00	-19.13

4.2.1. pH

En la Figura 5, se puede observar que la tendencia del pH en el cultivo utilizando el Tratamiento 1 llegó a su máximo en el día 2, con 8,86. Después comenzó a reducirse periódicamente durante el resto de los días.

También podemos observar que la tendencia del pH en el cultivo utilizando el Tratamiento 2 llegó a su máximo en el día 01, con 8,37. Después comenzó a reducirse periódicamente hasta el día 11 llegando a un mínimo de 6,21. En los días 12 y 13 hubo aumento.

Así mismo, se puede observar que el pH es casi constante en el Tratamiento 3, teniendo un máximo y mínimo de 7,89 y 7,53.

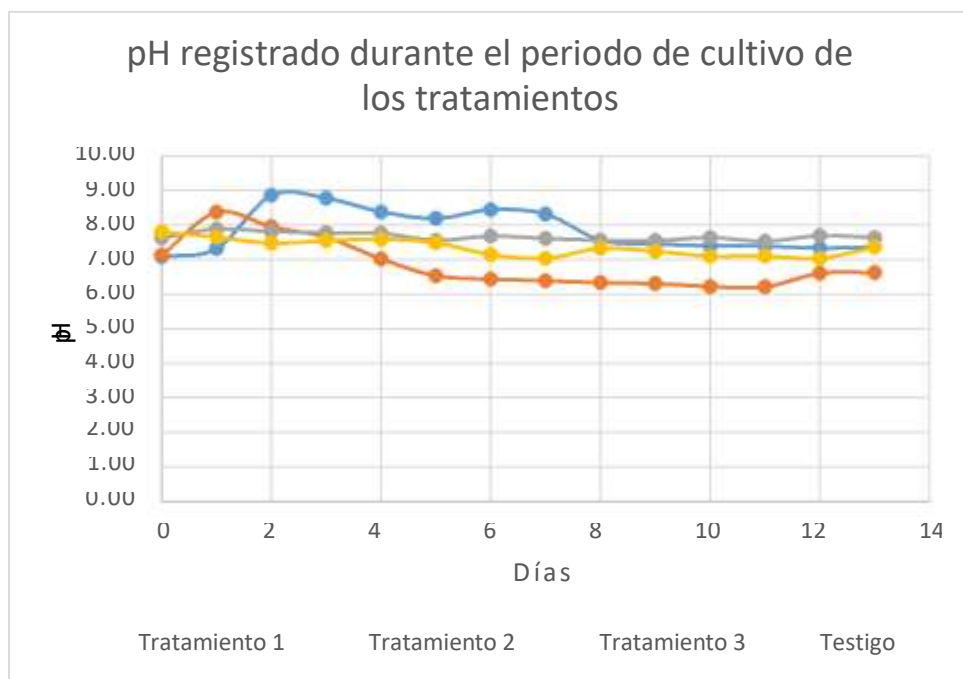


Figura 5. Influencia del pH respecto al crecimiento poblacional celular en los Tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de *Chlorella sp.*

El pH en el cultivo de las cepas de microalgas (*Chlorella sp.*) tiende al comienzo a incrementarse por un corto tiempo, observando la Figura 5 en el Tratamiento 3 esta tendencia prácticamente no existe, (es cuasiconstante) en tanto

que en el Tratamiento 1 se acentúa en mayor proporción que el Tratamiento 3 y el Tratamiento 2. Las tres curvas, luego del ascenso de pH tienden a disminuir y esta tendencia es mayor para el Tratamiento 1, le sigue la del Tratamiento 2 y nuevamente en el Tratamiento 3 esta tendencia es prácticamente mínima. La explicación físico-química de estos hechos observados está basado en que la descomposición del nutriente (urea) en CO_2 en el Tratamiento 3 este CO_2 descompuesto prácticamente es absorbido casi en su totalidad por la fotosíntesis que generan las microalgas en tanto que en T1 y T2 no hay absorción de CO_2 por las microalgas y el medio de cultivo tiende hacia un pH ácido por la presencia del CO_2 disuelto.

Los demás nutrientes utilizados, también tienen que disociarse en el medio acuoso y en la medida que su disociación iónica sea mayor la posibilidad y espontaneidad de que estos compuestos disociados puedan reorganizarse en nutrientes directamente asimilables por los vegetales (microalgas), los nutrientes serán mejor aprovechados como ocurre en el suelo en consecuencia entre el FeCl_3 y el KCl debido a sus altos potenciales de ionización estos proporcionarán los compuestos disociados suficientes para recomponerse y formar compuestos asimilables por las microalgas; sin embargo en el caso del FeCl_3 (microelemento esencial para la nutrición de los vegetales) son absorbidos cuando este se reduce (Fe^{+2}), resulta que la disociación del Fe^{+3} a Fe^{+2} se da en mayor proporción cuando el medio tiende al alcalino, en nuestro caso el medio de pH más estable es en el Tratamiento 3 por tanto hay suficiente disponibilidad de Fe^{+2} . Finalmente el nutriente limitante se da en el Superfosfato que proporciona Calcio y Fósforo y cuya disociación se da con más espontaneidad en medio de pH estable con tendencia a pH neutro, conforme a lo explicado por Daniels & Alberty (1980)

donde la energía generada por la disociación de los compuestos fosfatados tiene una tendencia a ser menor y en consecuencia a que estas disociaciones son más espontáneas.

En consecuencia, relacionando el pH con la producción de biomasa podemos observar que el pH cuando tiende a incrementar favorece a la mayor producción de biomasa tal como ocurre en el Tratamiento 1 frente al Tratamiento 2 y 3, respectivamente.

4.2.2. Temperatura

Las temperaturas han sido medidas diariamente durante los 14 días cuyos resultados los resumimos en la Figura 6:

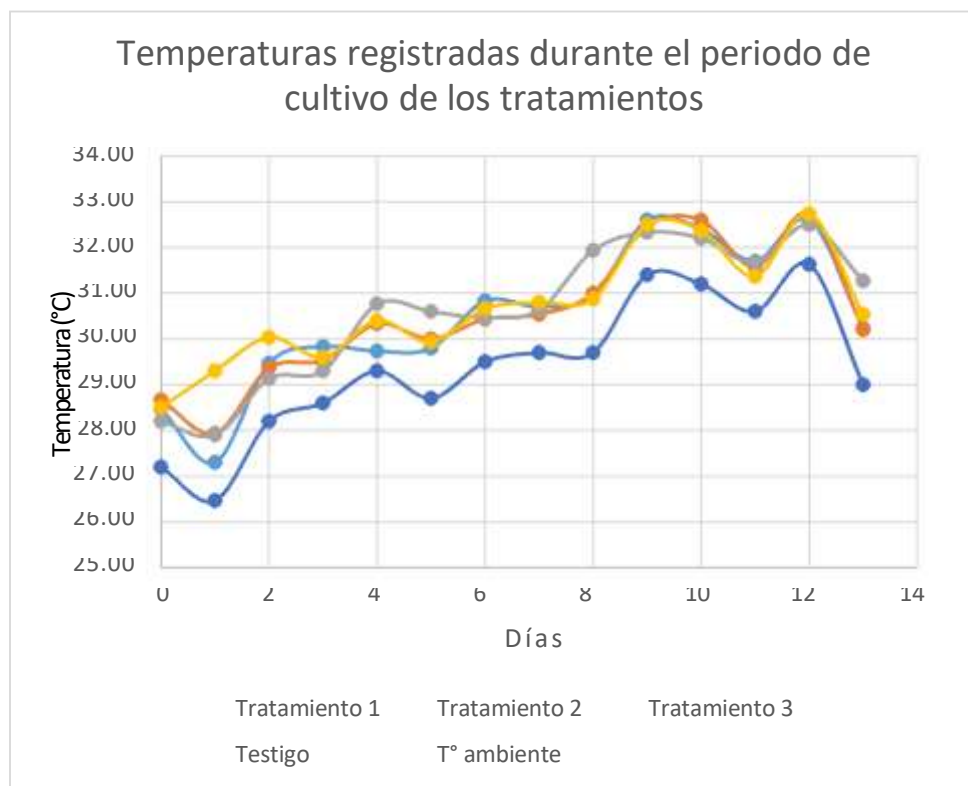


Figura 6. Influencia de la temperatura respecto al crecimiento poblacional celular en los Tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de *Chlorella sp.*

Se ha observado que a medida que transcurre el tiempo durante la evolución de la biomasa de las microalgas estas tienden al comienzo a descender correspondiéndole el mayor descenso al Tratamiento 1, luego a T3 y al T2. Se explica este hecho por la adición de los nutrientes que por tener mayor calor específico absorben la energía del medio hasta que las cepas de las microalgas empiecen a reproducirse y en esta circunstancia comienzan las reacciones de descomposición de los nutrientes, de la fotosíntesis y el incremento de la biomasa dejando un saldo energético residual que incrementa la temperatura del medio al respecto podemos añadir: De acuerdo con lo mencionado por Becker y Venkataraman (1982), en el que las Chlorococcales más utilizadas (*Chlorella* y *Scenedesmus*) ofrecen producciones máximas entre los 20 °C y los 25 °C; de acuerdo a lo experimentado, superan dichos parámetros, teniendo como temperatura promedio del ambiente y del cultivo 29,37 °C y 30,47 °C, es decir 4,37 °C y 5,47 °C de diferencia, en el cual el cultivo de microalgas se adaptó muy bien.

4.2.3. Potencial redox (Eh)

Dentro de una reacción redox siempre existe una sustancia que se oxida y otra que se reduce, lo que implica una transferencia de electrones entre las mismas. La reacción redox va acompañada por un intercambio de energía química, ya sea que se libere o que se almacene en los compuestos químicos implicados en el proceso, tal como lo menciona Albarrán (2008).

Se puede observar que el potencial redox tiene una estrecha relación con el pH. En la Figura 5 se pudo observar que el Tratamiento 1 en el día 2 alcanzó un pH máximo de 8.86, mientras que en la Figura 7 se pudo observar que en dicho

día el potencial redox alcanzó un mínimo de -102,70 mV, después comienza a aumentar periódicamente durante el resto de los días. En el Tratamiento 2 se pudo observar que en el día 1 alcanzó un pH máximo de 8.37, mientras que en la Figura 7 se pudo observar que en dicho día el potencial redox alcanzó un mínimo de -78,13 mV. Asimismo se puede observar en el Tratamiento 3 el potencial redox alcanza un mínimo de -71,43 mV en el día 1 y un máximo de 14 mV en día 8.

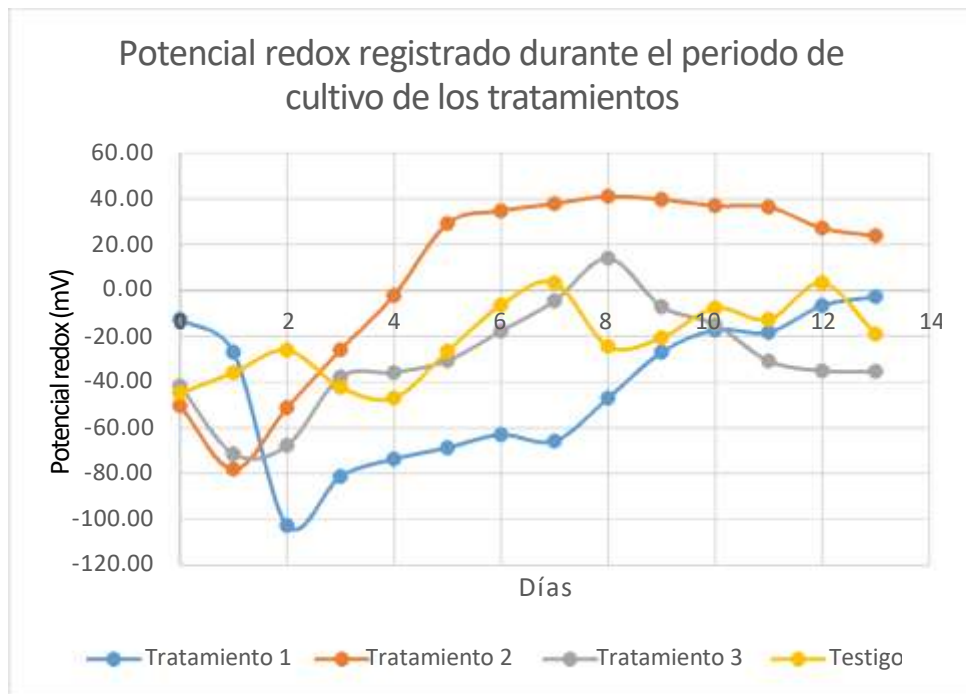


Figura 7. Influencia del potencial redox respecto al crecimiento poblacional celular en los Tratamientos 1, 2 y 3 en el cultivo de *Chlorella sp.*

Comparando el valor del potencial redox con la producción de biomasa la tendencia de mayor producción de biomasa corresponde a los tratamientos que tienen mayor potencial redox que confirman la relación que existe entre el pH y el potencial redox frente a la producción de biomasa. Situación que hace evidente nuestros resultados experimentales que en términos de biomasa están validados.

4.3. Determinación del crecimiento microalgal

Puesto que $F_{calc} > P_{value}$, se rechaza H_0 y nos indica que hay diferencia significativa (al 5%) entre los diferentes días para cada tratamiento.

Cuadro 4. Resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$) para la determinación de la concentración celular en cel x $10^6 \cdot ml^{-1}$ durante los diferentes días.

Tratamientos	Características	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13
1	Abono foliar "Multifoliar 20-20-20" – 0,2 ml.l ⁻¹	0,29 ab	0,92 b	1,86 c	2,21 c	4,40 c	4,04 d	3,97 c	3,92 c	4,14 d	5,20 d	5,80 c	6,35 d	7,94 c
2	Abono foliar "Panter-A Balance" – 0,2 ml.l ⁻¹	0,31 b	0,43 c	0,67 b	0,87 b	1,52 b	1,68 c	1,92 b	2,32 b	2,70 c	2,92 c	3,28 b	3,76 c	3,75 b
3	Medio H.M. – Patrones de 1 ml.l ⁻¹	0,32 b	0,39 b	0,64 b	0,82 b	1,01 b	1,31 b	1,50 b	1,84 b	2,17 b	2,34 b	2,53 b	2,31 b	2,11 b
TC	Testigo	0,23 a	0,17 a	0,20 a	0,21 a	0,22 a	0,24 a	0,22 a	0,23 a	0,23 a	0,24 a	0,24 a	0,22 a	0,25 a
C.V.		13,36	20,12	8,17	31,49	16,96	7,58	17,73	18,82	7,34	7,56	23,66	15,55	27,15

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), se resaltó las medias significativamente diferentes

Para el comportamiento de los diferentes tratamientos en el cultivo de microalgas de la especie *Chlorella sp.*, que son expresados en el conteo diario de células por mililitro durante 12 días, se realizó el análisis de varianza (tabla 5 a la tabla 17), los cuales muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos en estudio, esto se corroboró con las pruebas de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), que se muestra en la cuadro 4, siendo los rangos entre $0,32 \times 10^6$ a $0,23 \times 10^6$; $0,92 \times 10^6$ a $0,17 \times 10^6$; $1,86 \times 10^6$ a $0,20 \times 10^6$; $2,21 \times 10^6$ a $0,21 \times 10^6$; $4,40 \times 10^6$ a $0,22 \times 10^6$; $4,04 \times 10^6$ a $0,24 \times 10^6$; $3,97 \times 10^6$ a $0,22 \times 10^6$; $3,92 \times 10^6$ a $0,23 \times 10^6$; $4,14 \times 10^6$ a $0,23 \times 10^6$; $5,20 \times 10^6$ a $0,24 \times 10^6$; $5,80 \times 10^6$ a $0,24 \times 10^6$; $6,35 \times 10^6$ a $0,22 \times 10^6$; $7,94 \times 10^6$ a $0,25 \times 10^6$ células por mililitro, para el total de días en estudio (del día 00 al día 13) respectivamente.

De acuerdo con los datos registrados se obtuvo lo siguiente:

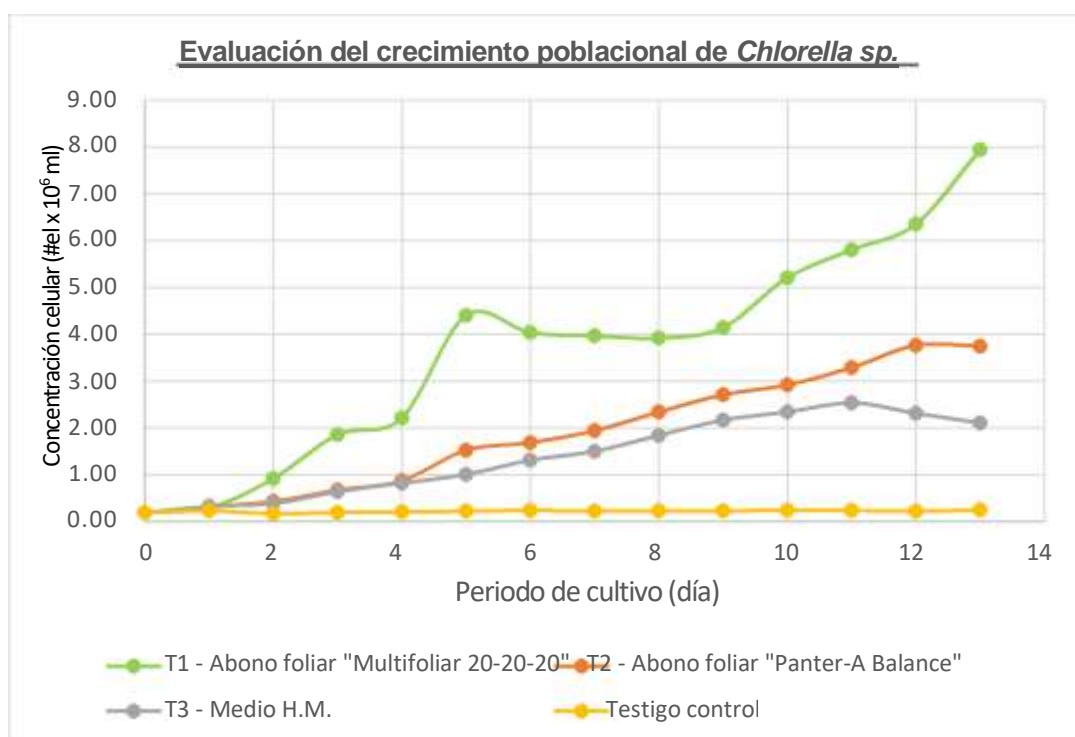


Figura 8. Crecimiento poblacional de los tratamientos en estudio en el cultivo de *Chlorella sp.* Pucallpa, Perú, 2015.

En los días 1 y 2, de acuerdo con la figura 16, se muestra a todos los tratamientos en estudio, presentando un crecimiento exponencial, expresado en una curva de tenencia ascendente; la prueba de LSD Fisher ($p > 0,05$) nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas durante estos días. En el día 1, se registraron rangos entre $0,32 \times 10^6$ a $0,23 \times 10^6$ células por mililitro, correspondientes al testigo control y al abono foliar “Panter-A Balance” respectivamente.

En el día 2, se registraron rangos entre $0,17 \times 10^6$ a $0,92 \times 10^6$ células por mililitro, correspondientes al testigo control y al abono foliar “Multifoliar 20-20-20” respectivamente.

En el día 3 se registraron rangos entre $0,20 \times 10^6$ a $1,86 \times 10^6$ células por mililitro, correspondiente al testigo control y al abono foliar “Multifoliar 20-20-20” respectivamente. La prueba de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para el día 3.

En los días 4 y 5 se pudo observar un primer crecimiento exponencial en el Tratamiento 1. Se registraron rangos entre $0,21 \times 10^6$ a $2,21 \times 10^6$ células por mililitro, correspondiente al testigo control y al abono foliar “Multifoliar 20-20-20” respectivamente. La prueba de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para los días 4 y 5.

En los día 6 al 8 se pudo observar disminución de la densidad celular en el Tratamiento 1. Se registraron rangos entre $0,24 \times 10^6$ a $4,04 \times 10^6$; $0,22 \times 10^6$ a $3,97 \times 10^6$; $0,23 \times 10^6$ a $3,92 \times 10^6$ células por mililitro, correspondiente al testigo control y al abono foliar “Multifoliar 20-20-20” respectivamente. La prueba de promedios de LSD

Fisher ($p > 0,05$), muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para los días 6 al 8.

En los días 9 al 13 hubo aumento en la densidad celular en el Tratamiento 1, en el Tratamiento 2 la densidad celular comenzó a disminuir a partir del día 12 y en el tratamiento 03 disminuyó a partir del día 11. Se registraron rangos entre $0,23 \times 10^6$ a $4,14 \times 10^6$; $0,24 \times 10^6$ a $5,20 \times 10^6$; $0,24 \times 10^6$ a $5,80 \times 10^6$; $0,22 \times 10^6$ a $6,35 \times 10^6$; $0,25 \times 10^6$ a $7,94 \times 10^6$ células por mililitro, correspondiente al testigo control y al abono foliar “Multifoliar 20-20-20” respectivamente. La prueba de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para los días 9 al 13.

Con respecto a otras investigaciones, Ortiz *et al* (2010) probaron cinco medios de cultivo con la microalga *Chlorella sorokiniana*; entre ellos están el medio Sueoka, Guillard, y lixiviados de gallinaza en concentraciones de 30, 50 y 80%. Obtuvo mejores resultados en el medio Guillard con una densidad final $1,3 \times 10^8$ cél/ml, en 1,5 días, cuya concentración inicial fue de $1,3 \times 10^7$ cél/ml, quiere decir que en ese tiempo aumentó diez veces su concentración con el medio de cultivo mencionado. En nuestro caso, se obtuvo mayor crecimiento poblacional en el Tratamiento 2 (abono foliar “Multifoliar 20-20-20”) con una concentración final de $7,94 \times 10^6$ cel/ml en 13 días, cuya concentración inicial fue de 1×10^6 cel/ml, quiere decir que la concentración celular aumentó 7,94 veces en dicho tiempo. Comparando nuestros resultados con el de Ortiz, este es superior porque obtuvo mayor concentración celular en poco tiempo; sin embargo hacer cultivo con el medio Guillard no es rentable debido a su elevado precio en el mercado y el abono foliar “Multifoliar 20-20-20” tiene un precio accesible y se puede adquirir de cualquier tienda agroveterinaria.

4.4. Obtención de la biomasa algal húmeda y volumen

Para la determinación de la biomasa microalgal de la especie *Chlorella sp.*, se realizó el análisis de varianza respectivo, obteniendo que $F_{calc} > P_{valué}$, se rechaza H_0 y, nos indica que hay diferencia significativa (al 5%) entre los tratamientos.

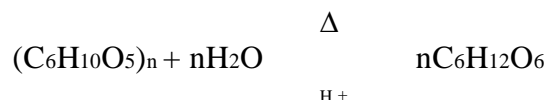
Cuadro 5. Resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), para la determinación de biomasa húmeda, obtenido al término de la fase de cultivo (cosecha).

Tratamiento	Características	Biomasa (g/l)
TC	Testigo (sin nutrientes)	0.63 a
T2	Abono foliar “Panter-A Balance” en concentración de 0.2 ml/l	2.63 b
T1	Abono foliar “Multifoliar 20-20-20” en concentración de 0.2 ml/l	3.96 c
T3	Medio H.M. (1 ml/l por patrón)	4.33 d

Para la determinación de la biomasa microalgal húmeda de la especie *Chlorella sp.*, se realizó el análisis de varianza respectivo (tabla 24), donde muestra las diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos en estudio, esto se corrobora con las pruebas de promedios de LSD Fisher ($p > 0,05$), mostradas en el tabla 10, donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, siendo los rangos obtenidos entre 0,63 a 4,33 gramos por litro de cultivo, correspondiente al testigo control y al medio H.M. (Tratamiento 3) respectivamente.

4.5. Sacarificación exopolisacáridos

Para la UNAD (2009) el tema de la sacarificación se da a través de la hidrogenación a fin de desdoblar los polímeros con estructuras de celulosa y hemicelulosa y en el tema de los exopolisacáridos su sacarificación se da uniformemente por ser carbohidratos además de lineales no tienen la estructura ramificada de la hemicelulosa (al no contener hemicelulosa). En consecuencia, la sacarificación de los exopolisacáridos de las microalgas es más homogénea y más rápida comparada con la celulosa de origen vegetal superior; al respecto existe abundante información basada en la reacción de los hidrocarburos con el agua (hidrólisis en medio ácido), siendo la reacción química principal la siguiente conforme detalla Quintero (2010):



En el presente estudio ya no ha sido necesario su evaluación puesto que asumimos una conversión cuasitotal, de manera que nos hemos limitado a evaluar el producto final (bioetanol) que incluye además la etapa de fermentación. En consecuencia tenemos una evidencia importante sobre la sacarificación de los exopolisacáridos de las microalgas como ventaja comparativa en su conversión de azúcares.

4.6. Fermentación

La fermentación es un proceso biológico de oxidación incompleta realizada por microorganismos los cuales obtienen energía a partir de una fuente de carbono. Existen diversas fermentaciones, pero la que interesa en este trabajo es la fermentación alcohólica, donde un microorganismo en ausencia de oxígeno transforma la glucosa en

etanol y CO₂, obteniendo energía para llevar a cabo el metabolismo. La siguiente ecuación representa la estequiometría de la fermentación alcohólica:



Para un proceso fermentativo que tiene como finalidad un proceso industrial productivo es de suma importancia contar con algún microorganismo que entregue un alto rendimiento de bioetanol, alta productividad y que sea capaz de tolerar altas concentraciones de bioetanol. En adición a lo anterior, para un proceso de fermentación, es necesario un microorganismo capaz de soportar altas temperaturas (45°C) y bajo pH cercano a 3, por lo tanto microorganismos con estas cualidades han sido tremendamente estudiados y usados, es una levadura utilizada en diversos procesos productivos, en especial para la producción de vinos, esta levadura es la *Saccharomyces cerevisiae* con rendimientos superiores a 0,43 g_{etanol}/g_{glucosa} en condiciones óptimas y una productividad volumétrica de bioetanol de 0,7 g/l.h. (Juri, 2011)

Dentro de las desventajas que presenta la especie nativa de *Saccharomyces cerevisiae* es la imposibilidad de utilizar xilosas para producir etanol. Otros microorganismos si tienen la capacidad de oxidar xilosas en bioetanol, pero son de baja tolerancia y en muchas ocasiones tienden a reasimilar el bioetanol. En diversos estudios se han modificado genéticamente algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para que puedan fermentar xilosas y por ende aumentar los rendimientos. (Juri, 2011)

En consecuencia, la tecnología de la fermentación permite optimizar la producción en nuestro caso del bioetanol y dado que nuestros azúcares obtenidos de los exopolisacáridos de microalgas sólo nos dan azúcares procedentes de seis carbonos, situación que lo manifestado anteriormente nos favorece para usar *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo que genera la fermentación la cual se ha llevado en forma

espontánea. Al igual que la sacarificación el proceso de fermentación para este estudio se ha asumido como cuasitotal dado las experiencias y tecnologías a nivel industrial.

4.7. Destilación de alcohol

Mitsunori *et al* (2011) reporta que existen algas fácilmente hidrolizables, que no necesitan un pretratamiento. Los resultados de este estudio muestran los mismos resultados cualitativos, indicando que un pretratamiento con ácido y temperatura no es necesario y más aún, tiene efectos negativos. La sacarificación simple de la biomasa produce 43 g/l de glucosa, y la concentración de etanol obtenida después de la fermentación no supera los 30 g/l. Al respecto, Briones (2012) concluye que: Dichos resultados son más altos que los obtenidos en el trabajo anterior de 5 g/l de glucosa y 5 g/l de etanol. Sin embargo estos resultados no deberían ser comparables debido a que el antecedente citado no especifica la cantidad de biomasa utilizada. Si se utiliza más biomasa, se obtiene mayor concentración, por lo que los resultados deberían estar normalizados por los gramos de biomasa utilizado, tampoco se especifica el porcentaje p/v de biomasa versus volumen de reacción de la sacarificación, que también afecta los resultados finales.

Con relación a las microalgas, la Comisión Europea CORDIS (2015) está investigando en tres áreas: La primera se centra en la producción de una versión de la cianobacteria diseñada metabólicamente. La cianobacteria es capaz de tolerar concentraciones elevadas de etanol, pero este tiene un efecto negativo sobre su velocidad de crecimiento. Por este motivo, se está mejorando la tolerancia de la cepa de cianobacterias para poder producir etanol a una concentración final de 50 g/l.

La segunda área de investigación consiste en la evaluación de cultivos estables de cianobacterias a granel en un fotobiorreactor piloto. En la actualidad, los científicos están determinando los tipos de organismos contaminantes que pueden encontrarse durante el proceso de cultivo. La última área de investigación se centra en mejorar la selectividad de las tecnologías de membrana que se utilizan para la separación del etanol.

4.8. Obtención del bioetanol combustible

4.8.1. Tratamiento 1

Por cada litro de biomasa húmeda (equivalente a 0,8 g) se obtuvo 29 ml (equivalente a 23,2 mg) de alcohol etílico con un grado de 12° y 3,5 ml de volumen.

4.8.2. Tratamiento 2

Por cada litro de biomasa húmeda (equivalente a 0.8 g) se obtuvo 19 ml (equivalente a 15,2 mg) de alcohol etílico con un grado de 11° y 2 ml de volumen.

4.8.3. Tratamiento 3

Por cada litro de biomasa húmeda (equivalente a 0.8 g) se obtuvo 32 ml (equivalente a 25,6 mg) de alcohol etílico con un grado de 13° y 4,2 ml de volumen.

4.8.4. Testigo control

Por cada litro de biomasa húmeda (equivalente a 0,8 g) se obtuvo 0.187 ml (equivalente a 1,15 mg) de alcohol etílico con un grado de 13° y 0,2 ml de volumen.

4.9. Comentario de los resultados obtenidos

En el cuadro de los resultados del presente estudio el Tratamiento 3 presenta un rendimiento de etanol de 25,6 mg/l que frente al Testigo Control nos indica que el Tratamiento realizado tiene una eficiencia de 2226% más; que comparado con los resultados obtenidos por Jaramillo (2011) obtuvo rendimientos de producto de 52 mg de etanol por litro de pasta de microalga con deshidratación por destilación extractiva y 48 mg de etanol por litro de pasta de microalga en tamices moleculares con uso de solvente. Resulta muchísimo más grande (más de 2000 veces) esta gran diferencia y podemos explicarla debido a que en el estudio antes indicado tuvo como base (prácticamente para la misma especie) otro sistema de tratamiento para la obtención del bioetanol que consistía en la extracción del etanol por solventes, muy ventajoso por cierto pero económicamente no resulta viable por el excesivo costo dado que en nuestro caso simplemente fue una destilación y en tanto que en el otro sistema utilizaron previo a la destilación un sistema de extracción con solventes. En consecuencia el sistema de extracción del etanol realizado en el presente estudio tiene mayor viabilidad económica y replicándolo con mayores tratamientos en la producción de microalgas e investigando el logro de mayores eficiencias en la sacarificación, fermentación y separación del etanol se puede mejorar el rendimiento de bioetanol con el propósito de escalar a mayor escala la producción del bioetanol a partir de microalgas de agua dulce.

Por otra parte las referencias que se disponen en la actualidad con relación a la extracción de biocombustibles a partir de microalgas están más centradas a la producción de biodiesel debido a que la extracción de las grasas no demanda de procesos y operaciones más complicadas que para el bioetanol de manera que la tendencia de para los trabajos de biocombustibles a partir de microalgas “por el momento” están más avocadas a la producción de biodiesel con la consecuencia de que los exopolisacáridos de las microalgas son consideradas como residuos del proceso. Al respecto la información que se cuenta en VirtualPro explica esta tendencia.

Rocha (2011) realizó la tesis de “Producción de biocombustibles utilizando *Spirulina sp.* como fuente de carbono”, donde realizó los procesos de hidrólisis y fermentación en la biomasa usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En las pruebas de fermentación en medio con hidrolizado de la biomasa de *Spirulina sp.* obtuvo mayor porcentaje de rendimiento a concentraciones de 40 y 60 g/L de biomasa húmeda, alcanzando 23.03% y 22.07 % respectivamente. Eligió la concentración de 60 g/L como la más óptima. Comparado con lo obtenido en el presente estudio, en este caso, resulta un 50% mayor que el nuestro, esta diferencia se explica que la microalga *Spirulina sp.* de una especie más rústica y de mayor biomasa que aparentemente nos estaría indicando que sería una materia prima óptima para la obtención del bioetanol en cuanto a rendimiento pero en cuanto a hábitat la *Spirulina sp.* demanda medio acuoso alcalino que para poder cultivar en las aguas de nuestra Amazonía (aguas ácidas) demandaría alcalinizarlas y modificar el ecosistema acuático que en función de costos no daría viable.

Por otra parte Sulfhari *et al* (2011), utilizando microalga *Spirogyra sp.* (de agua dulce) concluye que: “La producción de etanol más alta de *Zymomonas mobilis* fue

9,70% de etanol (v / v) con la adición de la enzima α -amilasa a 0,09 gramos durante 96 horas. La producción de etanol más alta de *Saccharomyces cerevisiae* era 4,42% de etanol (v / v) con la adición de la enzima α -amilasa a 0,06 gramos para 96 horas.” Comparando con nuestros resultados en relación a los valores reportados resulta 72% menor utilizando la misma levadura, en tanto que con *Z. mobilis* resulta 33% menor.

Resultados de la obtención de bioetanol en macroalgas como el ya citado por Mitsunori *et al* (2011) reporta el resultado del bioetanol no supera los 30 g/l que al ser una alga mayor evidentemente concentra mayor biomasa y mayor presencia de exopolisacáridos que comparando el tiempo de cultivo con la microalga que hemos estudiado definitivamente se logrará mayor producción de exopolisacáridos en las microalgas por volumen de ambiente acuático, situación que la tendencia de los biocombustibles de tercera generación se va mucho más a utilizarlos como materia prima para la obtención del biodiesel y bioetanol, hasta cierto grado de macroalgas, es decir que a mayores grados de macroalgas el contenido de exopolisacáridos y grasas disminuye ostensiblemente como en el caso de la macroalga *Chondracanthus chamissoi* (“yuyo para ceviche”) conforme indican los estudios realizado por Ortiz (2011).

Finalmente, tal como lo menciona Ritslaid *et al* (2012) existen diversos métodos que se están empleando para la obtención de bioetanol de primera generación (cultivos agrícolas), de segunda generación (paja, bagazo y restos de aserrín), de tercera y cuarta generación (macroalgas y microalgas); pero el mayor enfoque de los investigadores están en los biocombustibles de tercera y cuarta generación, ya que producir bioetanol de primera generación de los cultivos agrícolas compite con la alimentación de la población, y para los de segunda generación no resultan económicamente viables debido a los altos costos de producción debido a la biomasa lignocelulósica que son muy

difíciles de hidrolizar. Pero para producir biocombustibles de tercera y cuarta generación se están realizando diversos esfuerzos para que estos sean viables económicamente y que no tenga que comprometer la seguridad alimentaria y a los ecosistemas, teniendo una producción sostenible.

CAPITULO V

5.1. CONCLUSIONES

1. El tratamiento más óptimo para el cultivo de la microalga *Chlorella sp.* resultó el que corresponde al tratamiento 3 (Medio H.M.) con 4,33 g de biomasa húmeda/l de cultivo, de la evaluación de los tres medios de cultivo para el crecimiento poblacional de microalgas (*Chlorella sp.*), frente a los tratamientos 1 (abono foliar “Multifoliar 20-20-20”) y 2 (abono foliar “Multifoliar 20-20-20”) cuyos resultados son 3,96 y 2,63 g de biomasa húmeda/l de cultivo respectivamente.

2. El potencial energético como bioetanol para la microalga *Chlorella sp.* es 25,6 mg de bioetanol/l de biomasa húmeda correspondiendo al Tratamiento 3; bajo condiciones ambientales de la región Ucayali, en laboratorio, su extracción en exopolisacáridos, su sacarificación, su fermentación y destilación. Resultado que se obtuvo con procesos y operaciones unitarias cotidianas; sin usar biotecnología de punta.

5.2. RECOMENDACIONES

1. La generación de una visión sobre el bioetanol como carburante ya debe visibilizarse, científicamente en la región Ucayali en el entendido que las microalgas como un recurso renovable en aguas dulces que requiere el conocimiento de sus propiedades físico-químicas y los métodos de producción adecuados en condiciones cotidianas para escalar a condiciones de biotecnología de punta. Con este propósito se demanda conocer las especies silvestres de microalgas más promisoras de la región Ucayali como fuentes energéticas para la producción de bioetanol, biocombustible de tercera generación.

2. Incluir en la agenda científica de la Amazonía, el diagnóstico de las microalgas silvestres de agua dulce para ir determinando su potencial energético como bioetanol, biodiesel y proteínas limpias con el propósito de generar la promoción de este nuevo recurso en nuestra Amazonía, especialmente en la región Ucayali donde los acuíferos son los más indicados para el cultivo de las microalgas.

3. Realizar investigaciones acerca de las dosis óptimas de los medios de cultivo que se debe aplicar para el cultivo de *Chlorella sp.* para una mayor producción de biomasa microalgal.

4. Con la ayuda de un espectrofotómetro hacer análisis bromatológico de la composición química de la microalga *Chlorella sp.* y medir el porcentaje de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas y absorción de compuestos tóxicos.

5. Para la determinación de azúcares en la mezcla se puede emplear el procedimiento que usó Rocha (2011): Ajustó, en el caso de ser necesario, a pH 6 con NaOH 5M. A partir de esta mezcla tomó alícuotas para la determinación de azúcares

reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico y el sobrante de la mezcla utilizó para preparar el medio de cultivo de la fermentación.

6. Para poder analizar eficazmente la concentración de alcohol utilizar el método que empleó Harun *et al* (2012): Mediante cromatografía de gases (GC) (Modelo 7890A, Agilent, CA). El GC consiste en un automuestreador, detector de iones de llama (FID) y HP-FFAP column, 50 m x 0,20 mm x 0.33 μ m. Las temperaturas de inyector, detector y del horno mantuvo a 150, 200 y 120 °C, respectivamente. El gas nitrógeno lo usó como gas portador. La concentración de bioetanol cuantificó utilizando una curva de calibración preparada mediante la inyección diferentes concentraciones de estándar de etanol (0,1 a 10% v / v).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abengoa (2010). *A partir de algas... generamos biocombustibles*. Recuperado el 8 de setiembre de 2015, de

<http://www.abengoa.es/htmlsites/boletines/es/junio2010/bioenergy.html>

Agencia de Desarrollos TECNOPLADES, s.f. *Protocolo de microalgas*. Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) Manzanillo, Colima. Recuperado el 4 de abril de 2016, de

<http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/6/2013/trimestrales/anexo1843-5-2013-11-10.pdf>

Aguilar, C. (1995). *Crecimiento y ciclo de vida de la microalga Dunaliella salina Teodoresco (Chlorophyta, Volvocales) de las Salinas de los Chimús (Ancash) y las salinas de Chilca (Lima)*. Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima-Perú.

Albarrán, E. (2008) *El potencial redox y la espontaneidad de las reacciones electroquímicas*. Recuperado el 15 de mayo de 2015, de

http://www.lajpe.org/sep08/32_erik_albarran.p-Df

Anónimo (2009). *Bioetanol a partir de algas: más rentable, más limpio*. Recuperado el 11 de octubre de 2015, de

<http://www.ison21.es/2009/07/19/bioetanol-a-partir-de-algas-mas-rentable-mas-limpio/>

Barraza, C. (2009). *Producción de biodiesel a partir de microalgas*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de ingeniería - Escuela de Ingeniería Bioquímica. Chile. Recuperado el 20 de abril 2015, de www.monografias.com/...biodiesel.../produccion-biodiesel-microalgas.pdf

Becker, E. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Iniversity Press". Cambridge. Recuperado el 15 de mayo de 2015, de <http://books.google.co.in/books?id=kakx4i7nweyc>

Becker, F. & Venkataraman, L. (1982). *Biotechnology and exploitation of algae*. The Indian Approach. Central food technological research institute. Mysore-India.

Bedón, C. (2013). *Análisis del mercado de combustibles en el Perú*. Recuperado el 15 de mayo de 2015, de <http://es.slideshare.net/chechebedon/anlisis-del-mercado-de-combustibles-en-el-per>

Benito, L. (2014). *Un grupo de países latinoamericanos restaurará 20 millones de hectáreas de suelo*. Recuperado el 15 de mayo de 2015, de <http://www.labioguia.com/un-grupo-de-paises-latinoamericanos-restaurara-20-millones-de-hectareas-de-suelo/>

- Brennan, L. & Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 557-577.
- Briones, G. (2012). *Producción de etanol a partir de la macroalga Ulva rigida*. Tesis de bachiller. Santiago de Chile, Chile: Universidad de Chile.
- Burgos, Y. (2013). *Conteo de microalgas*. Recuperado el 10 de abril de 2015, de <http://microalgasmodulo1.blogspot.pe/2013/03/conteo-de-microalgas.html>
- Candelaria, M. (2012). *Algas para producir combustible*. Recuperado el 10 de octubre de 2015, de <http://magazineoceano.com/algas-para-producir-combustible/#.vhnwdgg8b0>
- Cañavate, J. P. (2008). *Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles*. Ifapa Centro el Toruño. Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Cádiz – España. Recuperado el 6 de noviembre de 2015, de <http://www.mispecies.com/reportajes/2009/ene/Microalgas/>
- Cochrane, T.T. & Sánchez, P.A. (1982). *Recursos de tierras, suelo y su manejo en la región amazónica. Informe acerca del estado de conocimientos. En amazonia: Investigación sobre agricultura y uso de tierras*. Ciat 035-4 (82), 141-218.

Cruz, J. (s.f.). *Determinación de la estabilidad en mezclas de gasolina y alcohol*. Recuperado el 15 de octubre de 2015, de

<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/ecosolar/ecosolar14/html/articulo06.htm>

Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Institute of Technology and Engineering, Massey University, Private Bag 11222, Palmerston North - New Zealand.

Community Research and Development Information Service CORDIS (2015). *Obtención de bioetanol a partir de microalgas*. Recuperado el 10 de febrero de 2015, de

http://cordis.europa.eu/result/rcn/169959_es.html

Cynthiana (2014). *Empleo de las microalgas en la fijación de CO₂ presentes en los gases de chimenea de equipos industriales de combustión en Colombia*.

Recuperado el 10 de febrero de 2016, de <https://prezi.com/tgvginlcw0vx/empleo-de-las-microalgas-en-la-fijacion-de-co2/>

Dancé, R. (2014). *Estudio de viabilidad técnico-económica para el uso de residuos, derivados de las industrias de aserrío y laminado en los departamentos de Ucayali y Loreto*. Consorcio Asecal, S.L. y mercurio consultores, S.L. contrato N°: 043/2007/lir03/ue-peru. Agencia Peruana de Cooperación Internacional. Comunidad Europea, p. 85.

Daniels F. & Alberty R. (1980). *Fisicoquímica*. Ed. CECSA.

Demirbas, A. (2005). *Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass*. *Energy sources*. 27, 327-337.

Diaz, K. (2012). *Producción de bioetanol de tercera generación mediante la bioconversión de exopolisacáridos (EPS) extraídos del cultivo in vitro de una microalga verde (Chlorophyta)*. Tesis doctoral. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía.

Gadea, G. (2012). Unión europea comprometida con el desarrollo de energías renovables. *XX Foro de la Alianza en Energía y Ambiente*. Recuperado el 10 de febrero de 2016, de

http://eeas.europa.eu/delegations/nicaragua/press_corner/all_news/news/2012/20121122_01_es.htm

García, J. (2010). *Captura de CO₂ mediante algas unicelulares*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Tesis de bachiller. Madrid, España: Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia, Universidad Politécnica de Madrid.

González, D. (2013). *Microalgas en la producción de bioetanol*. Tesis de maestría. Montería, Colombia: Universidad de Córdoba.

Harun, R., Liu, B. & Danquah, M. (2012). *Analysis of process configuration for bioethanol production from microalgal biomass*. Bio Engineering Laboratory, Department of Chemical and Environment Engineering, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Malaysia – Australia.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Science and Technology*. 87 (1): 38-46.

Instituto del Mar Peruano IMARPE y Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología FINCYT (2008). *Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible*. Contrato N° 025–FINCYT–PIBAP–2007.

Infante C., Angulo E., Zárate A., Florez, Z., Barrios F. & Zapata C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. En cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159-164.

Jaramillo, J. (2011). *Evaluación tecno-económica de la producción de bicocombustibles a partir de microalgas*. Tesis de maestría. Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia

Juri, S. (2011). *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos:*

líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Tesis de bachiller.
Santiago de Chile, Chile: Universidad de Chile.

La Primera (2012). *Promoverán producción de biocombustibles en el Perú*. Recuperado el 22 de octubre de 2015, de <http://www.diariolaprimeraperu.com/online/economia/promoveran-produccion-de-biocombustibles-en-el-per-123056.html>

Marcos F. (2013). *Bioetanol de celulosa*. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.

Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. (2010). A review. *Renewable and sustainable energy reviews*. 14, 217-232.

Medina, A., Piña, M., Nieves, J. F., Arzola & Guerrero M., (2012). La importancia de las microalgas. CONABIO. *Biodiversitas*. 103, 1-5.

Melé, D. (2012). *Alimentos vs bioetanol: una cuestión económica, ecológica y ética*. Recuperado el 10 de noviembre de 2015, de <http://blog.iese.edu/eticaempresarial/2012/08/14/alimentos-vs-bioetanol-una-cuestion-economica-ecologica-y-etica/#sthash.g5qusx46.dpuf>

Ministerio de agricultura (2015). *Informe de seguimiento agroeconómico III trimestre 2015*. Sistema integrado de estadísticas agrarias (SIEA). Recuperado el 1 de marzo de 2016, de siesa.minag.gob.pe/siesa/%3fq%3dnoticias/informe-de-seguimiento-agroeconomico-iii-trimestre-2015+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe

Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (2006). *Perfil del mercado y competitividad exportadora del etanol*". Recuperado el 3 de enero de 2016, de <http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/etanol.pdf>

Mitsunori, Y., Kanami, N., Osamu, A. & Kiyohiko, N. (2011). Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Bioresource Tecnology*. 46, 2111-2116.

Monica (2013). *Investigación evalúa el cultivo de microalgas en vinaza*. Recuperado el 11 de octubre de 2015, de <http://www.procitropicos.org.br/portal/conteudo/item.php?itemid=2801>

Mponce (2012). *Producción de etanol a partir de algas marinas*. Recuperado el 10 de mayo de 2015, de <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2012/02/02/produccion-de-etanol-a-partir-de-algas-marinas/>

Muñoz, M. (2006). *Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de las algas colectadas en Baja California Sur, México.*

Tesis de maestría. La Paz, B.C.S., México: Instituto Politécnico Nacional.

Muñoz, R. (2012). *Biocombustibles de microalgas.* Recuperado el 11 de octubre de 2015, de

<http://www.iingen.unam.mx/es-mx/BancoDeInformacion/MemoriasdeEventos/BiotecnologiaAlgal/IntroduccionBiocombustiblesMicroalgas.pdf>

Nextfuel (2006). *Preguntas frecuentes sobre el biodiesel.* Recuperado el 11 de noviembre de 2015, de

<http://biodiesel.com.ar/biodiesel-preguntas-frecuentes>

Jae-yon, L., Chan, Y., So-Young J., Chi-Yong A., & Hee-Mock O. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology.* 101, 75-77.

Organización de Países Exportadores de Petróleo OPEP (2016). *OPEP no decide aún sobre reunión con productores fuera de grupo.* Recuperado el 29 de febrero de 2016, de

<http://www.preciopetroleo.net/ojep.html>

Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., Otero, A., 2010. *Evaluación del crecimiento de la microalga Chlorella sorokiniana en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas*. Universidad de los Llanos.

Recuperado el 4 de abril de 2016, de

<http://orinoquia.unillanos.edu.co/index.php/orinoquia/article/view/224/759>

Ortiz, J. (2011). *Composición nutricional y funcional de algas rodoíceas chilenas*.

Recuperado el 29 de febrero de 2016, de

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/121460/Monografia%20II%20algas%20Rojas.pdf?sequence=1>

Otero, L. (2016). *¿Por qué hay menos oxígeno en las cumbres?* Recuperado el 18 de febrero de 2015, de

<http://www.muyinteresante.es/curiosidades/preguntas-respuestas/por-que-hay-menos-oxigeno-en-las-cumbres-161398414052>

Picazo, M. (2015). *¿Cómo y dónde medimos el CO₂ de la atmósfera?*

Recuperado el 10 de enero de 2016, de

<http://picazo.eltiempo.es/2015/01/07/2015-el-ano-en-el-que-superamos-las-400-ppm-de-c02/>

Quintero, C. (2010). *Estudio de la producción de jarabes glucosados a partir de maltodextrinas empleando dos enzimas comerciales*. Recuperado el 19 de enero de 2016, de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s012140042010000200008

Regalbuto, J. (2009). Cellulosic biofuels got gasoline? *Science*. 325, 822-824.

Ritslaid, K., Küüt, A. & Olt J. (2012). State of art in bioethanol production.

Recuperado el 1 de marzo de 2016, de

<http://www.revistavirtualpro.com/descarga/estado-del-arte-en-la-produccion-de-bioetanol>

Rocha, J. (2011). *Producción de biocombustibles utilizando Spirulina sp. Como fuente de carbono*". Tesis de maestría. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Rühl, C. (2013). *La energía en 2012 adaptarse a un mundo cambiante*". Recuperado el 10 de agosto de 2015, de

http://www.bp.com/content/dam/bp.country/es_es/statisticalreview2013_screen_version.pdf

Sarmiento, R. & Amaya, A. (2010). *Desarrollo de una tecnología para la extracción de aceite de microalgas con etanol/hexano empleando disrupción celular térmica y química*. Tesis de bachiller. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

Sheng-Yi, C., Ming-Ta, S., Seow-Chin, O., Chih-Sheng, L., Chiun-Hsun, C., Chien-Ya, K. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresourse Tecnology*. 100, 833-838.

Sitio Solar (2012) *Los biocombustibles a partir de microalgas*. Recuperado el 29 de enero de 2016, de <http://sitiosolar.com/biocombustibles%20de%20microalgas.htm#sthash.ob9pseml.dpuf>

Subramani, V., & Gangwal, S. (2008). A review of recent literature to search for an efficient catalytic process for the conversion of syngas to ethanol. *Energy & fuels*. 22, 814-839.

Sulfahri, Mushlihah, S., Sunarto, E., Irvansyah, M., Mangkoedihardjo, S. & Setyo R. (2011). Ethanol production from algae *spirogyra* with fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 1(7), 589-593.

The Royal Society (2008). *Sustainable biofuels: prospects and challenges*. London SW1Y 5AG: Science Policy Section the Royal Society.

Tikhonovich, I. (2012). *Biocombustibles y seguridad alimentaria – una consulta del HLPE para marcar las pautas de su estudio*. Recuperado el 10 de octubre de 2015, de

<http://www.fao.org/fsnforum/es/forum/discussions/biocombustibles-scope>

Torrentera, L. & Tacón, A. (1989). *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura – cultivo de microalgas*. Recuperado el 10 de octubre de 2015, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm#chii>

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD (2009). *Sacarificación*. Recuperado el 1 de febrero de 2016, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/306598/contlinea/leccin_4_la_sacarificacin.html

United State Department of Energy DOE – USA (2000). *World crude oil and natural gas reserves, 2000*. Energy Information Administration (EIA). Washington, D.C.

Velazco, A. (2013). *Biocombustibles a base de algas y su generación en Latinoamérica*. Recuperado el 10 de mayo de 2015, de <http://suite101.net/article/biocombustibles-a-base-de-algas-y-su-generacion-en-latinoamerica-a14226#.vjjia814a4>

Verónica (2008). *Fermentación alcohólica*. Recuperado el 16 de febrero de 2016, de <https://nubiavalcarcel.wordpress.com/2009/06/07/hola-mundo/>

Wikipedia (2014). *Microalga*. Recuperado el 11 de diciembre de 2015, de <http://es.wikipedia.org/wiki/microalga>

Weatherbase (2007). *Historical weather of Podgorica*. Recuperado el 10 de enero de 2016, de

<http://www.weatherbase.com/weather/weather.php3?s=51548&refer=&units=metric>

Wikipedia (2014). *Cultivo de algas*. Recuperado el 10 de abril de 2015, de

http://es.wikipedia.org/wiki/cultivo_d_algas

Wikipedia (2015). *Fermentación alcohólica*. Recuperado el 10 de abril de 2015, de

https://es.wikipedia.org/wiki/fermentación_alcohólica

Ynga G. A. (2011). *Cultivo masivo de microalgas en biorreactores verticales*. Tesis de bachiller. Arequipa, Perú: Universidad Nacional de San Agustín.

Yo As (2013). *Bioetanol a partir de algas*. Recuperado el 13 de abril de 2015, de:

<http://tecnologia-y-ciencias.blogspot.com/2013/09/bioetanol-partir-de-algas.html>

ANEXOS

ANÁLISIS DE VARIANZA - POR DÍA

Tabla 5. ANVA para el conteo celular a 1 día de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 1			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	3,24	0,0814
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 13,36

Tabla 6. ANVA para el conteo celular a 2 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 2			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	32,86	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 20,12

Tabla 7. ANVA para el conteo celular a 3 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 3			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	320,69	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 8,17

Tabla 8. ANVA para el conteo celular a 4 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 4			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	20,43	0,0004
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 31,49

Tabla 9. ANVA para el conteo celular a 5 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 5			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	108,22	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 16,96

Tabla 10. ANVA para el conteo celular a 6 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 06			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	405,38	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 7,58

Tabla 11. ANVA para el conteo celular a 7 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 07			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	63,43	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 17,73

Tabla 12. ANVA para el conteo celular a 08 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 08			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	45,09	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 18,82

Tabla 13. ANVA para el conteo celular a 9 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 09			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	273,76	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 7,34

Tabla 14. ANVA para el conteo celular a 10 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 10			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	305,22	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 7,56

Tabla 15. ANVA para el conteo celular a 11 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 11			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	32,03	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 23,66

Tabla 16. ANVA para el conteo celular a 12 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 12			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	82,31	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 15,55

Tabla 17. ANVA para el conteo celular a 13 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza – Día 13			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	35,52	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 27,15

Tabla 18. ANVA para la determinación de biomasa microalgal.

Análisis de Varianza – Biomasa seca			
Fuente	G.L.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	608,39	0,0001
Error	8	-	-
Total	11	-	-

C.V. = 4,07

Tabla 19. Datos registrados durante el conteo de células por unidad experimental, expresados en células x 10⁶.ml⁻¹, durante la fase experimental.

Tratamiento	Repetición	Características	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13
T1	R1	Abono foliar “Multifoliar 20-20-20”	0.18	0.23	1.01	1.85	1.75	4.18	4.02	3.33	3.23	4.48	5.13	6.00	5.90	7.98
T1	R2	Abono foliar “Multifoliar 20-20-20”	0.20	0.35	1.02	1.77	2.10	4.67	4.27	4.05	4.22	3.93	5.18	6.03	7.37	8.25
T1	R3	Abono foliar “Multifoliar 20-20-20”	0.19	0.29	0.73	1.95	2.78	4.35	3.82	4.52	4.30	4.00	5.30	5.37	5.78	7.58
T2	R1	Abono foliar “Panter-A Balance”	0.24	0.35	0.41	0.77	0.85	1.65	1.58	1.73	2.33	2.70	3.27	4.72	4.05	5.87
T2	R2	Abono foliar “Panter-A Balance”	0.17	0.30	0.44	0.57	0.77	1.50	1.65	2.05	2.15	2.73	2.55	2.88	3.35	3.05
T2	R3	Abono foliar “Manter-A Balance”	0.16	0.29	0.43	0.68	1.00	1.42	1.82	2.03	2.53	2.68	2.93	2.25	3.88	2.32
T3	R1	Medio H.M.	0.24	0.36	0.36	0.62	1.20	1.63	1.28	1.72	2.35	2.02	2.43	2.95	2.57	2.12
T3	R2	Medio H.M.	0.17	0.32	0.43	0.63	0.78	0.72	1.23	1.57	1.42	2.33	2.43	2.10	2.20	2.05
T3	R3	Medio H.M.	0.16	0.29	0.37	0.67	0.48	0.67	1.42	1.22	1.75	2.15	2.15	2.55	2.17	2.15
TC	R1	Testigo	0.24	0.22	0.14	0.19	0.21	0.22	0.24	0.23	0.22	0.24	0.24	0.25	0.23	0.23
TC	R2	Testigo	0.14	0.24	0.10	0.20	0.21	0.24	0.25	0.22	0.24	0.21	0.24	0.23	0.22	0.27
TC	R3	Testigo	0.20	0.24	0.27	0.20	0.20	0.21	0.23	0.21	0.23	0.23	0.25	0.24	0.21	0.25

Cuadro 6. Costos unitarios de los diversos ingredientes del medio de cultivo H.M.

COMPONENTES	mg.l⁻¹	CANTIDAD DE REFERENCIA	PRECIO (S/.)	PRECIO MERCADO (S/.mg-1)	H.M. (S/.l⁻¹)
Urea	206,00	50Kg.	50.00	0,000001	0,00021
Cloruro de Potasio	19,00	50Kg.	120.00	0,0000024	0,00005
Ácido Fosfórico	35,00	1Kg.	227.40	0,0002274	0,00796
Clavos	2,50	1Kg.	6.00	0,000006	0,00002
Ácido Clorhídrico (Comercial)	100,00	1L.	3.00	0,003	0,30000
TOTAL(S/.)					0,30824

ICONOGRAFIA



Figura 9. Cultivo de microalgas (*Chlorella sp.*) en el día 0 en el laboratorio de Reproducción de peces en el IIAP – Ucayali, 2015.



Figura 10. Cultivo de microalgas en el día 13, con los diferentes tratamientos. Se observa que tienen un color verde más intenso.



Figura 11. Unidades experimentales que se usaron para el testigo, a los cuales no se les agregó ningún nutriente.



Figura 12. Conteo de la densidad celular con la ayuda un microscopio y del hematocímetro (cámara de Neubauer).

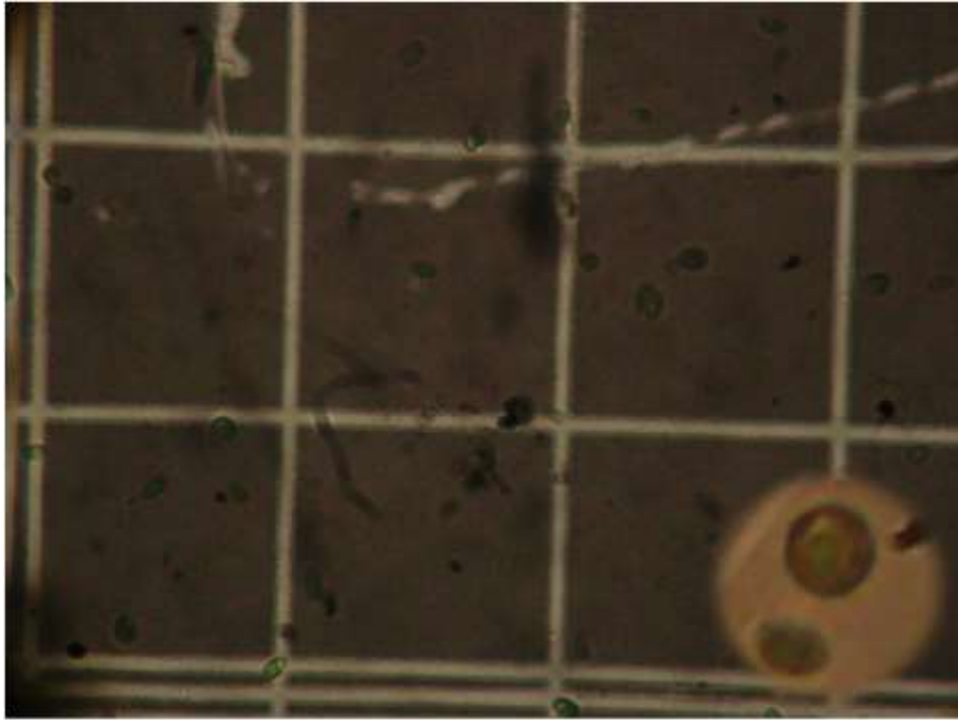


Figura 13. Se observan microalgas de la especie *Chlorella sp.* en el microscopio. Se puede apreciar una imagen ampliada de la observación para mayor visibilidad.



Figura 14. Se observan los sedimentos microalgales en la parte inferior de las unidades experimentales.



Figura 15. Medición de los parámetros físico-químicos en las unidades experimentales.

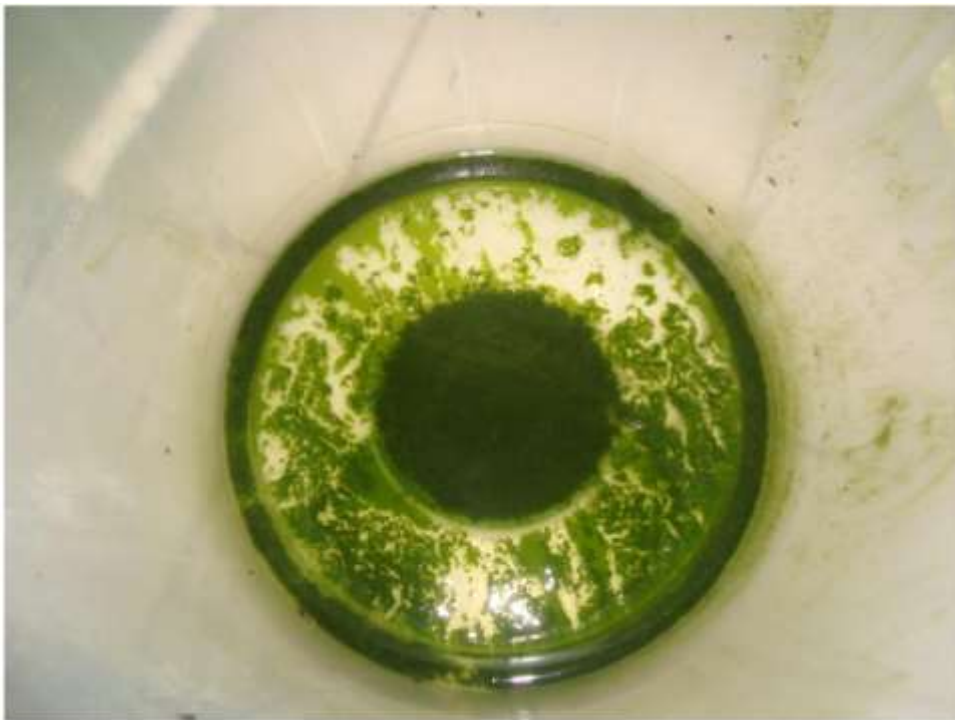


Figura 16. Sedimentos microalgales.



Figura 17. Biomasa húmeda obtenida.



Figura 18. Se aprecian los Tratamientos 1 (abono foliar “Multifoliar 20-20-20”) y 2 (abono foliar “Panter-A Balance”) que se utilizaron para la experimentación.



Figura 19. Se aprecia el Tratamiento 3 (medio H.M.). Consta de cuatro patrones: superfosfato simple de calcio, cloruro férrico (FeCl_3), cloruro de potasio (KCl) y úrea.



Figura 20. Pesado de las biomásas húmedas obtenidas del cultivo microalgal.



Figura 21.Relización del proceso de hidrólisis.



Figura 22. Fermentación de la biomasa.



Figura 23. Biomasa fermentada.



Figura 24. Destilación del bioetanol de microalgas (*Chlorella sp.*).



Figura 25. Obtención del bioetanol.



Figura 26. Medición de la concentración de alcohol mediante el uso de un alcoholímetro.

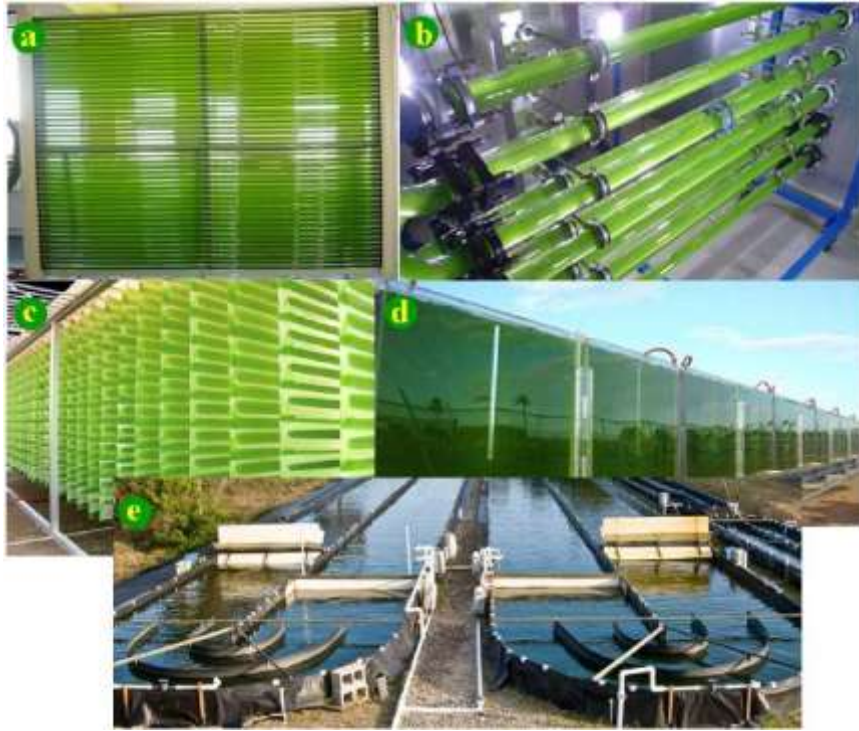


Figura 27. Tipos de reactores para el cultivo masivo de microalgas. a) FBR tubular (<http://www.ebri.org.uk/index.html>); b) FBR tubular (<http://www.oilgae.com/>); c) Vertical Algae Technology (VAT) (<http://www.valcent.net/s/Home.asp>); d) FBR tipo placa (<http://biofuels.asu.edu/biomaterials.shtml>) y e) Lagunas abiertas (LA) también conocidas como “raceways” (<http://www.aurorabiofuels.com/>).