UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
21-05-14
BIBLIOTECA CENTRAL
U.N.U.

"COMPARATIVO DE TRES FITOHORMONAS EN CONCENTRACIONES DE 25, 50 Y 75 ppm EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Scenedesmus acutus* MEYEN, PARA USO COMO BIODIÉSEL".

T E S I S

PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

Bach. CLAUDIA ROMINA GUIZADO VILLAFANE

PUCALLPA – PERÚ

2014

DEDICATORIA

A DIOS: por darme la fuerza, la sabiduría necesaria y, estar conmigo en cada paso que doy.

A mis padres, LOURDES Villafane y ROMÁN Guizado, siendo mí apoyo en todo momento. Los amo con mi vida.

A mí adorada hija, GABRIELA, por ser la alegría de mi vida y fuente de inspiración. ¡Gracias, mi princesa!.

A mi enamorado ELÍAS, tu ayuda ha sido fundamental.

A mis hermanos, ROMÁN, LUIS y CELIA, quienes me apoyaron en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al encontrarme en un momento de dicha y satisfacción en mi vida, por la culminación de uno de mis objetivos académicos, y a los que me acompañaron en esta aventura emprendida desde mi ingreso a la UNU, doy gracias a DIOS, por darme la oportunidad de haber conocido a lo largo de este tiempo a muy buenos amigos, de haber aprendido y enriquecido en experiencia y conocimiento. Por eso me veo en la maravillosa necesidad de expresarles mi agradecimiento.

A la Universidad Nacional de Ucayali, mi Alma Mater, por haberme brindado la oportunidad de formarme como profesional, asimismo, por todo el apoyo otorgado a mi persona y a mi proyecto de investigación (tesis).

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias que por intermedio de sus docentes, me brindaron valiosas enseñanzas, necesarias para mi formación como Ingeniero Agrónomo. Un agradecimiento especial al M.V. Elías Cano Castillo, al Dr. Edgardo Braúl Gomero, Blgo. MSc. Ildefonso Ayala Ascencio, Ing. MSc. Javier Amacifuen Vigo, al Ing. Andrés Isla Maldonado y al Ing. MSc. Pablo Villegas Panduro. Gracias por sus consejos académicos y personales.

Al Ing. Eliel Sánchez Marticorena, catedrático de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNU, por su valiosa asesoría y comentarios.

Un especial agradecimiento a la Blga Pesq. Carmela Rebaza Alfaro, profesional responsable del Programa "AQUAREC" en el IIAP-Ucayali, por su asesoría, paciencia, entrega, amistad y sus valiosos consejos, que me permitieron alcanzar los objetivos trazados.

A los investigadores del Programa AQUAREC al Blgo Pesq. Roger Bazán Albítez y a la Blgo Acui. Nadhia Herrera Castillo, al personal técnico y, al Blgo Pesq. Mariano 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.

Al Blgo. M.Sc Fernando Merino Moya, catedrático de la Universidad Nacional del Santa, por brindarme su apoyo, aun al no conocerme en ese entonces, revelando de esta forma, la calidad de persona que refleja, por compartir sus valiosos conocimientos, y poder considerarlo como un verdadero "*maestro*".

A mi padre, Román Guizado Estrada, por su gran apoyo en la realización de la tesis, en el diseño e instalación del invernadero, en la confección de los fotobiorreactores, y sus consejos durante la realización del presente trabajo de investigación.

A mi tío, Mauricio Guizado Estrada, por su apoyo a pesar de la distancia, que ha sido fundamental para que yo pudiera llegar hasta aquí. Gracias por creer en mí.

A mis amigas y compañeras de estudio: Jackelyn Aylin Soria Torres y Luz Esperanza Bardales Tuesta, gracias por hacer excepcionales los momentos que pasamos juntas, por sus influencias en mi vida y por hacer que esos años hayan sido los mejores en la universidad.

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

El jurado de tesis, designado por la Comisión de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Ucayali, tiene el agrado de presentar al:

Blgo. MSc.Ildefonso Ayala Ascencio ..... Presidente

Ing. MSc Javier Amacifuen Vigo ..... Secretario

Ing. Andrés Avelino Isla Maldonado ..... Miembro

Ing. Eliel Sanchez Marticorena ..... Asesor

Blga. Pesq. Carmela Rebaza Alfaro ..... Coasesora

Bach. Claudia Romina Guizado Villafane ..... Tesista

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE IMÁGENES	xii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. El cultivo de microalgas	3
2.2. Las microalgas	4
2.3. Formas de cultivo microalgal	5
2.3.1. Por su naturaleza	5
2.3.2. Por la forma de cosechar los cultivos	5
2.3.3. Por la pureza del cultivo	6
2.4. Tipos de biorreactores	7
2.5. Consideraciones generales durante el cultivo	7
2.5.1. Radiación	8
2.5.2. Tiempo de retención	9
2.5.3. Turbulencia	9
2.5.4 Oxígeno disuelto y pH	10
2.5.5. Carbono	11
2.6. Medios de cultivo	12
2.7. Generalidades del alga en estudio, (Sc. acutus)	13
2.8. Técnicas de aislamiento y purificación	17
2.9. Determinación de la densidad celular	19
2.10. Extracción de lípidos a partir de microalgas	21
2.11. Reguladores de crecimiento	24
2.12. Reportes de la aplicación de fitohormonas en el cultivo de microalgas	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33

3.1. Ubicación y duración del experimento..... 33
3.2. Ecología y clima..... 33
3.3. Materiales y equipos..... 34
3.3.1. Material biológico y orgánicos..... 34
3.3.2. Insumos para el medio HM..... 34
3.3.3. Materiales y equipos utilizados en la elaboración de biorreactores..... 35
3.3.4. Implementación del invernadero..... 36
3.3.5. Materiales y equipo para la extracción de lípidos..... 36
3.3.6. Equipos de laboratorio utilizados durante el cultivo..... 37
3.4. Tratamientos en estudio..... 38
3.5. Desarrollo del experimento..... 38
3.5.1. Instalación del invernadero..... 38
3.5.2. Elaboración de los fotobiorreactores..... 39
3.5.3. Preparación del medio nutritivo..... 39
3.5.4. Purificación de cepas microalgales..... 40
3.5.5. Preparación de las soluciones de las fitohormonas..... 40
3.5.6. Volumen de inoculo microalgal a utilizar y siembra a los fotobiorreactores..... 41
3.5.7. Registro de parámetros físico-químicos en el cultivo..... 41
3.5.8. Monitoreo celular..... 42
3.5.9. Obtención de biomasa microalgal y determinación de lípidos..... 42
3.6. Diseño y distribución experimental..... 45
3.6.1. Análisis funcional..... 46
3.6.2. Distribución experimental..... 46
3.7. Variables a medir..... 47
3.7.1. Condiciones físicas y químicas, registradas dentro y fuera del invernadero y, dentro del cultivo... 47

3.7.2. Determinación del crecimiento microalgal..... 47
3.7.3. Determinación de biomasa microalgal..... 48
3.7.4. Extracción de lípidos..... 48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... 49
4.1. Evaluación de los factores físicos y químicos, influyentes en el crecimiento celular de *Sc. acutus*..... 49
4.2. Determinación del crecimiento microalgal..... 53
4.3. Determinación de biomasa microalgal..... 59
4.4. Extracción de lípidos..... 63
V. CONCLUSIONES..... 64
VI. RECOMENDACIONES..... 65
VII. BIBLIOGRAFÍA..... 67
VIII. ANEXO..... 74
IX. ICONOGRAFÍA..... 85

LISTA DE TABLAS

En el texto **Pág.**

Tabla 01. Composición celular de cepas de microalgas..... 16
Tabla 02. Eficiencia de producción de biodiésel para vegetal y microalgas 17
Tabla 03. Esquema de la distribución de los tratamientos..... 38
Tabla 04. Composición del medio HM..... 40
Tabla 05. Parámetros físicos y químicos registrados en el invernadero (exterior e interior) y, dentro de las unidades experiméntales, en las instalaciones del Programa AQUAREC del IIAP, Mayo – Junio del 2014. Ucayali, Perú..... 49
Tabla 06. Presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0.05$), para la determinación de $x10^3$ células ml-1 durante los diferentes días..... 53
Tabla 07. Se presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedio de LSD Fisher, para la determinación de biomasa seca, obtenido a término de la fase de cultivo (cosecha)..... 60
Tabla 08. Se presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher, para la posible obtención de biomasa seca, estimado para el día 02, según el número de células/ml..... 61

En Anexos

Tabla 09. Se realizó el análisis de datos por día en Microsoft Excel (2010), para obtener el coeficiente de variabilidad..... 75
Tabla 10. Se realizó el análisis de datos por tratamientos en Microsoft Excel (2010), para obtener el coeficiente de variabilidad..... 76
Tabla 11. ANVA para el conteo celular a 01 día de iniciado el cultivo microalgal..... 77
Tabla 12. ANVA para el conteo celular a 02 días de iniciado el cultivo microalgal..... 77
Tabla 13. ANVA para el conteo celular a 03 días de iniciado el cultivo microalgal..... 78

Tabla 14. ANVA para el conteo celular a 04 días de iniciado el cultivo microalgal..... 78
Tabla 15. ANVA para el conteo celular a 05 días de iniciado el cultivo microalgal..... 79
Tabla 16. ANVA para el conteo celular a 06 días de iniciado el cultivo microalgal..... 79
Tabla 17. ANVA para el conteo celular a 07 días de iniciado el cultivo microalgal..... 80
Tabla 18. ANVA para el conteo celular a 08 días de inicio del cultivo microalgal..... 80
Tabla 19. ANVA para el conteo celular a 09 días de inicio del cultivo microalgal..... 81
Tabla 20. ANVA para el conteo celular a 10 días de iniciado el cultivo microalgal..... 81
Tabla 21. ANVA para el conteo celular a 11 días de iniciado el cultivo microalgal..... 82
Tabla 22. ANVA para la determinación de biomasa microalgal..... 82
Tabla 23. ANVA para la determinación posible de biomasa microalgal obtenida al día 02..... 83
Tabla 24. Costos unitarios de los diversos ingredientes del medio de cultivo HM..... 83
Tabla 25. Datos registrados durante el conteo de células por unidad experimental, expresado en 10^3 células/ml durante la fase experimental..... 84

LISTA DE FIGURAS

En el texto **Pág.**

Figura 01. Conteo celular en la cámara Neubauer (lado izquierdo), cuadrantes de la cámara de conteo (lado derecho)..... 20
Figura 02. Registro diario de parámetros físico-químicos, a). Temperatura externa del invernadero, b). Intensidad lumínica..... 42
Figura 03. Obtención de biomasa húmeda, a). Muestra microalgal centrifugada, dividida en biomasa algal y medio liquido; b). Biomasa húmeda microalgal..... 43
Figura 04. Obtención de biomasa seca, a). Muestra microalgal luego del secado (biomasa seca), b). Biomasa seca molida..... 43
Figura 05. Obtención de aceite microalgal, a). Proceso de extracción lípidos, b). Lípidos microalgales logrados..... 44
Figura 06. Distribución del área experimental..... 46
Figura 07. Influencia de la temperatura respecto al crecimiento poblacional celular de los tratamientos en estudio en el cultivo de *Scenedesmus acutus,* a).Temperatura registrada, b). Crecimiento poblacional del cultivo..... 50
Figura 08. Influencia de la intensidad lumínica respecto al crecimiento poblacional celular de los tratamientos en estudio, en el cultivo de *Scenedesmus acutus*..... 52
Figura 09. Crecimiento poblacional de los tratamientos en estudio en el cultivo de *Scenedesmus acutus*. Pucallpa, Perú, 2014..... 54
Figura 10. Muestra microalgal observado en la cámara Neubauer..... 59
Figura 11. Obtención de biomasa microalgal seca de los tratamientos en estudio, comparando la cosecha estimada en el día 02 y la cosecha realizada en el día 11. Pucallpa, Perú, 2014 62

En iconografía

Figura 12. Cultivo de *Scenedesmus acutus,* en ambientes semicontrolados , utilizando fotobiorreactores verticales..... 86

Figura 13. Construcción del invernadero, a). Forrado del invernadero, b). Invernadero terminado..... 86
Figura 14. Cepas de *Scenedesmus acutus* conservadas en agar nutritivo (refrigerado)..... 87
Figura 15. Incubación de células en medio liquido (H2O + medio HM)..... 87
Figura 16. Cepas de *Scenedesmus acutus* en fase exponencial, a). Cultivo en fotobiorreactores, b). Células de *Scenedesmus acutus*..... 87
Figura 17. Fotobiorreactores, a). Elaboración y sellado de los fotobiorre actores, b). Fotobiorreactores de 2 x 0,32 m..... 88
Figura 18. Periodo de prueba del invernadero y fotobiorreactores, a). Vista del invernadero con las U.E; b). Vista frontal del invernadero..... 88
Figura 19. Producción de inoculo de *Scenedesmus acutus* para utilizar en el cultivo experimental..... 88
Figura 20. Las fitohormonas en estudio, a). Ácido giberélico, Kinetina y Ácido indol-3-acético, b). Pesaje para la dosificación..... 89
Figura 21. Activación de las fitohormonas en estudio, a).Dilución de fitohormonas en agua no clorada, b).Almacenamiento..... 89
Figura 22. Análisis de calidad de agua, a). Kit de análisis de calidad de agua marca "LaMotte", b). Análisis de pH de las fitohormonas, c). Análisis de pH del agua a utilizar..... 89
Figura 23. Cultivo *Scenedesmus acutus* durante la fase experimental, a). Día 01 del cultivo, b). Día 05 del cultivo, c). Día 10 del cultivo..... 90
Figura 24. Preparación de Biomasa, a). Llenado en los tubos de ensayo, b). Biomasa lista para ser centrifuga..... 91
Figura 25. Proceso de centrifugación, a). Instalación de los tubos de ensayo en la centrifuga, b). Separación entre la biomasa y el exceso del medio de cultivo..... 91
Figura 26. Obtención de biomasa, a). Biomasa húmeda luego del proceso de centrifugación, b). Estufa utilizada para obtener la biomasa seca microalgal..... 91
Figura 27. Biomasa seca, a). Biomasa deshidratada obtenida después del proceso de secado, b). Biomasa seca embolsada según su tratamiento 92

Figura 28. Funcionamiento del equipo Soxhlet. a). Éter de petróleo distribuido dentro del balón de vidrio, b). Extracción de lípidos microalgales..... 92
Figura 29. Purificación de lípidos, a). Eliminación del resto del solvente con altas temperatura, b). Lípidos microalgales logrados..... 92

RESUMEN

El siguiente estudio compara el efecto de tres fitohormonas en diferentes concentraciones, durante el crecimiento poblacional celular de *Scenedesmus acutus,* para su posterior uso como biodiésel; para ello se empleó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial A x B + 1 [(Fitohormonas x Concentraciones) + Testigo], con un total de 10 tratamiento cada uno con tres repeticiones.

El experimento fue realizado en las instalaciones del IIAP, con el apoyo del programa AQUAREC y financiado por la UNU, con fondos de apoyo a la investigación de FOCAM; instalado el estudio, se activó las fitohormonas y se suplementó a cada UE, según el tratamiento designado; durante 12 días se registró temperatura (29,3 °C), intensidad lumínica (15270 lux) y pH (8.5); los conteos fueron diarios expresados en células/ml.

Los resultados mostraron que durante el segundo día de cultivo alcanzó un incremento celular estadísticamente significativo de 120.23 x 10^3 células/ml con T4 (Ácido giberélico en 25 ppm), debido a que las fitohormonas produjeron un efecto mitógeno sobre las células, sin embargo, los tratamientos suplementados con Ácido indol-3-acetico (T7, T8 y T9) presentaron citotoxicidad, obteniendo un crecimiento menor respecto al TC (Testigo); además, con T3 (Kinetina en 75 ppm) se logró mayor producción de biomasa seca (0.25 gr/L), manteniendo la posibilidad de una mayor obtención de biomasa en una oportuna cosecha; finalmente, se logró la extracción de 11.18% de lípidos sobre la biomasa seca de *Scenedesmus acutus,* necesaria para la obtención de biodiésel.

Palabras claves: Fitohormonas, concentraciones, crecimiento poblacional celular, medio nutritivo, cultivo microalgal, suplemento, lípidos, biodiésel, biomasa seca.

---

*IIAP: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana.
*UNU: Universidad Nacional de Ucayali.
*UE: unidad(es) experimental(es).

ABSTRACT

The following study compares the effect of three phytohormones in different concentrations, during the population growth cell of *Scenedesmus acutus*, for later use as biodiesel; complete design at random was done (DCA) factorial arrangement A x B + 1 [(Phytohormones x Concentrations) + Witness], with a total treatment of 10 with three replications each.

The experiment was conducted at the premises of the IIAP, with support from AQUAREC program and funded by the UNU, funds to support research FOCAM; the studio set, was activated phytohormones and was supplemented to each UE, according to the designated treatment; temperature for 12 days was recorded (29,3 °C), light intensity (15.270 lux) and pH (8.5); daily counts were expressed in cell/ml.

The results showed that during the second day of culture reached a cell increase statistically significant of 120.23 x 10^3 cell/ml with T4 (Gibberellic acid at 25 ppm), because the phytohormone produced a mitogenic effect on cells, however, treatments supplemented with indole-3-acetic acid (T7, T8 and T9) presented cytotoxicity, obtaining a lower growth compared to TC (Witness); further, T3 (Kinetin at 75 ppm) increased production of dry biomass was achieved (0.25 gr/L), maintaining the possibility of obtaining higher biomass in a timely harvest; finally, 11.18% extraction of lipids was achieved on dry biomass of *Scenedesmus acutus*, necessary for obtaining biodiesel.

Keywords: Phytohormones, concentrations, population growth cellular, nutrient medium, microalgal culture supplement, lipids, biodiesel, dry biomass.

---

* EU: unit (s) pilot (s).
* IIAP: Research Institute of the Peruvian Amazon.
* UNU: National University of Ucayali.

I. INTRODUCCIÓN

Los derivados del petróleo son una fuente energética imprescindible en la economía mundial, debido a una casi constante expansión económica, dependiente de un modelo energético basado en el consumo de altos porcentajes de combustibles fósiles, convirtiéndose de esta manera en una energía convencional; al ser no renovable, tenemos como consecuencia el agotamiento de las reservas de petróleo, es por ello, que se ha fomentado a la producción y al uso de biocombustibles, como el biodiésel, y de esta manera poder lograr la reducción de la continua degradación del medio ambiente en el que vivimos.

Rühl (2013) menciona, que el consumo de combustibles fósiles se triplicó en los últimos 50 años, tan igual como los niveles de su demanda. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que en el año 2013 se produjo el triple de muertes por contaminación atmosférica en comparación del número de muertes ocasionadas por accidentes de tránsito en todo el mundo.

En un intento de mitigar los efectos medioambientales por el uso de derivados del petróleo, se fomentó a la producción del biodiésel que fue incorporada como ley en los países participantes del Protocolo de Kioto.

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 biodiésel 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 experiencia de países vecinos en hallar nuevas alternativas de biodiésel, los llevó a una posible solución, siendo esta el agrodiésel, basado en el uso de cultivos agrícolas, con el que se obtuvo buenos rendimientos a un bajo costo; más tarde esta actividad impedía alcanzar el principal objetivo del biodiésel (de ser una energía renovable y amigable con el medio ambiente), llevando al incremento de la deforestación de bosques nativos, la expansión indiscriminada de las fronteras agrícolas y el desplazamiento de cultivos alimentarios (Wikipedia y Colaboradores, 2014).

Cañavate (2008), expone que existen empresas que apuestan a una nueva fuente de biocombustible, el biodiésel a base de microalgas, que se encuentra en fase experimental y según estudios se convertirá en la materia prima de extracción de biodiésel, debido a que la producción de microalgas es mucho mayor a la obtenida por otras fuentes, con relación al tiempo (soja, palma, etc.).

Aguilera y González (1994), mencionan que al suplementar fitohormonas al medio de cultivo donde se encuentra las suspensiones microalgales se obtiene muy buenos rendimientos de biomasa y, por lo tanto, mayor producción de lípidos para su uso como biodiésel.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo comparar tres fitohormonas (***Kinetina, Ácido giberélico*** y ***Ácido indol-3-acético***) con tres diferentes concentraciones (25, 50 y 75 ppm), determinando su efecto en el crecimiento poblacional celular de *Scenedesmus acutus* y, lograr la extracción de lípidos para su uso como biodiésel.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Se consideró como revisión teórica, lo siguiente:

2.1. El cultivo de microalgas.

Son llamadas microalgas a una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton, que abarca desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados auxótrofos (Torrentera y Tacón, 1989).

Buttori y Diruscio (2009) mencionan, que existen referencias en las crónicas de la conquista de México, indicando que los habitantes de los alrededores del lago Texococo, consumían microalgas bajo el nombre de "tecuitlatl", que significa excremento de piedra, estos poseían gusto a queso y eran ligeramente salados. Asimismo, Barros y Buenrostro (1999) refirieron que los campesinos ayudados por redes de finas mallas, barrían las aguas de las lagunas de México en determinadas épocas del año y, obtenían un "barro" de color azul claro, que era muy abundante.

Mientras en Perú, en 1971, mediante un Convenio de Cooperación Técnica Peruano-Alemán, se inició un proyecto para estudiar la posibilidad de una producción masiva de la microalga verde de agua dulce, siendo de la especie *Scenedesmus acutus*; se siguió la tecnología desarrollada en la ciudad de Dortmund, R.F. de Alemania , con el propósito de contribuir a la solución de los problemas alimentarios del país; así transcurrida la etapa experimental, se constituyó en 1978, la primera planta de producción semi-industrial de microalgas en Sausal, cerca de la ciudad de Trujillo, por ser una zona de

excelentes condiciones ambientales y lumínicas, con un método de cultivo basado en el original, con modificaciones notorias para adaptarlo a las condiciones de la costa peruana, obteniendo hasta el doble de rendimiento que en su país de origen (Mejía, *et al.,* 1985).

Estudios paralelos de aplicación dietética y de aceptabilidad, han comprobado su alto valor, sobre todo en la terapia de estados graves de desnutrición en niños y su buena aceptación (Mejía, *et al.,* 1985).

El producto final bajo la forma de polvo puede usarse en el mercado interno, así como en la exportación, donde puede comercializarse a precios bastante interesantes (Pedini y Criado, 1984).

2.2. Las Microalgas.

Son organismos microscópicos fotosintéticos, capaces de fijar carbono (CO2) de la atmósfera, usando como fuente de energía la luz (solar o artificial) y de producir su propio alimento, para multiplicarse y llegar a ser muy abundantes.

Puede usarse para diferentes fines, ya sean alimenticios, de biocombustibles, farmacológicos y de biorremediación. Pero para lograrlo, debemos dominar las técnicas de aislamiento y cultivo, porque aunque existen muchos cepario en el mundo donde podemos comprar cepas, es importante trabajar a gran escala con microalgas que hayan sido aisladas en la zona de estudio, ya que están adaptadas a las condiciones ambientales propias del

lugar y evitamos la introducción de especies "exóticas" y su consecuente daño ecológico (Rodríguez, 2012).

2.3. Formas de cultivo microalgal.

Las formas de cultivo microalgal, depende de los requerimientos y exigencias del organismo, Álvarez (1994) y Gonzáles (2000) indican que encontramos distintas formas de cultivo, destacando las siguientes:

2.3.1. Por su naturaleza.

Los cultivos microalgales se pueden clasificar por su naturaleza en:

- **Cultivo intensivo,** es posible controlar y mantener los factores de crecimiento, para ser posible la obtención de una producción óptima.

- **Cultivo extensivo,** solo pueden ser controladas los factores más accesibles en su manejo, como pueden ser las características del medio nutritivo y la densidad del cultivo.

2.3.2. Por la forma de cosechar los cultivos.

Pueden ser clasificados en:

- **Cultivos continuos,** donde los factores físicos como químicos están sostenidos de forma constante por periodos prolongados, manteniendo siempre un flujo sostenido de requerimientos y de salida del producto.

• **Cultivos semicontinuos,** se realizan cosechas fraccionadas por unidad total durante un tiempo prolongado para reemplazar o renovar el volumen de la cosecha por un nuevo medio nutrido.

• **Cultivos batch,** estos cultivos son intermitentes, se instalan una sola vez y son cosechados completamente después de que la producción algal alcance un nivel apropiado de productividad (células.ml^{-1}, gr.L^{-1}, m.m^{-2}). En el momento de la cosecha, el cultivo debe estar en la fase exponencial.

2.3.3. Por la pureza del cultivo.

Se clasifican según su pureza en:

• **Cultivos axénicos,** son libres de bacterias y estériles, para mantener la productividad por un periodo prolongado de tiempo. Estos cultivos son delicados y de cuidado. Requieren todo el tiempo de material estéril y aséptico.

• **Cultivos monoespecíficos (unialgales),** aquí la población de microalgas está parcialmente contaminada por una pequeña carga de bacterias. Estos cultivos crecen mejor que los anteriores ya que las bacterias excretan sustancias, como vitaminas, que favorecen el crecimiento microalgal, sin embargo, en altas concentraciones bacterianas se pueden producir una inhibición del crecimiento celular.

2.4. Tipos de biorreactores.

Estos pueden ser en "sistemas abiertos", donde los cultivos están expuestos a la atmosfera, o en "sistemas cerrados" comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo no tiene contacto con la atmosfera (Contreras *et al.*, 2003).

2.5. Consideraciones generales durante el cultivo.

Los principales factores que se consideran en toda la producción masiva de algas son la radiación, la turbulencia, el oxígeno disuelto, el pH, carbono, nitrógeno, fósforo e interacción biótica (Álvarez y Gallardo, 1989).

Contreras *et al.*, (2003) manifiestan que los diferentes aspectos de diseños de fotobiorreactores, tanto aquellos que implican el aprovechamiento adecuado de la energía luminosa (ciclo luz-oscuridad, trayectoria de la luz y geometría de fotobiorreactores) como los basados en conceptos fisiológicos (fotoinhibición por oxígeno, cultivo de alta densidad celular, ultra alta densidad celular heterotrofía y mixotrofía), tienen como finalidad, aplicar estos diferentes diseños en la producción de compuestos de alto valor agregado y su uso potencial en la biotecnología ambiental.

2.5.1. Radiación.

En el diseño de un reactor y en la práctica, un factor que limita el crecimiento celular es la luz (Ruiz, 2008). Un aspecto de suma importancia en el cultivo de organismos fotoautótrofos, está relacionado con el aprovechamiento de la energía radiante durante la fotosíntesis. Para una máxima productividad, la saturación de intensidad de luz debería ser distribuida homogéneamente al interior de un fotobiorreactor, lo cual en la práctica resulta complicado en un sistema de cultivo (Ruiz, 2008). La tasa de fotosíntesis celular F (capacidad de captación de fotones) depende de la energía luminosa que reciben las células (Contreras *et al.*, 2003). Cada especie de microalgas a cultivar tiene su propio requerimiento de luz, de esta manera, a medida que se incrementa la luz, también aumenta la productividad, sin embargo, un exceso de esta puede provocar una fotoinhibición (Avalos, 2004). Resulta difícil independizar los efectos de la temperatura y la luz, sobre el crecimiento masivo de las algas. Se sabe que en invierno los cultivos al aire libre crecen menos, pero se ignora si esto se debe a la menor iluminación, a la inferior temperatura o a un efecto de ambas. La producción masiva de microalgas reduce considerablemente la penetración de la luz en el cultivo. Según datos obtenidos por autores, para producciones de 30 gr. m^{-2}. $día^{-1}$ (peso seco), mencionan que las penetraciones de la luz deben llegar entre 07-05 cm, lo cual es común en los sistemas de cultivo masivo de microalgas (Álvarez y Gallardo, 1989).

2.5.2. Tiempo de retención.

El tiempo transcurrido entre cada suministro de medio liquido nuevo es el tiempo de retención, si el sistema se halla en equilibrio dinámico. Por ello, no es preciso tener operando continuamente el sistema de aprovisionamiento de medio de cultivo y poder lograr el crecimiento de las microalgas en los cultivos masivos. Sin embargo, cuando los nutrientes terminan de agotarse, se requiere de la renovación periódica del medio; lo ideal, es que dicho período sea igual al que las algas precisan para consumir (Álvarez y Gallardo, 1989).

2.5.3. Turbulencia.

La aireación es un factor importante en los cultivos masivos, la misma que es producida para la oxigenación del cultivo, contribuyendo al movimiento constante de las células hacia la superficie luminosa, con lo cual, se optimiza la fotosíntesis; además de aportar CO2 para el crecimiento celular (Alveal *et al.*, 1995).

La agitación también impide la sedimentación y favorece la producción para que las algas no se encuentren siempre en la superficie y, así eviten la fotoinhibición, aprovechándose del efecto optimizador de la radiación intermitente. Estos efectos benefician el crecimiento y productividad del cultivo, sin embargo, el verdadero papel de la agitación en el aumento de la producción algal todavía debe ser evaluado (Álvarez y Gallardo, 1989).

2.5.4. Oxígeno disuelto y pH.

El oxígeno producido por las algas durante la fotosíntesis puede alcanzar una concentración tan elevada que inhiba esta acción conocida como «efecto Warburg» por Álvarez y Gallardo (1989), de manera tal, que la producción del cultivo disminuya y en condiciones extremas, puedan incluso causar la muerte de las células por daño oxidativo. En cultivos algales, colocados en exteriores y mantenidos en reactores planos inclinados, se pueden alcanzar concentraciones de liberación de O2 de hasta 9,5 mg. L^{-1} durante las horas de mayor energía radiante, lo que representa 30% más que la concentración de saturación de O2 normal (Conteras *et al.*, 2003).

Otro efecto desfavorable para los cultivos de algas planctónicas es el exceso de luz y oxígeno sobre ellos, efecto denominado fotoxidación. Bajo este contexto, el oxígeno se convierte en un elemento tóxico para los organismos, quienes se protegen de distintas maneras. Una de estas protecciones es mediante la acción de los carotenoides, la enzima dismutasa y otras moléculas que se combinan con el oxígeno en exceso, solo cuando la intensidad lumínica es elevada (Álvarez y Gallardo, 1989).

El pH, es otro aspecto delicado del cultivo masivo, porque la ingestión del carbono inorgánico en las algas tiende a aumentar el pH del medio y desplaza el equilibrio hacia los carbonatos. Las algas no usan los carbonatos, por lo cual pueden encontrarse limitaciones en su crecimiento por el carbono (Álvarez y Gallardo, 1989).

2.5.5. Carbono.

Las principales fuentes de carbono inorgánico para el cultivo masivo de algas son el dióxido de carbono libre y el bicarbonato. Energéticamente, para las algas resulta más directo el primero, puesto que este penetra por difusión en la célula, mientras que el segundo lo hace por transporte activo, siendo las concentraciones más adecuadas de CO2 que permitan el incremento de la producción microalgal optimizando el proceso (Álvarez y Gallardo, 1989).

Por otro lado, los niveles masivos de producción requieren un aporte de carbón inorgánico soluble para lograr la estabilización del pH, el cual contribuye también a obtener un rendimiento máximo de los cultivos, debiendo dosificarse intermitentemente en estaciones de suministro de CO2 distribuidas a intervalos equidistantes a lo largo del tiempo (Alveal *et al.*, 1995).

La adición de bióxido de carbono gaseoso y el aumenta de carbono inorgánico total disuelto, hace que disminuya el pH, obteniéndose así, una capacidad amortiguadora eficiente y tasas mayores de crecimiento microalgal. Para una reproducción celular de 0,8 divisiones por día, se recomienda usualmente concentraciones de 2,4 mm de carbono inorgánico total disuelto (Alveal *et al.*, 1995).

2.6. Medios de Cultivo.

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 esta y el tiempo de almacenamiento de la misma (Torrentera y Tacón, 1989).

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, ya que como se ha mencionado, brindan 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-Schereiber de 1934, hasta fórmulas específicas para familias como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas (Torrentera y Tacón, 1989).

Experiencias del cultivo de *Chlorophyta* (microalgas) en el Perú, lograron determinar un medio nutritivo, denominado "Medio HM" (Heussler-Merino), muy eficaz y de muy bajo costo, posibilitando ahorros del 95% en comparación con el medio f/2 de Guillard (Mejía *et al.,* 1985).

La composición bromatológica de las microalgas estará definida por el aporte balanceado de nutrientes, con especial énfasis en los elementos N, P, K

y Fe, por lo que el medio HM, desarrollado para el cultivo masivo de *Scenedesmus acutus,* permite obtener mayores incrementos poblacionales que el medio estándar, f/2 de Guillard, usualmente utilizado en laboratorios dedicados al cultivo de microalgas para la producción de alimento vivo. La preparación del medio HM, puede estar elaborado con fertilizante usualmente usados en la agricultura convencional (Mejía *et al.,* 1985).

2.7. Generalidades del alga en estudio (*Scenedesmus acutus*).

La microalga de la especie *Scenedesmus acutus,* es una clorófita microscópica cuya principal característica para su cultivo masivo, es su reproducción asexual, realizado mediante la autoesporulación que consiste en la generación de células hijas, en múltiples de 02 hasta 08 células por cenobios, en un proceso que dura de 18 a 24 horas (Merino, 1999).

Presenta un alto contenido de proteínas (55% masa seca) y balanceado contenido de sales minerales, es utilizada en la alimentación humana y representa un gran potencial para la producción de alimento vivo (microcrustáceos), que es de suma importancia en la acuicultura (Heussler, 1985).

Según Meyen (1829), *Scenedesmus acutus* presenta la clasificación:

Reino	:	Plantae
División	:	Chlorophyta
Clase	:	Chlorophyceae
Orden	:	Chlorococcales
Familia	:	Scenedesmaceae
Género	:	*Scenedesmus*
Especie	:	*Scenedesmus acutus* Meyen, 1829.

Ruiz (2011), menciona que es un alga colonial, donde 02, 04 u 08 células alargadas se unen. A menudo, presentan espinas en los extremos. Es común en aguas dulces en condiciones de nutrientes medio - altos. La relación óptima de nutrientes para esta alga es N: P / 16: 1.

Cañavate (2008), menciona que la especie microalgal *Scenedesmus acutus,* en el proceso de la fotosíntesis, emplea la energía del sol y combina el CO_2 atmosférico con el agua, obteniendo como resultado la producción de oxígeno que libera a la atmósfera, además de azucares que la microalga empleará para producir distintas sustancias como celulosa que conforma su estructura, aceites, etc.

La producción masiva de microalgas que se realizan en sistemas cerrados (fotobiorreactores) o abiertos (piletas) deben sustentarse en la utilización de medios de cultivos adecuadamente balanceados, a fin de estandarizar la calidad de la biomasa a producir, esto debe ser a abajo costo para llegar a considerarse como una actividad eminentemente económica (Cañavate, 2008).

Desde el punto de vista de la calidad nutricional, las microalgas demostraron importantes bondades que aunado a su pequeño tamaño, digestibilidad y fácil captura, la convirtieron en un valioso alimento en la acuicultura, principalmente durante los primeros estadios del cultivo (Barnabé, 1996).

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 sobre pasa el 20% (tabla 01); siendo estos químicamente similares al de vegetales comunes, por lo cual se les considera como fuente potencial de biodiésel (Chisti, 2007 y Sheng *et al.*, 2008).

Tabla 01. Composición celular de ciertas especies microalgales.

Cepa (algas de agua dulce)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
Scenedesmus acutus	50 – 56	10 – 17	10 - 11
Scenedesmus quadricauda	47	-	1,9
Scenedesmus dimorphus	8 – 18	21 – 52	16 - 40
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	51 – 58	12 – 17	14 - 22
Dunaliella bioculata	49	04	08
Euglena gracilis	39 – 61	14 – 18	22 - 38
Prymnesium parvum	28 – 45	25 – 33	22 - 38
Tetraselmis maculata	52	15	03
Porphyridium cruentum	28 – 39	40 – 57	09 - 14
Spirulina platensis	46 – 63	08 – 14	04 - 09
Spirulina máxima	60 – 71	13 – 16	06 - 07
Anabaena cylindrica	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 (tabla 02).

Tabla 02. Eficiencia de producción de biodiésel entre cultivos agrícolas y microalgas.

Origen	C.A.	R.A.	U.T.	P.B.
Maíz (*Zea mays L.*)	44	172	66,0	152
Cáñamo (*Cannabis sativa L.*)	33	363	31,0	321
Soya (*Glycine max L.*)	18	636	18,0	562
Piñón (*Jatropha curcas L.*)	28	741	15,0	656
Camelina (*Camelina sativa L.*)	42	915	12,0	809
Canola/colza (*Brassica napus L.*)	41	974	12,0	862
Girasol (*Helianthus annuus L.*)	40	1070	11,0	946
Ricino (*Ricinus communis*)	48	1307	1156	09
Aceite de palma (*Elaeis guineensis*)	36	5366	2,0	4747
Microalgas (contenido aceite bajo)	30	58700	0,2	51 927
Microalgas (contenido aceite medio)	50	97800	0,1	86 515

C.A.: Contenido de aceite (por peso biomasa)
R.A.: Rendimiento de aceite (L aceite/ ha/ año)
U.T.: Uso de tierras (m^2/ año/ kg biodiésel)
P.B.: Productividad biodiésel (kg. biodiésel/ ha año)
Fuente: Mata *et al.*, 2010.

2.8. Técnicas de aislamiento y purificación.

Torrentera y Tacón (1989), nos menciona que existen innumerables metodologías para lograr obtener cultivos monoespecíficos (de una sola especie) y axénicos (libres de contaminantes).

2.8.1. Pipeteo capilar.

Se utiliza para separar microalgas mayores de 10 micras, mediante una pipeta construida con un tubo capilar, a través del microscopio óptico se "pesca" las células y se separan en pequeñas gotas de nutrientes colocados alrededor de una caja de petri o en portaobjetos escavados (Torrentera y Tacón, 1989).

2.8.2. Rayado de placas de agar.

Se transfieren a pequeñas gotas de plancton con un asa de siembra, extendidas por estriado (rompiendo un poco el agar). Este agar se prepara con una solución nutritiva, con una relación de 01 – 1,5% w/v de agar disuelto en el medio nutritivo, se incuba la placa bajo iluminación de 18 °C a 20 °C. De este primer crecimiento se transfiere a tubos con agar inclinado, para luego de un tiempo se transfieren a medios líquidos en subcultivos sucesivos para su purificación, de tal manera que en cada dilución se reduzca el número de organismos en una gota, es recomendable combinar la técnica de diluciones con la de transferencia en placas de agar o en tubos inclinados para obtener cultivos clónales (de una sola colonia o célula), para que finalmente se logre establecer un cultivo monoespecífico. Después de 10 días, pequeñas colonias aparecen sobre la superficie del agar, que se pueden transferir mediante el Método de Hocking o de micropipeta a medios líquidos (Torrentera y Tacón, 1989).

2.8.3. Purificación.

Como ya se mencionó al describir las técnicas de aislamiento, estas mismas nos permiten purificar el cultivo a través de las resiembras clónales sucesivas, pero además es recomendable entre otros métodos el uso de antibióticos para eliminar otros microorganismos, generalmente de tipo bacteriano que estén contaminando el cultivo de microalgas de nuestro interés (Torrentera y Tacón, 1989).

2.9. Determinación de la densidad poblacional celular.

Torrentera y Tacón (1989), mencionan que para estimar la población celular dentro de un cultivo microalgal de forma sencilla, basta con un conteo simple de células por campo. Asimismo existen métodos para realizar conteos de mayor precisión y determinar de una manera más exacta la población celular existente, a continuación se menciona las siguientes metodologías:

2.9.1. Cámara de Neubauer.

Se utiliza para determinar la densidad celular, tiene un margen de error del 05% al 02%, mientras el número de repetición por muestra es mayor a 03 veces. Una vez que se tiene el promedio de células de las cámaras, se dispone al desarrollo del cálculo total de células por mililítro (Torrentera y Tacón, 1989).

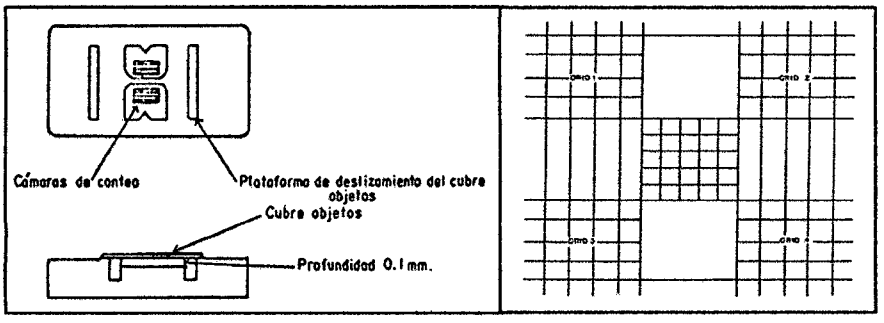


Figura 01. Conteo celular en la cámara Neubauer (lado izquierdo), cuadrantes de la cámara de conteo (lado derecho).

2.9.2. Densidad óptica.

Mediante un espectrofotómetro se determina la concentración celular de la muestra por densidad óptica (calibrando con anterioridad el aparato, siguiendo las instrucciones del manual correspondiente), se determina la transmitancia (Nm) que se extrapola con la recta patrón antes determinada, que corresponde a la especie problema (se construye graficando transmitancia versus el número de células/ml). Así en la intersección de la recta se conoce la concentración (Nm) y se puede calcular la cantidad de microalgas de la muestra problema. Por otro lado, conociendo la ecuación de la recta de cada gráfica, según la especie, se determina directamente la concentración de células de la muestra sustituyendo el valor dé la transmitancia en esta ecuación (Torrentera y Tacón, 1989).

2.9.3. Volumen celular.

Por centrifugación, se obtiene "un paquete" o "pastilla celular" que desechando el sobrenadante, puede ser pesado y determinado en unidades de

peso w/v, la cantidad de células o biomasa de la muestra problema en peso húmedo o peso seco (Torrentera y Tacón, 1989).

2.9.4. Composición química.

En algunos estudios se puede determinar la concentración de clorofila A, B y otros pigmentos presentes en la muestra. Debe considerarse que la composición química del fitoplancton varía de acuerdo con el tipo de cultivo usado, medio nutritivo y otros factores, por lo que es necesario realizar el estudio de la composición química (análisis proximal) en relación al tipo de cultivo desarrollado (Torrentera y Tacón, 1989).

2.10. Extracción de lípidos a partir de microalgas.

Cañavate (2008), menciona que las microalgas podría convertirse muy pronto en la materia prima más efectiva para biodiésel, por encima de la mayoría de cultivos energéticos tradicionales. De hecho, ya son muchas las personas que lo han corroborado, tanto científicos e investigadores con muchos años de indagación en el tema, como empresarios que comienzan a disfrutar de su rentabilidad.

Barraza *et al.,* (2009) indican la siguiente metodología.

2.10.1. Primera fase: obtención de la biomasa microalgal.

- **Sedimentación por gravedad,** es necesario separar el cultivo en una fase líquida y en una fase sólida (biomasa). El sistema debería comprender preferentemente medios para realizar esta separación, que puede ser conseguida por varios procesos (Barraza *et al.,* 2009).

- **Centrifugación,** esto implica hacer girar el material de crecimiento muy rápidamente, exagerando los efectos de gravedad. Esto puede ser usado de dos formas, la primera es separar rápidamente las células de algas del material de crecimiento, dejando algas con mucha densidad (concentración aproximadamente del 20%); la segunda, combina la centrifugación con microfiltración, haciendo girar el material de crecimiento y algas contra microfiltros o micro pantallas que permiten que el material de crecimiento pase a través, reteniendo las algas. Mientras ambas maneras son eficaces, el uso de centrifugadoras requiere cantidades grandes de electricidad, lo que puede aumentar los gastos de manera importante (Barraza *et al.,* 2009).

- **Secado,** se pueden secar al sol o dentro de un invernadero, generalmente la composición de algas (materia seca) contiene alrededor de 46% de carbón, 10% de nitrógeno, 01% de fosfatos (Barraza *et al.,* 2009).

2.10.2. Segunda fase: obtención de aceite y purificación.

- **Prensado,** cuando las algas son secas retienen el aceite, que puede ser exprimido con una prensa, extrayendo un gran porcentaje de aceite (70% al 75%). Muchas empresas de extracción de aceite vegetal utilizan una combinación mecánica y solventes químicos; el producto químico más utilizado es el solvente hexano, además del benceno y el éter (Barraza *et al.,* 2009).

- **Mezclador y filtrador,** la extracción por medio del hexano puede usarse solo o combinado con el método de exprimir. Después de que el aceite haya sido extraído por este método, la pulpa restante puede ser mezclada con ciclohexano para extraer el aceite restante. El aceite se disuelve en el ciclohexano, y la pulpa es eliminada de la solución (Barraza *et al.,* 2009).

- **Destilador,** el aceite y el ciclohexano son separados por medio de la destilación. Estas dos etapas (extracción en frío y solvente hexano) juntas serán capaces de sacar más del 95% del aceite total presente en las algas (Barraza *et al.,* 2009).

- **Reciclo de Agua,** como es un sistema de flujo continuo, no es necesario eliminar el agua, sino solo hacer un reciclo al estanque, el cual no tendrá un efecto negativo, ya que este flujo solo posee trazas de microalgas y agua en mayor medida (sin peligro de toxicidad);

posteriormente se agrega CO2 y nutrientes necesarios para su reutilización (Barraza *et al.*, 2009).

- **Pureza del Aceite,** la pureza del aceite, al final del proceso de destilación, es relativa y depende de muchos factores. Entre los factores encontramos el tipo de alga cultivado, cantidad de nutrientes en el medio, radiación de energía solar, entre otras (Barraza *et al.*, 2009).

2.11. Reguladores de crecimiento.

Roca y Shinge (1993), mencionan que actualmente se reconoce cinco tipos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, dividido en tres grupos principales:

- Promotores del crecimiento (auxinas, citocininas y giberelínas).
- Inhibidores del crecimiento (ácido abscísico).
- Etileno.

De los cinco sistemas químicos incluidos en este grupo, las auxinas y giberelínas estimulan principalmente la elongación celular; las citoquininas estimulan la división celular (Hurtado y Merino, 1988); las hormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugares diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y, activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de este producto natural, se han desarrollado también otros de tipo sintético, junto con las hormonas, se les denomina "reguladores" y, son

los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetizada. También determina el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Hartmann y Kester, 1995).

En el cultivo in vitro de las plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxinas y citocininas, desempeñan un papel muy importante, se puede decir que el cultivo in vitro es generalmente imposible sin reguladores, por lo tanto, a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal. Por ejemplo, explantes que producen suficiente cantidad de citocininas, no precisan de ninguna adición exógena. Otros explantes que producen suficiente cantidad de auxinas, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o división (Hall y Rolf, 1974). Se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento de células, tejidos, órganos, entre otros:

- Cultivos que no necesitan ni auxinas ni citocininas
- Cultivos que necesitan solo auxinas
- Cultivos que necesitan solo citocininas
- Cultivos que necesitan auxinas y citocininas

En el caso de especies con las que no se hayan trabajado previamente, se debe plantear si sus tejidos u órganos necesitarán reguladores exógenos, para su crecimiento y desarrollo in vitro. Se deberán, por tanto, determinar las cantidades absolutas y relativas, de auxinas y/o citocininas que deben

añadirse. Otros reguladores como giberelínas y etileno, pueden también ser necesarios (Pierik, 1991).

2.11.1. Características principales de las Auxinas.

Kononowicz y Janick (1984), indican que una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base, este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión. Las auxinas han sido implicadas en la regulación de un número de procesos fisiológicos:

- Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto la planta presenta un crecimiento longitudinal.
- Estimulan el crecimiento y maduración de frutas.
- Floración.
- Senectud.
- Geotropismo.

La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las células que se encuentran en la zona clara de la planta, esto produce una curvatura de la punta de la

planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo (Kononowicz y Janick, 1984); estas acciones de las auxinas son:

- Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes.
- Dominancia apical.

El efecto inicial de la hormona que subsecuentemente regula estos eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática y, un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas. Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir el agrandamiento y alargamiento celular, sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Kononowicz y Janick, 1984).

Existen varias auxinas llamadas "naturales", que incluyen el Ácido Indolacético, también se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente, son las llamadas "auxinas sintéticas", entre las cuales el 2,4-Diclorofenoxiacetico, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente (Linsmaier y Skoog, 1965).

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar

en un solo caso; sin embargo, en general se utiliza el Ácido indolacético en concentraciones que varían de 0,001 a 10,0 mg/L, con un punto óptimo de 0,1 a 1,0 mg/L; el 2,4-Diclorofenoxiacetico se utiliza en concentraciones que varían de 0,1 a 10 mg/L, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 01 a 05 mg/L; el Ácido Naftalenacético generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (01 a 10 mg/L), con un punto óptimo cerca de 02 mg/L. A menudo es necesario una concentración de auxinas sustancialmente menor para mantener los cultivos. En algunos casos, la adición de una de las auxinas al medio basal puede ser suficiente para iniciar y sustentar el crecimiento (González *et al.,* 1999).

- **Ácido indol-3-acético (Auxina).**

Las auxinas promueven el crecimiento de las plantas principalmente por un aumento de la expansión celular. De acuerdo con la hipótesis del "efecto ácido" sobre el crecimiento, las auxinas estimulan la actividad de la bomba de protones (H+-ATPasa) localizada en la membrana plasmática a través de dos mecanismos: activación de las bombas preexistentes y por inducción de síntesis de nuevas H+-ATPasas. La extracción de protones hacia la pared celular genera una reducción del pH (acidificación) lo que a su vez activaría proteínas que rompen enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de la pared. Los candidatos más probables para este papel inicial son las expansinas, proteínas de pared que favorecerían inicialmente a la plasticidad de la célula. Otras enzimas

hidrolíticas actuarían posteriormente y la célula crecería como resultado de la presión de turgor generada por la vacuola y por el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también parecen ser regulados por auxinas. Las auxinas también inducen la síntesis de giberelínas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas también estimularían el crecimiento en forma indirecta (Hager, 2003).

2.11.2. Características principales de las Giberelínas.

El Ácido giberélico (GA3) fue el primero de esta clase de hormonas en ser descubierta. Las giberelínas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como se observa para las auxinas, aunque en algunas especies existe un movimiento basi pétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis), además de ser encontradas en el floema, las giberelínas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta (González *et al.,* 1999).

- **Ácido giberélico (Giberelína).**

El efecto más notable de las GAs es inducir crecimiento en altura, en muchos casos atribuibles a GA 1 endógena. En el caso de plantas enanas, estas sintetizan solo pequeñas cantidades de GA 1, en cambio, en variedades denominadas nana (muy enana), dicha síntesis mínima no

se da al bloquearse la secuencia de síntesis antes de alcanzar la fase de GA 12-aldehído. Otras interrupciones ocurren entre GA 20 y GA 1. El aislamiento del "gene mendeliano para altura" demostró que este codifica para la enzima GA 3-β-hidroxilasa que convierte al GA 20 inactiva en GA 1 activa. Técnicas químicas modernas de detección han mostrado que plantas altas poseen GA 1 mientras que en enanas predomina GA 20 (Hedden y Kamiya, 1997).

2.11.3. Características principales de las Citocininas.

Inhibe el crecimiento celular y la fotosíntesis. El ácido abscísico (ABA), conocido anteriormente como dormina o agscisina, es un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas. Químicamente es un terpenoide que es estructuralmente muy similar a la porción terminal de los carotenoides (González *et al.,* 1999),

El ácido abcísico es un potente inhibidor del crecimiento que ha sido propuesto para desempeñar un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico, y por lo tanto tiene efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelínas y citocininas). Típicamente la concentración en las plantas es entre 0,01 y 01 ppm, sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en semillas y frutos jóvenes y la base del ovario (González *et al.,* 1999).

- **Kinetina (Citocinina).**

La aplicación de citocininas estimula la progresión del ciclo celular. En primer lugar, a nivel de la fase G1, citocininas más otras hormonas (auxinas) inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins, 2002). Las citocininas también estimularían la entrada a la fase M, probablemente por activación de una fosfatasa.

En conclusión se puede mencionar que entre las principales funciones, las auxinas promueven la elongación celular, inhiben el crecimiento de raíces primarias, mediante la respuesta a tropismos, reprimen la abscisión de órganos e inducen el desarrollo floral y de frutos. Aunque con modo de acción distinto, las giberelínas también son una familia de hormonas que regulan positivamente el crecimiento de la planta, especialmente la elongación de tallos. También promueven la movilización de reservas y germinación de semillas, así como el desarrollo floral y de frutos. Por otro lado, las citocininas son hormonas que estimulan la división celular, activan la brotación de yemas, inducen organogénesis y retardan la senescencia (González *et al.*, 1999).

2.12. Reportes de la aplicación de fitohormonas en el cultivo de microalgas.

Fernández (1980) nos menciona que los estudios sobre la acción de las hormonas vegetales o sustancias de crecimiento en algas unicelulares se han visto limitadas, en la mayoría de los casos, a sus efectos sobre los fenómenos

de crecimiento celular, sin embargo, pueden afectar dichas hormonas a otros fenómenos metabólicos de las algas unicelulares.

Algunos autores han visto en plantas superiores, que las sustancias de crecimiento vegetal pueden actuar, a través de mecanismos enzimáticos, en los procesos de síntesis y degradación de polisacáridos, tanto de reserva como estructurales. Aguilera y González (1994), determinan que los efectos de cinco fitohormonas (Ácido indol-3-acético) Zeatína, Kinetina, Ácido giberélico y Ácido Abcísico sobre la proliferación de la Praxinoficea marina *Tetraselmis* sp; se observa un incremento estadísticamente significativo referente a la tasa de división de esta especie, cuando el medio de cultivo es suplementado con Zeatína, Ácido Abcísico, Ácido giberélico y Kinetina, observándose una disminución en su crecimiento cuando el cultivo crece en presencia de Ácido indol-3-acético. Este efecto mitógeno que exhiben alguna fitohormonas frente a *Tetraselmis* sp parece confirmar la necesidad de este tipo de factores de crecimiento para la proliferación celular, al igual que ocurre en líneas celulares de mamífero y en ciertas especies de microalgas. Este hecho concuerda con la hipótesis que supone la existencia de un mecanismo universal que controla el ciclo de división celular en todas las líneas eucariotas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y duración del experimento.

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Artificial de Peces Amazónicos del "Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana", IIAP-Ucayali; geográficamente está ubicado a 08° 23′ 39.6" de latitud sur y 74° 34′ 39.8" longitud oeste, a 154 m.s.n.m.

El trabajo de investigación se desarrolló entre la última semana de Noviembre del 2013 y la segunda semana del mes de Junio del 2014, teniendo un tiempo de duración de 07 meses.

3.2. Ecología y clima.

Según el Sistema Holdrige, Ucayali se clasifica como "bosque húmedo tropical" y según la clasificación de los bosques amazónicos, pertenece al ecosistema "bosques tropicales semihúmedo, siempre verde estacional", según Cochrane (1982), las condiciones climáticas promedios para la zona de Pucallpa son:

- Temperatura máxima anual: 36,5 °C.
- Temperatura media anual: 26,9 °C.
- Temperatura mínima anual: 17,4 °C.
- Precipitación promedio anual: 1773 mm.

3.3. Materiales y equipos.

Durante el trabajo experimental se utilizaron los siguientes materiales y equipos, agrupados de acuerdo por:

3.3.1. Materiales biológicos y orgánicos.

Los materiales biológicos y orgánicos utilizados durante el trabajo experimental son los siguientes:

- *Scenedesmus acutus* Meyen (1829); adquirido con el apoyo de la Universidad Nacional del Santa, Chimbote, Perú.
- Fitohormonas, adquirido del laboratorio Gold Biotechnology, ubicado en St. Louis, MO, en USA.
  - Kinetín, (Kinetina) en 25 gr, con código K-100-25.
  - Gibberellic Acid 3 (Quick-Dissolve™) en 25 gr, con código G-120.
  - IAA (Indole-3-Acetic Acid) en 25 gr, con código I-110-25.

3.3.2. Insumos para el medio HM (medio nutritivo).

Los insumos para formular el medio nutritivo "HM" son los siguientes:

- Urea en 25 kg, fertilizante agrícola.
- Cloruro de potasio en 25 kg, fertilizante agrícola.

- Fosfato de Amonio en 25 kg, fertilizante agrícola.
- 05 gr. de clavos de ½ pulg.
- Agua destilada.
- Ácido muriático.

3.3.3. Materiales y equipos utilizados en la elaboración de biorreactores.

Para la elaboración de los fotobiorreactores se necesitaron los siguientes materiales y equipos:

- 01 Rollo de manga plástica transparente (12 x 08).
- 30 Válvulas o llaves de agua (¾ pulg).
- 60 Niples de PVC.
- 60 Tuercas.
- Silicona transparente, marca Sika.
- Teflón.
- Selladora de bolsa, marca KAZO, modelo SF-600L.

3.3.4. Implementación del invernadero.

Para la implementación del sistema de aireación y soporte se utilizó los siguientes materiales:

- 02 paquetes de pali globos (blanco).
- 02 Termómetros de pared.
- 01 rollo de manguera de silicona 04 mm.
- 02 paquetes de pase de aire en formas "T" y "+", de 04 mm.
- 03 paquetes de válvulas de aire platicas de 04 mm.
- 01 paquete de ligas.

3.3.5. Materiales y equipos para la extracción de lípidos.

Para la extracción de lípidos se necesitó los siguientes materiales y equipos:

- Equipo de Soxhlet (destilación).
- Soporte universal.
- Cloroformo.
- Éter de petróleo.
- 01 Frascos ámbar de 1 L de capacidad.

- Balanza analítica, marca A&D, modelo HR200.
- Autoclave, marca J.P.Selecta.
- Estufa, marca J.P.Selecta, modelo Digitheat.
- Papel filtro.

3.3.6. Equipos de laboratorio utilizados durante el cultivo.

Durante el trabajo experimental se utilizaron los siguientes equipos:

- Microscopio binocular, marca Zeiss.
- pHmetro, marca Hanna, modelo HI8424.
- Luxómetro, marca HQR, modelo lx-1010BS.
- Bomba de aire de 02 salidas.
- Sistema de Blowers de 02 HP.
- Cámara de Neubauer, marca Marienfield, profundidad de 0,100mm.
- Centrifuga, marca BOECO, modelo C-28.
- Estufa, marca J.P.Selecta, modelo Digitheat.
- Destilador de agua, marca Ivymen Systems, modelo AC-L4.

3.4. Tratamientos en estudio.

Cada fitohormona en estudio estuvo en interacción con las diferentes concentraciones, de acuerdo con los tratamientos formulados en el tabla 03:

Tabla 03. Esquema de distribución de los tratamientos.

TC	Sin adición de fitohormona
T1	25 ppm de Kinetina
T2	50 ppm de Kinetina
T3	75 ppm de Kinetina
T4	25 ppm de Ácido giberélico
T5	50 ppm de Ácido giberélico
T6	75 ppm de Ácido giberélico
T7	25 ppm de Ácido indol-3-acético
T8	50 ppm de Ácido indol-3-acético
T9	75 ppm de Ácido indol-3-acético

T *= Tratamientos
TC= Tratamiento Control

3.5. Desarrollo del experimento.

Durante el trabajo experimental se realizó la siguiente metodología:

3.5.1. Instalación del invernadero.

Para el experimento se realizó la construcción de un módulo (invernadero), siendo las dimensiones 03 m de ancho x 05 m largo y 02 m de

alto, con piso de cemento semipulido, con buen drenaje, las paredes y techo estuvieron forradas con mica transparente N° 12, para permitir el ingreso de rayos solares, se albergó 30 fotobiorreactores, cada uno con capacidad de 60 L, pudiendo cultivarse dentro del módulo una capacidad total de 1.800 L de microalgas en suspensión. Durante el desarrollo del experimento se hizo uso de la tercera parte de su capacidad, por ser un proyecto de investigación más no de producción; sobre la instalación de aire, se realizó por medio de un sistema de Blowers de 02 HP, que se distribuyó para todo el cultivo microalgal.

3.5.2. Elaboración de los fotobiorreactores.

El fotobiorreactor fue diseñado de acuerdo con el modelo propuesto por Ynga (2011), con algunas modificaciones en cuanto a las dimensiones, presentando 32 cm de ancho x 02 m de alto.

3.5.3. Preparación del medio nutritivo.

El medio nutritivo elegido para el cultivo en estudio fue el "Medio HM" (Heussler-Merino), el cual se especifica en el tabla 04. Las soluciones patrones fueron preparadas utilizando agua no clorada y, mantenidas en refrigeración antes de su uso (Mejía, *et al.* 1985).

Tabla 04. Composición del medio HM.

Sustancia	gr L^{-1}	Patrón	Elemento (gr L^{-1})
Urea	206	20,6 gr en 100 ml	**N= 96,0**
Cloruro de potasio	19	1,9 gr en 100 ml	**K= 10,4**
Ácido fosfórico	35	3,5 gr en 100 ml	**P= 11,1**
Solución clavos (x)	2,5	2,5 gr en 1.000 ml	**Fe= 2,5**

(x): la solución de Fierro se preparó disolviendo 2,5 g. de clavos en HCl comercial.
Fuente: Mejía, *et al.* 1985

Con el fin de asegurar el adecuado aporte de nutrientes para los cultivos algales, se agregó 01 ml de cada solución patrón por litro de suspensión algal.

3.5.4. Purificación de cepas microalgales.

Las muestras proporcionadas por la Universidad Nacional del Santa en Chimbote, Perú; fueron verificadas, observando la presencia organismos ajenos (como *Oscillatoria* sp), por lo tanto, se procedió a la purificación del cultivo *Scenedesmus acutus*, a través de la técnica de dilución propuesto por Torrentera y Tacón (1989).

3.5.5. Preparación de las soluciones de las fitohormonas.

A tres días de iniciar la fase experimental, las soluciones acuosas (fitohormonas), fueron activadas de acuerdo con los procedimientos indicados por el laboratorio de su procedencia.

3.5.6. Volumen de inoculo microalgal a utilizar y siembra a los fotobiorreactores.

La cantidad de inoculo que se preparó para iniciar el experimento, fue de 300 L de microalgas, cada unidad experimental requirió de 20 L, conformado por 04 L de inoculo y 16 L de agua más nutrientes, fue necesario colocar dos inyectores de aire (del sistema de Blowers) en cada una de las UE, para mantener la remoción constante que necesita el cultivo, además de evitar los campos muertos.

3.5.7. Registro de parámetros físico-químicos en el cultivo.

Se registraron parámetros físicos y químicos cada 03 horas simultáneamente, de 7:00 am hasta las 4:00 pm, las cuales fueron tomadas fuera, dentro del invernadero y en cada suspensión algal.

A. Parámetros químicos.

Las variaciones del pH fueron monitoreadas diariamente para poder establecer alguna relación con el número de células presentes en los cultivos, para dicha actividad se utilizó un pHmetro digital.

B. Parámetros físicos.

Se registró la temperatura ambiental, las cuales fueron tomadas fuera y dentro del invernadero, para esta actividad se hizo uso de dos termómetros de pared, cada uno fue colocado en sus respectivas áreas;

mientras que la temperatura registrada dentro de las suspensiones algales, utilizando un termómetro digital (figura 02).

La intensidad lumínica fue registrada cada 03 horas durante el día, utilizando para ello un luxómetro digital, para cada toma de datos se localizó 05 puntos dentro del invernadero (figura 02).

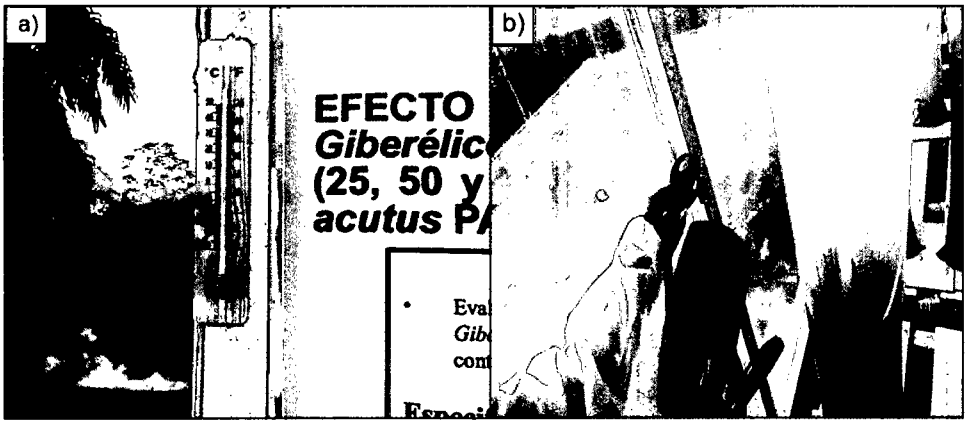


Figura 02: Registro diario de parámetros físico-químicos, a). Temperatura externa del invernadero, b). Intensidad lumínica.

3.5.8. Monitoreo celular.

Se realizó el conteo celular diario (09:00 am) empleando una cama de Neubauer, para ello se extrajo tres muestras de cada UE, con la ayuda de un microscopio binocular y con un objetivo de 10 X; se logró determinar las células por mililítro existentes.

3.5.9. Obtención de biomasa microalgal y determinación de lípidos.

Se sedimentó por 01 día, se centrifugó y se deshidrató, para luego obtener la biomasa seca algal.

A. Obtención de biomasa húmeda.

Se utilizó una centrifuga, para sedimentar las suspensiones microalgales para cada UE, a 5.000 rpm por espacio de 05 minutos y obtener la biomasa húmeda o pasta microalgal (figura 03).

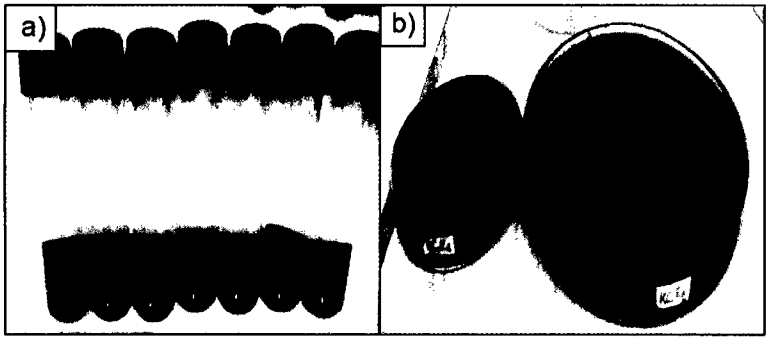


Figura 03. Obtención de biomasa húmeda, a). Muestra microalgal centrifugada, dividida en biomasa algal y medio liquido; b). Biomasa húmeda microalgal.

B. Obtención de biomasa seca.

Se utilizó una estufa puesta a operar a 60 °C por un lapso de 08 horas, obteniendo así la biomasa deshidrata o seca (figura 04).

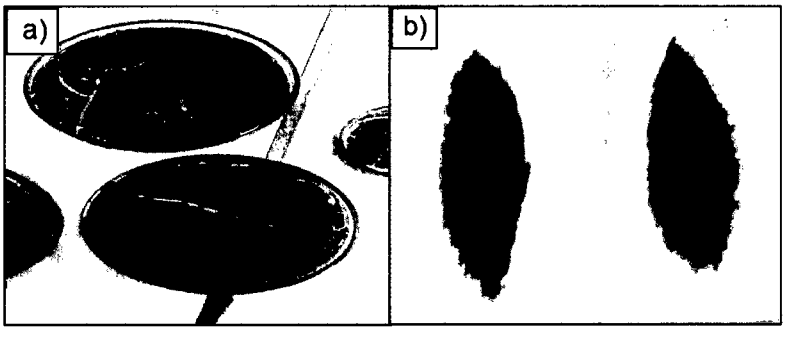


Figura 04. Obtención de biomasa seca, a). Muestra microalgal luego del secado (biomasa seca), b). Biomasa seca molida.

C. Extracción de lípidos.

Se pesó tres muestras de 05 gr de biomasa seca, cada una se empacó en papel filtro (cartuchos), al instalar el extractor Soxhlet se introdujo el cartucho dentro de la cámara de muestra, del balón de fondo plano fue llenado con 100 ml de Éter de Petróleo (solvente) para ser puesto a operar durante 02 horas; se logró obtener el solvente mezclado con los lípidos algales (dentro del balón), por lo que se procedió a extraer el solvente por evaporación (solo quedaron los lípidos), exponiéndolo en una estufa a una temperatura de 80 °C por 04 horas, para finalmente pesar el lípido obtenido (figura 05).

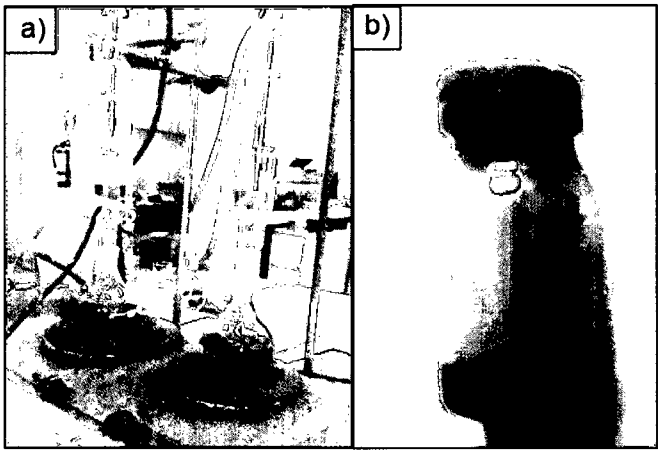


Figura 05. Obtención de aceite microalgal, a). Proceso de extracción lípidos, b). Lípidos microalgales logrados.

3.6. Diseño y distribución experimental.

En la presente investigación se utilizó un arreglo factorial 3 x 3 + 1, teniendo como Factor A, las fitohormonas (Kinetina, Ácido giberélico y Ácido indol-3-acético) y, como Factor B, las concentraciones en estudio (25, 50 y 75 ppm) y un testigo absoluto (Testigo); con tres repeticiones.

Modelo Matemático

$$Y_{ijk} = U + a_i + b_j + T_{i\,(ai + bj)} + e_{ijk}$$

Dónde:

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

U :Media de la población.

a_i : Es el efecto del i-ésimo factor A en estudio.

b_j : Es el efecto del j-ésimo factor B en estudio.

$a_i\, b_j$: Es el efecto del i-ésimo factor A por el efecto del j-ésimo factor B en estudio- efecto de interacción.

E_{ij} : Es el error residual cuando $\mu = 0$ en una NID.

i : i-ésimo factor, 1 hasta n.

j : j-ésimo factor, 1 hasta n.

3.6.1. Análisis funcional.

Una vez tomados los datos para la evaluación de las variables y de procesar el ANOVA, se tuvo que realizar el cálculo del coeficiente de variación, para luego proceder al análisis de los resultados con la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0.05$), de los factores en estudio y sus interacciones.

3.6.2. Distribución experimental.

La distribución de las unidades experimentales dentro del módulo, se realizó de la siguiente forma (figura 06):

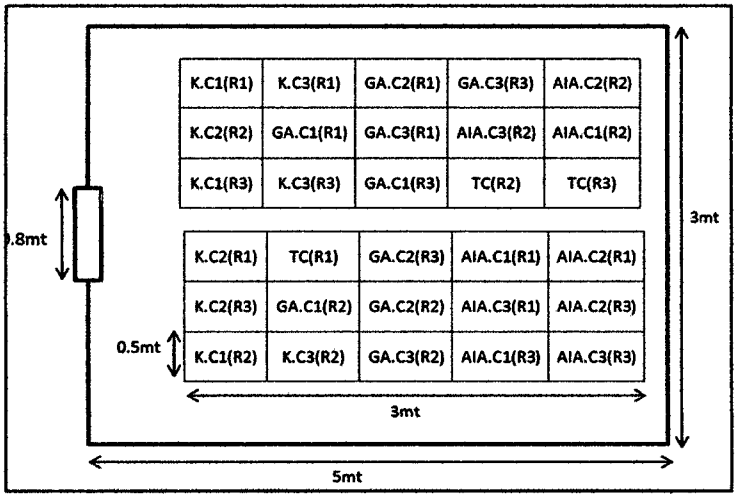


Figura 06. Distribución del área experimental.

C1: Concentración 1 (25 ppm). R1: Repetición 1.

C2: Concentración 2 (50 ppm). R2: Repetición 2.

C3: Concentración 3 (75 ppm). R3: Repetición 3.

3.7. Variables a medir.

Se consideró cuatro principales variables a medir, siendo las siguientes:

3.7.1. Condiciones físicas y químicas, registradas dentro y fuera del invernadero y, dentro del cultivo (UE).

Se realizó durante los 12 días de establecido la fase experimental, fueron registrados cada 03 horas durante el día, teniendo como hora de inicio las 7:00 am y finalizando a las 4:00 pm.

Se registró las temperaturas externas e internas del invernadero, utilizando termómetros de pared, además se registró la temperatura expresada dentro del cultivo, utilizando un termómetro digital. Para registrar los datos de intensidad lumínica (lx), se utilizó un luxómetro digital; también se registró el pH expresado dentro de las suspensiones algales, correspondientes a los parámetros químicos, haciendo uso de un pHmetro digital.

3.7.2. Determinación del crecimiento microalgal.

El recuento poblacional para el cultivo de *Scenedesmus acutus,* se realizó por un periodo de 12 días, desde el 22 de Mayo al 02 de Junio del 2014, extrayendo diariamente tres muestras de cada unidad experimental con ayuda de una pipeta Pasteur; se realizó el conteo celular respectivo en un microscopio binocular, determinando su densidad a través de una cámara de Neubauer.

3.7.3. Determinación de biomasa microalgal.

Al obtener la biomasa de cada unidad experimental, luego de haber pasado por un proceso de sedimentación, centrifugación y secado, para lograr un peso constante, y proceder a pesar la biomasa seca obtenida por cada unidad experimental.

3.7.4. Extracción de lípidos.

La extracción de lípido se realizó por medios químicos, empleando una extractora Soxhlet y éter de petróleo; logrando retener los lípidos que posteriormente fueron pesados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación de los factores físicos y químicos, influyentes en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus acutus*.

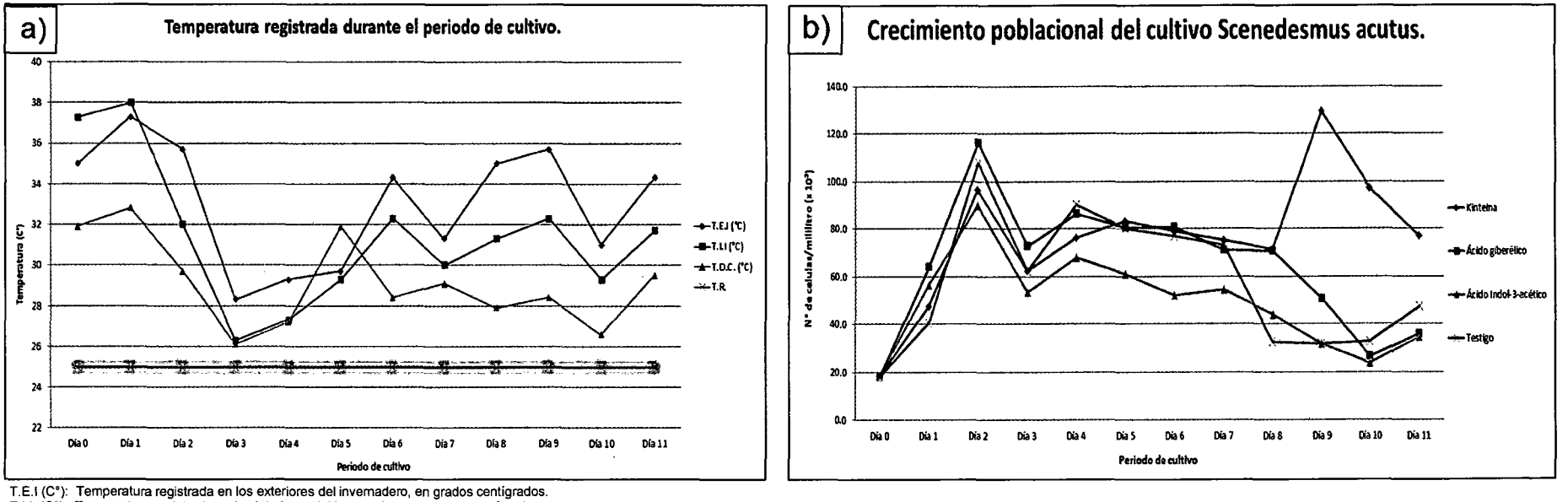
Se registró los factores físicos del ambiente durante la fase experimental (tabla 05). Dentro del cultivo, la temperatura máxima, oscilo en un rango de 29,6 °C a 46,9 °C, la temperatura mínima presentó un rango de 21,5 °C a 29,8 °C y, la temperatura media se encontró en un rango de 26,1 °C a 32,6 °C, los cuales superan al promedio requerido (25 °C) para el buen desarrollo del cultivo microalgal (figura 07).

Tabla 05. Parámetros físicos y químicos registrados en el invernadero (exterior e interior) y, dentro de las unidades experiméntales, en las instalaciones del Programa AQUAREC del IIAP, Mayo – Junio del 2014. Ucayali, Perú.

Día	Exteriores del Invernadero			En el interior del Invernadero						En las suspensiones microalgales					
	Temperatura (C°)			Temperatura (C°)			Intensidad lumínica (100 lx.)			Temperatura (C°)			pH		
	Mx.	Mn	Mp	Mx	Mn	Mp	Mx.	Mn	Mp	Mx.	Mn.	Mp	Mx	Mn	Mp
00	37	33	35,0	40	35	37,3	734	28	259,8	35,3	29,8	31,9	9,8	8,3	9,4
01	39	35	37,3	41	36	38,0	920	32	252,6	46,9	28,9	32,8	9,6	8,5	9,1
02	40	29	35,7	34	30	32,0	170	37	77,1	40,0	25,0	29,7	9,8	8,0	8,9
03	33	22	28,3	30	21	26,3	104	21	54,6	29,6	21,5	26,1	9,8	7,8	9,0
04	31	28	29,3	29	26	27,3	198	15	70,7	30,1	25,0	27,2	9,7	8,2	8,9
05	32	28	29,7	34	26	29,3	108	47	71,6	38,6	25,0	31,9	9,8	8,1	8,9
06	39	30	34,3	37	29	32,3	140	19	46,4	31,5	25,0	28,4	9,6	8,2	8,8
07	33	29	31,3	31	29	30,0	95	25	54,7	32,4	24,3	29,1	9,2	7,6	8,6
08	37	33	35,0	34	28	31,3	107	27	65,0	32,0	24,7	27,9	9,8	6,4	8,5
09	37	34	35,7	34	31	32,3	130	20	67,8	38,6	25,0	28,4	9,8	7,6	8,8
10	39	26	31,0	35	25	29,3	167	26	78,9	30,4	22,1	26,6	9,8	7,6	8,6
11	40	29	34,3	38	26	31,7	100	23	63,0	32,4	23,4	29,5	9,7	7,7	8,6

.- Mn: Medida mínima. - Mp: Medida promedio. - Mx: Medida máxima.

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, siendo la temperatura promedio de 29 °C, es decir 04 °C de diferencia, en el cual el cultivo de microalgas se adaptó muy bien.



T.E.I (C°): Temperatura registrada en los exteriores del invernadero, en grados centígrados.
T.I.I. (C°): Temperatura registrada en los interiores del invernadero, en grados centígrados.
T.D.C.(C°): Temperatura registrada dentro de los cultivos algales, en grados centígrados.
T.R. : Temperatura requerida.

Figura 07. Influencia de la temperatura respecto al crecimiento poblacional celular de los tratamientos en estudio en el cultivo de *Scenedesmus acutus,* a).Temperatura registrada, b). Crecimiento poblacional del cultivo.

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, siendo la temperatura promedio de 29 °C, es decir 04 °C de diferencia, en el cual el cultivo de microalgas se adaptó muy bien.

En la figura 07, podemos observar que la tendencia de las temperaturas registradas es congruente al comportamiento que presenta la curva de células por mililítro, esto explica que en el día 03, se presentó un declive en la curva de células por mililítro, coincidiendo con las bajas temperaturas registradas ese día.

La intensidad lumínica presentada en la fase experimental, oscilo en un rango máximo de 95 x 10^2 lx a 920 x 10^2 lx, un rango mínimo de 47 x 10^2 lx a 1 x 10^2 lx, mientras que la media registrada estuvo en un rango de 46,4 x 10^2 lx a 259 x 10^2 lx (figura 08).

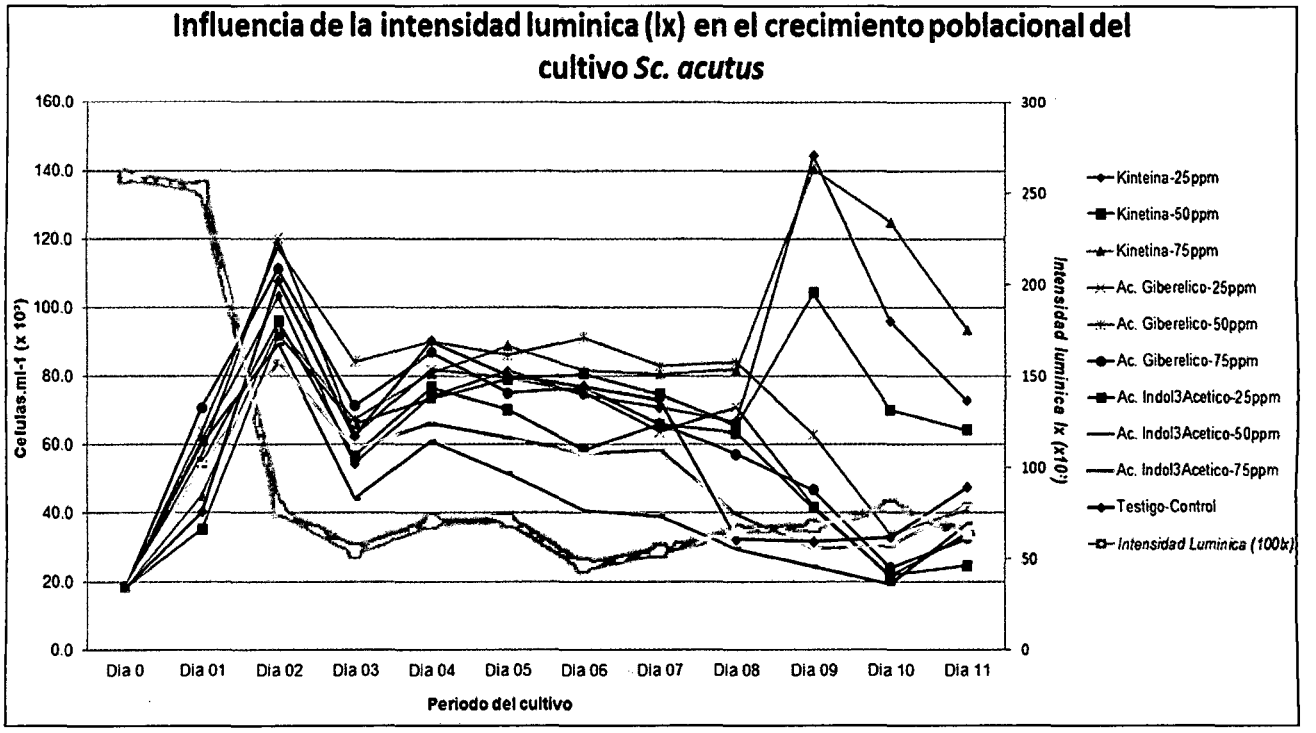


Figura 08. Influencia de la intensidad lumínica respecto al crecimiento poblacional celular de los tratamientos en estudio, durante el periodo establecido. Pucallpa, Perú, 2014.

Al mantener un fotoperíodo solar, permitió un crecimiento normal y saludable en el cultivo microalgal; Torrentera y Tacón (1989), mencionan que el crecimiento y la división celular son afectados por el fotoperíodo y la intensidad de la luz, siendo en especies de Chlorococcales la intensidad de luz necesaria de 2.000 a 4.000 lx, para obtener un crecimiento favorable; se corroboró por medio del experimento realizado que al exponer el cultivo a una mayor intensidad lumínica (presente en el día 01) se obtiene una mayor actividad fotosintética, por lo tanto, se logró un mayor crecimiento poblacional celular (figura 08).

Torrentera y Tacón (1989), mencionan que el pH sugerido para el cultivo microalgal está entre los 8,5 a 9,5, mientras que en el proceso experimental observamos un pH máximo que oscila entre los 9,2 a 9,8, un pH mínimo entre los 6,4 a 8,5 y, el pH promedio oscilo entre los 9,4 a 8,5, encontrándose entre los parámetros requeridos (tabla 05).

4.2. Determinación del crecimiento microalgal.

Puesto que $F_{calc} > P_{valué}$, se rechaza H_0 y nos indica que hay diferencia significativa (al 05%) entre los diferentes días para cada tratamiento.

Tabla 06. Presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher (p ≥ 0,05), para la determinación de x 10^3 células.ml^{-1} durante los diferentes días.

Trat.	Características	Día 01	Día 02	Día 03	Día 04	Día 05	Día 06	Día 07	Día 08	Día 09	Día 10	Día 11
01	Kinetina-25 ppm	61,5 bc	103,4 ab	54,5 ab	74,2 abc	81,6 bc	74,6 bc	70,9 bc	66,7 cd	144,4 d	96,2 b	72,8 abc
02	Kinetina-50 ppm	35,3 a	91,9 ab	65,8 bcd	73,6 abc	79,0 bc	80,7 bc	74,7 bc	65,7 bcd	94,2 bc	70,2 ab	64,3 abc
03	Kinetina-75 ppm	45,2 ab	94,3 ab	67,2 bcd	80,9 cd	88,9 c	81,6 bc	80,7 bc	82,0 cd	140,4 cd	104,1 b	93,7 c
04	Ácido giberélico-25 ppm	57,2 abc	120,2 b	62,7 bcd	81,9 cd	79,5 bc	75,1 bc	63,8 bc	71,1 cd	42,1 a	21,5 a	33,9 ab
05	Ácido giberélico-50 ppm	63,9 bc	117,7 b	84,2 d	90,1 d	86,2 c	91,4 c	83,0 c	84,0 d	62,9 ab	33,9 a	41,2 ab
06	Ácido giberélico-75 ppm	70,9 c	111,2 ab	71,3 cd	87,0 bc	75,2 bc	76,5 bc	66,0 bc	57,3 bc	46,9 ab	24,1 a	32,6 ab
07	Ácido indol-3-acético en 25 ppm	54,7 abc	96,0 ab	56,6 ab	76,7 bcd	70,1 abc	58,4 ab	65,9 bc	63,3 bcd	41,6 a	21,7 a	24,5 a
08	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	60,2 bc	89,3 ab	44,2 a	60,8 a	51,4 a	40,7 a	38,9 a	29,4 a	24,2 a	19,0 a	36,8 ab
09	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	54,3 abc	84,2 a	59,0 bc	66,2 ab	61,9 ab	57,3 ab	58,6 ab	39,7 ab	29,7 a	30,2 a	42,5 ab
TC	Testigo	40,4 ab	107,3 ab	62,5 bcd	90,3 d	80,1 bc	77,0 bc	123,3 c	32,4 ab	31,7 a	32,9 a	47,5 ab
	CV	28,25	28,30	16,93	14,81	19,00	26,11	36,73	38,02	74,01	87,97	61,64

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 *Scenedesmus acutus,* que son expresados en el conteo diario de células por mililítro durante 12 días, se realizó el análisis de varianza (tabla 11 a la tabla 21), los cuales muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, esto se corroboró con las pruebas de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), que se muestra en el tabla 05, siendo los rangos entre 70,93 x 10^3 a 35,27 x 10^3; 120,23 x 10^3 a 84,17 x 10^3; 84,17 x 10^3 a 44,17 x 10^3; 90,30 x 10^3 a 60,83 x 10^3; 88,87 x 10^3 a 51,40 x 10^3; 91,37 x 10^3 a 40,67 x 10^3; 123,263 x 10^3 a 38,93 x 10^3; 84 x 10^3 a 29,40 x 10^3; 144,37 x 10^3 a 24,23 x 10^3; 104,07 x 10^3 a 19,03 x 10^3 y 93,67 x 10^3 a 24,53 x 10^3 células por mililítro, para el total de días en estudio (del día 01 al día 11) respectivamente.

De acuerdo con los datos registrados se obtuvo lo siguiente:

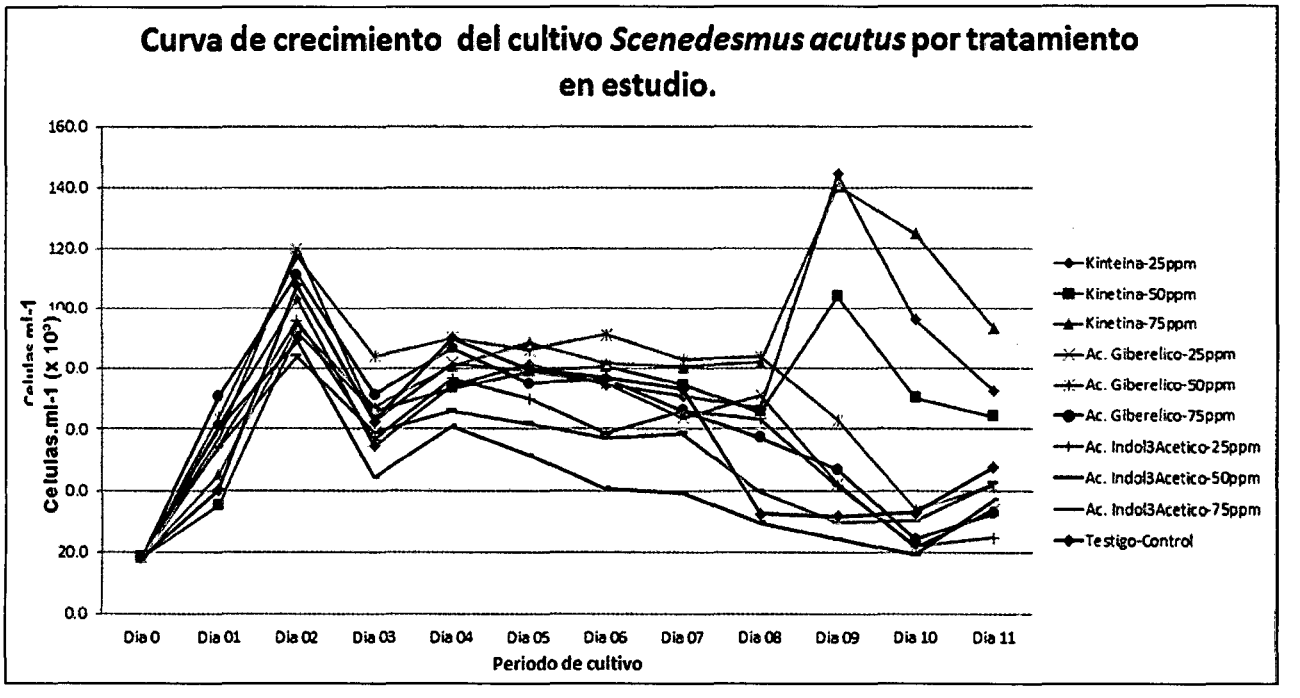


Figura 09. Crecimiento poblacional de los tratamientos en estudio en el cultivo de *Scenedesmus acutus*. Pucallpa, Perú, 2014.

En los días 01 y 02, de acuerdo con la figura 06, se muestra a todos los tratamientos en estudio, presentando un crecimiento exponencial, expresado en una curva de tenencia ascendente; la prueba de LSD Fisher ($p \geq 0,05$) nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas durante estos días. En el día 01, se registraron rangos entre 35,27 x 10^3 a 70,93 x 10^3 células por mililítro, correspondientes a los tratamientos Kinetina en 50 ppm y Ácido giberélico en 75 ppm respectivamente.

En el día 02, se registraron rangos entre 84,17 x 10^3 a 120,23 x 10^3 células por mililítro, correspondientes a los tratamientos Ácido indol-3-acético en 75 ppm y Ácido giberélico en 25 ppm respectivamente. Al respecto, Bahadur y Jotaro (1999), indican que en casi todas las combinaciones de luz y nutrientes, las algas aumentan sus densidades en los primeros días, por lo que se obtuvo un crecimiento exponencial en todos los tratamientos hasta el día 02; mientras que Cetin y Mert (2006), mencionan que las tasas de crecimiento de *Scenedesmus acutus* eran siempre altas entre los días 04 y 05.

En el día 03, se muestra un comportamiento no favorable, expresado en la curva de células por mililítro (figura 09), exhibiendo una caída que coincide con la baja intensidad lumínica y temperaturas no cálidas registradas ese día, de esta forma, permitió la disminución de la actividad fotosintética y afectando la división celular (Torrentera y Tacón, 1989). Se registraron rangos entre 44,17 x 10^3 a 84,17 x 10^3 células por mililítro, correspondiente a los tratamientos Ácido giberélico en 50 ppm y Ácido indol-3-acético en 50 ppm respectivamente,

la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para el día 03.

Durante el día 04 al 08, se observó un comportamiento inestable (figura 09), presentando rangos por día entre 60,83 x 10^3 a 90,30 x 10^3; 51,40 x 10^3 a 88,87 x 10^3; 40,67 x 10^3 a 91,37 x 10^3; 38,93 x 10^3 a 123,26 x 10^3 y 29,40 x 10^3 a 84 x 10^3 expresadas en células por mililítro, estos rangos antes mencionados corresponden a los tratamientos de Ácido indol-3-acético en 50 ppm y Testigo durante el día 04, Ácido indol-3-acético en 50 ppm y Kinetina en 75 ppm durante el día 05, Ácido indol-3-acético en 50 ppm y Ácido giberélico en 50 ppm durante los días 06, 07 y 08 respectivamente; la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$) nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en estudio para los días antes mencionados.

En el día 09, la tendencia en la curva de conteo celular se mostró de forma favorable, solo para los tratamientos con Kinetina (25, 50 y 75 ppm), registrándose rangos entre 24,23 x 10^3 a 144,37 x 10^3 células por mililítro, expreso un crecimiento exponencial, esto es posible por una de las principales funciones de Kinetina, que consiste en retardar la senescencia, logrando mantener un crecimiento celular estable y evita que el cultivo envejezca, mencionado por González, *et al.* (1999), perdurando dicho efecto por 08 días; sin embargo, a partir del día 09, se observó un mayor incremento poblacional

celular, debiéndose al reciclaje de nutrientes y a la utilización de células muertas que son aprovechadas e ingeridas por una pequeña carga bacteriana para excretar sustancias que favorecen al crecimiento microalgal, acumulándose para ser absorbidas a partir del día 09 (día en el que Kinetina ya no presenta actividad); Álvarez (1994), indica que estas bacterias son muy recurrentes en cultivos monoespecíficos. Este efecto se presentó en todos los tratamientos adicionados con Kinetina (T1, T2 y T3), el efecto fue relacionado a la concentración de fitohormonas, es decir, a mayor concentración de Kinetina mas retarda la senescencia.

Para los días 10 y 11, la curva de conteo poblacional celular muestra una tendencia no favorable, observado para todos los tratamientos (figura 09), presentando rangos entre 19,03 x 10^3 a 104,07 x 10^3 y de 24,53 x 10^3 a 93,67 x 10^3 células por mililítro para los días 10 y 11 respectivamente, correspondientes a los tratamientos Ácido indol-3-acético en 50 ppm y Kinetina en 75 ppm para el día 10 y, Ácido indol-3-acético en 25 ppm y Kinetina en 75 ppm para el día 11 respectivamente (tabla 06).

Por lo tanto, el día 09 presento el mayor número de células por mililítro durante la etapa de experimentación, siendo de 104,07 x 10^3 células por mililítro correspondiente al tratamiento Kinetina en 75 ppm, a la vez, también el día 09, presento el menor número de células por mililítro registradas durante la etapa de ejecución, siendo de 19,03 x 10^3 células por mililítro correspondiente al tratamiento Ácido indol-3-acético en 50 ppm.

Se sabe que las fitohormonas producen un efecto mitógeno sobre las células, es decir, inducen la proliferación celular. Hasta ahora este efecto solo había sido descrito en líneas celulares de vegetales superiores, sin embargo, mientras la mayor parte de tratamientos ensayados presentan un efecto mitógeno, existe un grupo (el Ácido indol-3-acético) que parece ser citotóxico; Fernández (1980) menciona que la acción de las fitohormonas en algas unicelulares son limitadas en la mayoría de los casos, por sus efectos sobre los fenómenos de crecimiento celular. Esto se corroboró en el experimento realizado para ciertos tratamientos (con Ácido indol-3-acético), obteniendo un crecimiento menor con respecto al control, en 0,8 veces menor al promedio.

Al respecto Ma *et al.,* (2003) indica que en investigaciones con diferentes especies de algas verdes, han demostrado que varían mucho en su respuesta a los productos químicos, se sabe que las fitohormonas son consideradas como productos químicos de naturaleza orgánica y, por lo tanto, se observaron respuestas favorables al crecimiento poblacional celular en el cultivo de *Scenedesmus acutus,* expuestas a medios suplementados con Kinetina y Ácido giberélico, sin embargo, resulto de forma adversa al suplementarlo con Ácido indol-3-acético, obteniendo una respuesta de inhibición o citotoxicidad, concordando con lo experimentado por Aguilera y González (1994), refiriéndose que el Ácido indol-3-acético actúa inhibiendo drásticamente la división celular de *Tetraselmis* sp.

Las fitohormonas de la categoría Auxinas (Ácido indol-3-acético) y del Ac. Abcísico son frecuentemente utilizados en la formulación de diferentes herbicidas, MA *et al.,* (2001) y Sabater *et al.,* (2002) mencionan, que las toxicidades de algunos herbicidas, expuestas a especies de fitoplancton, han demostrado presentar sensibilidad con variaciones considerables, lo cual se corroboró en el presente estudio, con el tratamiento Ácido indol-3-acético.

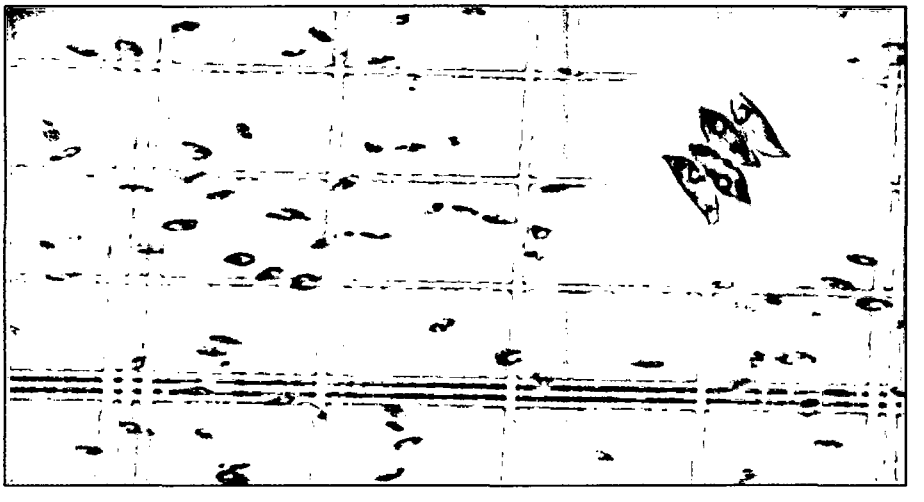


Figura 10. Muestra microalgal observado en la cámara Neubauer.

4.3. Determinación de biomasa microalgal.

Para la determinación de la biomasa microalgal de la especie *Scenedesmus acutus,* 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.

Tabla 07. Se presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), para la determinación de biomasa seca, obtenido al término de la fase de cultivo (cosecha).

Trat.	Características	Concentraciones (ppm)	Biomasa (gr/Lt)	Biomasa total por tratamiento (gr.)
09	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	75	0,12	2,30 **a**
07	Ácido Indol-3-acético en 25 ppm	25	0,14	2,77 **ab**
08	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	50	0,15	2,93 **abc**
05	Ácido giberélico en 50 ppm	50	0,16	3,23 **abc**
04	Ácido giberélico en 25 ppm	25	0,17	3,40 **bc**
06	Ácido giberélico en 75 ppm	75	0,18	3,67 **bcd**
TC	Testigo	-	0,18	3,63 **bcd**
02	Kinetina en 50 ppm	50	0,19	3,80 **cd**
01	Kinetina en 25 ppm	25	0,22	4,47 **de**
03	Kinetina en 75 ppm	75	0,25	5,03 **e**

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

Para la determinación de la biomasa microalgal seca o deshidratada de la especie *Scenedesmus acutus*, se realizó el análisis de varianza respectivo (tabla 22), donde muestra las diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, esto se corrobora con las pruebas de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), mostradas en el tabla 07, donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, siendo los rangos obtenidos entre 2,30 a 5,03 gramos por 20 litros de cultivo, correspondiente a los tratamientos Ácido indol-3-acético en 75 ppm y Kinetina en 75 ppm respectivamente.

En el tabla 08, se estima la obtención de biomasa seca cosechada en el día 02 del cultivo. Si el número de células por mililítro está en relación con la biomasa seca cosechada, entonces se estima la cantidad de biomasa seca posiblemente obtenida en el día de mayor crecimiento poblacional celular, referido al día 02.

Tabla 08. Se presenta los resultados correspondientes a la prueba de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), para la posible obtención de biomasa seca, estimado para el día 02, según el número de células por mililítro.

Cod	Tratamientos	Día 2		
		Células/ml	Biomasa (gr/L)	gr./20Lt
T9	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	84,17	0,23	4,56 a
T3	Kinetina en 75 ppm	94,27	0,25	5,06 **a**
T2	Kinetina en 50 ppm	91,93	0,27	5,43 **a**
T1	Kinetina en 25 ppm	103,43	0,32	6,35 **a**
T8	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	89,33	0,36	7,11 **ab**
TC	Testigo	107,83	0,41	8,24 **ab**
T5	Ácido Giberélico en 50 ppm	117,67	0,46	9,22 **ab**
T7	Ácido indol-3-acético en 25 ppm	96,00	0,54	10,84 **ab**
T4	Ácido Giberélico en 25 ppm	120,23	0,60	12,05 **b**
T6	Ácido Giberélico en 75 ppm	111,23	0,63	12,52 b

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

Para la posible biomasa obtenida, literalmente cosechada el día 02, se realizó el análisis de varianza respectivo (tabla 23), donde muestra las diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, esto se corrobora con las pruebas de promedios de LSD Fisher ($p \geq 0,05$), mostradas en el tabla 08, donde se observaron diferencias significativas entre los

tratamientos en estudio, siendo los rangos entre 5,32 a 11,64 gramos por 20 litros de cultivo, correspondiente a los tratamientos Kinetina en 50 ppm y Ácido giberélico en 50 ppm respectivamente.

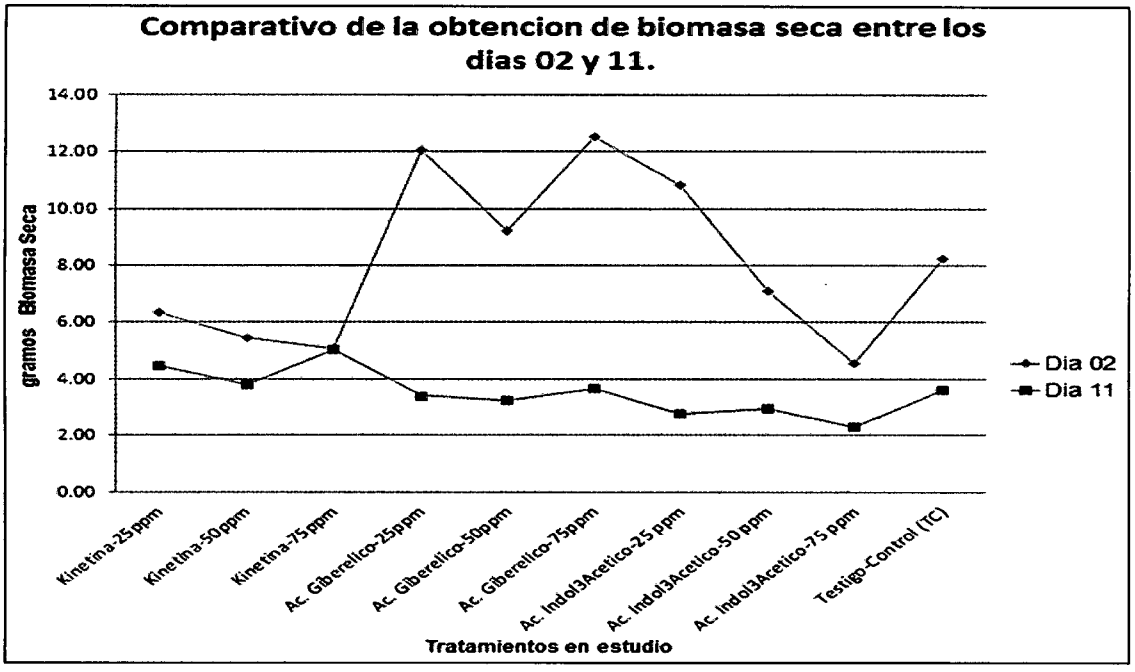


Figura 11. Obtención de biomasa microalgal seca de los tratamientos en estudio, comparando cosecha estimada en el día 02 y la cosecha realizada en el día 11. Pucallpa, Perú, 2014.

De acuerdo con lo estimado, para la obtención de biomasa seca en el día 02 y, lo obtenido realmente luego de 11 días de cultivo, se puede observar una diferencia resaltante, siendo el mayor índice obtenido por el tratamiento Ácido giberélico en 75 ppm y Ácido giberélico en 25 ppm, durante la cosecha estimada en el día 02, se obtuvo 1,52 y 1,46 veces mayor al Testigo. Los tratamientos con menor índice de biomasa seca fueron Kinetina (25, 50 y 75 ppm) además, del tratamiento Ácido indol-3-acético en 75 ppm, siendo inferior al tratamiento Testigo (figura 11).

La concentración de biomasa alcanzada en este trabajo, es mayor a la reportada por Kim *et al.,* (2007), donde se cultiva la microalga *Scenedesmus sp* en el medio KEP I y se airea constantemente para proveer un crecimiento de 0,19 gr/L, pero menor a las concentraciones reportadas por Greque y Vieira (2007), donde se obtienen 1,8 gr/L de *Scenedesmus* sp; cultivada en tres fotobiorreactores, en serie de 02 L de capacidad, a los cuales se les provee constantemente CO2.

Al respecto, Quevedo *et al.,* (2008) indica que la mayor producción de biomasa y los más altos valores de productividad obtenidos en el cultivo de *Scenedesmus acutus* fueron de 0,4 gr/L, el cual contrasta de forma negativa con el valor producido en el presente trabajo, siendo 0,25 gr/L (Kinetina en 75 ppm) luego de 11 días de cultivo, sin embargo, es superior a lo estimado para el día 02 del cultivo, obteniendo 0,63 gr/L, presentado por el tratamiento con Ácido giberélico en 75 ppm (tabla 07).

4.4. Extracción de lípidos.

Se corroboró la obtención de lípidos de la biomasa seca microalgal (*Scenedesmus acutus*), obteniendo el 11,18% de lípidos por gramos de biomasa seca, según el trabajo experimental realizado, coincidió con lo indicado por Becker (1994) y Mata *et al., (*2010), mencionando que *Scenedesmus acutus* presenta un contenido lipídico de 10 – 11% sobre la biomasa de peso seco.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

1. El tratamiento con Ácido giberélico en 25 ppm de concentración, registró 120,23 x 10^3 células por mililítro que fueron alcanzados a los dos días de cultivo, por lo que se convirtió en el tratamiento con mejores resultados durante el proceso de experimentación.

2. Se obtuvo una mayor división celular en todo los tratamientos durante los días de mayor temperatura e intensidad lumínica (días 01 y 02); resaltando con mayor tasas de crecimiento poblacional el tratamiento con Ácido giberélico en 25 ppm de concentración.

3. Para la obtención de biomasa microalgal, luego de 11 días de cultivo, se registró que el tratamiento con Kinetina en 75 ppm de concentración produjo mayor biomasa microalgal seca (0,25 gr/L) con respecto al Testigo, sin embargo, no se debe dejar de lado la cosecha estimada para el día 02, donde se obtuvo un crecimiento exponencial.

4. Se logró obtener lípidos a partir del cultivo de microalgas de la especie *Scenedesmus acutus*, con un índice de 11,18% de lípidos sobre la biomasa seca.

VI. RECOMENDACIONES

Luego de haber analizado los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda lo siguiente:

1. Realizar trabajos de tipo experimental para determinar la influencia de la temperatura e intensidad lumínica durante el cultivo de *Scenedesmus acutus.*

2. Formular proyectos de investigación que tengan como objetivo identificar y categorizar las especies de microalgas pertenecientes a nuestras cuencas amazónicas, que puedan contribuir en la búsqueda de nuevas fuentes de biocombustibles, lanzando como alternativas a las especies microalgales potenciales en el almacenamiento de almidón y carbohidratos, que son necesarios para la producción de alcohol carburante.

3. Promover la investigación y potencializar el cultivo de microalgas en la Amazonia, buscando nuevas alternativas para una producción sostenible.

4. En relación con la obtención de biomasa microalgal y obtención de lípidos, se recomienda buscar nuevas técnicas para estos procesos, ya que es decisivo al momento de definir la viabilidad económica para su producción.

5. Fomentar los trabajos de investigación en el cultivo de microalgas en conjunto con la Escuela de Agroindustrias de la Universidad Nacional, siendo necesarios para reconocer el potencial de su uso y poder viabilizar su producción industrial.

6. En relación con la calidad de aceite obtenido del cultivo de microalgas, se recomienda realizar análisis de densidad, viscosidad, índice de ácidos entre otros.

7. Realizar estudios de impacto ambiental en áreas de producción masiva de microalgas.

VII. BIBLIOGRAFIA

AGUILERA, A; GONZÁLEZ-GIL, S. 1994. Efecto biológico de las fitohormonas sobre los mecanismos de control de la proliferación de *Tetraselmis* sp (Praxinophyceae). Revista de Biología Marina. Valparaíso-Chile. Disponible en http://www.revbiolmar.cl /escaneados /291-47.pdf. (Accedido: 21/04/2013).

ALBARRACÍN, I. 2007. Microalgas: potenciales productoras de biodiésel. XV Simposio electrónico internacional-La producción de Biocombustib les con eficiencia, estabilidad y equidad. Argentina. Disponible en htt p://www.ceid.edu.ar/biblioteca/biocombustibles/isabel_albarracin_micr oalgas_potenciales_productoras.pdf. (Accedido: 10/10/2014).

ÁLVAREZ, H. 1994. Introducción al Método Ficológico. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.

ÁLVAREZ, M; GALLARDO, T. 1989. Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad Complutense, E-28040. Madrid.

ALVEAL, K; FERRARIO, M; OLIVEIRA, E; SAR, E. 1995. Manual de métodos Filológicos. Arqueología Mexicana. México. 6:38-45.

AVALOS, P. 2004. Diseño, implementación y evaluación de un fotobiorreactor tubular para el cultivo de *Isochrysis galbana*. Universidad Católica del Norte. Coquimbo-Chile.

BAHADUR, T; JOTARO, U. 1999. Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. Center for Ecological Research, Kioto University. Maryland-USA.

BARNABÉ, G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Ed. Acribia S.A. Zaragoza - España.

BARRAZA, C; COLLAO, V; ESPINOZA, C; MOYA, G; TORRES, M. 2009. Producción de biodiésel a partir de microalgas. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso- Facultad de Ingeniería-Escuela de.Ingeniería.Bioquímica.Chile. Disponible en http://www.monografias. com/biodiésel/produccion-biodiésel-microalgas.pdf. (Accedido: 20/04/2013).

BARROS, C; BUENROSTRO, M. 1999. La alimentación prehispánica en la obra de Sahún. México.

BECKER, E. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. University Press. Cambridge. Disponible en http://books.google.co.in/ books?id =KAKx4I7NWEYC. (Accedido: 10/08/2014).

BECKER, F; VENKATARAMAN, L. 1982. Biotechnology and Expl oitation of Algae-The Indian Approach. Central FoodTechnological Re search Institute. Mysore-India.

BUTTORI, D; DIRUSCIO, N. 2009. Microalgas Spirulina (Arthrospira) .Nota del Museo de la Plata. Disponible en http://nicolasdiruscio.redir ectme. net/wordpress/?page_id=152. (Accedido: 15/08/2014).

CÁCERES C; RAMÍREZ D; CHÁVEZ J. 1988. Diseño y manejo de costales y estantes para el cultivo de moluscos (ostiones). *Acuavisión* 3: 8-10.

CAÑAVATE, J. 2008. Una visión integrada sobre el cultivo de microal gas para la producción de biocombustibles. IFAPA Centro El Toruño. Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Produ cción Ecológica. Cádiz - España. Disponible en http://www.mispeces. com/rep ortajes/2009/ene/microalgas/. (Accedido: 18/04/2013).

CETIN, A; MERT, N. 2006. Growth Rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in Cultures Exposed to Trifluralin. Firat University, Science and Art Faculty, Department of Biology; 23169 Elazig-Turkey. Francia.

CHISTI, Y. 2007. Biodiésel from microalgae. Institute of Technology and E ngineering, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North-New Zealand.

COCHRANE. 1982. Condiciones edáficas y climáticas. Concepción-Chile.

CONTRERAS, C; PEÑA, J; FLORES, L; CAÑIZARES, R. 2003. Avances en el Diseño Conceptual de Fotobiorreactores para el Cultivo de Microalgas.

DI RIENZO J.A; CASANOVES F; BALZARINI M.G; GONZALEZ L; TABLADA, M; ROBLEDO, C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en http://www.infostat.com.ar. (Accedido: 18/09/2014).

FERNÁNDEZ, E. 1980. Acción de los Ácidos Indol-3-Acetico y Giberélico sobre la síntesis de paramilon en *Euglena gracilis*. Unidad De Ficología-Microbiana-y-Protozoologia.España. Disponible en http://www.revis tas.unal.edu.co/index.php/biotecnología/article/view /582/1102. (Accedido: 20/04/2013).

GONZÁLES, A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Escuela superior Politécnica del Litoral - Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil- Ecuador.

GONZÁLEZ, A; RAISMAN, J; AGUIRRE, M. 1999. Hormonas de las plantas. Disponible en http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol /aux inas.htm#Auxins (Accedido: 22/08/2014).

GREQUE, M; VIEIRA, J. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. J Biotechnol; 129: 439–445.

HAGER, A. 2003. Role of the plasma membrane H+-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspect .Journal of Plant. Research 116: 438-505.

HALL, K; ROLF, L. 1974. Los avances en los trastornos metabólicos: somatomedinas y algunos otros factores de crecimiento. Actas del Simposio Nobel Vigésimo Octavo Celebrada en Hässelby. Suecia.

HARTMANN, H; KESTER, D. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª ed. Continental, 760p México.

HEDDEN, P; KAMIYA, Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation, Annu Rey. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, pp. 431-460.

HEUSSLER, P. 1985. Aspects of sloped algae pond engineering. Arch. Hydrobiol. Beith. 20 (71-83). Ergebn. Limnol.

HURTADO, D; MERINO, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. México D. F; México.

KIM, M; PARK, J; PARK, C; KIM, S; JEUNE, K. 2007. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresource Technol; 98: 2220 – 2228.

KONONOWICZ, A; JANICK, J. 1984. The influence of carbon source on the growth and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. Physiol. Plant. 61:155-162.

LA PRIMERA, sección economía. 2012. Promoverán producción de biocombustibles en el Perú. Publicación: 24 de Octubre 2012. URL: http://www.diariolaprimeraperu.com/online/economia/promoveran-produccion-de-biocombustibles-en-el-per_123056.html. (Accedido: 27/04/2013).

LINSMAIER, E; SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant; 18, 100-127.*

MA, J; LIANG, W; XU, L; WANG, S; WEI, Y; LU, J. 2001. Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa.* Bull Environ Contam Toxicol. 66, 536, 2001. USA.

MA, J; LIN, F; WANG, S; XU, L. 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quardicauda.* Bull Environ Contam Toxicol. USA.

MATA, T; CAETANO, N; MARTINS, A. 2010. Microalgae for biodiésel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1): 217-232.

MEJÍA, E; MERINO, F; MOYA, R; HEUSSLER, P. 1985. Quality of Scenedesmus Powder Produced at Sausal (Peru) and Some Factors Affecting it. Arch. Hydrobiol. Beith. 20 (254-258). Ergebn. Limnol.

MERINO, F. 1999. Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de Scenedesmus acutus usando cultivos batch. Universidad Nacional del Santa-Nuevo Chimbote. Ancash-Perú.

MEYEN, F. 1829. Beobachtungen über einige niedere Algenformen. Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae. 14: 768-778, pl. XLIII. New York, USA.

OMS, (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2014. Comunicado de prensa: 7 millones de muertes cada año debidas a la contaminación atmosférica. Ginebra. Disponible en http://www.who.int/ media centre/news/releases/2014/air-pollution/es/ (Accedido: 10/08/2014).

PEDINI, M; CRIADO, M. 1984. Informes 1984 nacionales sobre el desarrollo de la acuicultura en América Latina. FAO Inf. Pesca, (294) Supl.1:138 p.

PIERIK, R. 1991. Cultivo in vitro de tas plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp. 71-73, 76-78, 181-182.

QUEVEDO, O; MORALES, V; ACOSTA, A. 2008. *Scenedesmus sp* growth in different culture mediums for microalgal protein production. Revista de la facultad de química farmacéutica. ISSN 0121-4004 Volumen 15 número 1. Año 2008. Universidad de Antioquia, Medellín, págs. 25-31. Colombia.

ROCA, W; SHINGE, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT Centro internacional de agricultura tropical. Cali, Colombia.

RODRÍGUEZ, M. 2012. Establecimiento de un cepario de microalgas. Primera etapa. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

RÜHL, C. 2013. La energía en 2012 Adaptarse a un mundo cambiante. BP statistical review of world. Junio. Londres. Disponible en http://www.bp.com/content/dam/bp.country/es_es/StatisticalReview2013_screen Version.pdf. (Accedido: 10/08/2014).

RUIZ, A. 2008. Remoción de Nutrientes de Agua Residuales Urbanas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en Cultivos Libres e Inmovilizados. México.

RUIZ, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia. España. Disponible en http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%20 2011.pdf?sequence=1. (Accedido: 21/04/2013).

SABATER, C; CUESTA, A; CARRASO, R. 2002. Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. Chemosphere 46, 953, 2002.

SHENG, Y; MING, T; SEOW, O; CHIH, L. 2008. Lipid accumulation and CO2 utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO2 aeration. Taiwan.

SMITH, P; ATKINS, C. 2002. Purine biosynthesis. Big in cel division, even bigger in nitrogens assimilation. Plant Physiology 128: 793-802.

TORRENTERA, L; TACÓN, A. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para América Latina y el Caribe. Food and Agriculture Organization (FAO). Brasilia-Brasil. Disponible en http://www.fao.org /docrep/field/003/AB473S/AB473S02.htm. (Accedido: 20/04/2013).

WIKIPEDIA y COLABORADORES. 2014. Biodiésel. Wikipedia, la enciclopedia libre. Código de versión de la página: 78353928. Disponible en http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Biodi%C3%A9sel&oldid=78353928. (Accedido: 25/11/2014).

YNGA, G. 2011. Cultivo masivo de microalgas en biorreactores verticales". Universidad Nacional de San Agustín - Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Arequipa-Perú.

VIII. ANEXOS

.ANÁLISIS DE DATOS - POR DÍA.

Tabla 09. Se realizó el análisis de datos por día en Microsoft Excel (2010), para obtener el coeficiente de variabilidad.

Características	*Día 0*	*Día 01*	*Día 02*	*Día 03*	*Día 04*	*Día 05*	*Día 06*	*Día 07*	*Día 08*	*Día 09*	*Día 10*	*Día 11*
Media (cel.ml-1)	18,00	54,00	104,00	62,00	78,00	75,00	71,00	73,00	59,00	66,00	45,00	49,00
Mediana (cel.ml-1)	18,30	57,15	100,75	62,15	76,15	76,90	75,85	72,55	62,00	49,65	28,70	43,75
Moda	18,30	48,00	129,00	68,00	86,50	72,70	0,00	0,00	62,00	0,00	22,30	0,00
Desviación estándar	0,00	15,39	29,32	10,46	11,58	14,33	18,62	26,66	22,50	48,71	39,93	30,20
Coeficiente de variabilidad	0,00	28,25	28,30	16,93	14,81	19,00	26,11	36,73	38,02	74,01	87,97	61,64
Curtosis	-2,15	-0,30	-0,01	0,36	-0,13	-0,05	0,01	7,64	-1,08	1,62	1,96	3,79
Coeficiente de asimetría	-1,05	0,00	0,21	0,16	-0,41	-0,53	-0,72	1,91	-0,02	1,47	1,66	1,72
Rango (cel.ml-1)	0,00	62,70	84,00	47,00	46,50	58,10	72,80	151,50	76,10	190,70	144,40	134,60
Mínimo (cel.ml-1)	18,30	27,00	59,00	41,00	50,50	41,70	28,50	26,00	18,70	18,00	11,30	17,70
Máximo (cel.ml-1)	18,30	89,70	143,00	88,00	97,00	99,80	101,30	177,50	94,80	208,70	155,70	152,30
Total de cel.ml-1	549,0	1634,0	3108,3	1854	2345,2	2261,8	2139,8	2177,3	1775	1974,4	1361,8	1469,7
Numero de tratamientos	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00

ANÁLISIS DE DATOS - POR TRATAMIENTO.

Tabla 10. Se realizó el análisis de datos por tratamientos en Microsoft Excel (2010), para obtener el coeficiente de variabilidad.

Características	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	TC
Media (cel.ml-1)	72,87	87,43	65,53	67,92	65,87	58,85	53,90	45,49	49,19	62,12
Mediana (cel.ml-1)	71, 3	81,33	67,47	77,22	69,55	63,37	56,42	40,12	48,42	55,00
Moda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desviación estándar	25,18	39,32	24,03	30,25	27,22	26,65	28,25	20,86	17,82	33,56
Coeficiente variabilidad	34,56	44,97	36,66	44,54	41,32	45,28	52,42	45,84	36,23	54,03
Curtosis	2,10	0,31	-0,45	-0,27	0,05	-0,15	0,96	1,31	-0,60	-0,88
Coeficiente de asimetría	-0,23	0,15	-0,50	-0,24	-0,09	0,14	0,68	0,86	-0,02	0,52
Rango (cel.ml-1)	104,47	143,70	78,67	103,83	98,03	92,37	98,53	75,17	61,37	104,97
Mínimo (cel.ml-1)	18,30	18,30	18,30	18,30	18,30	18,30	18,30	17,83	18,30	18,30
Máximo (cel.ml-1)	122,77	162,00	96,97	122,13	116,33	110,67	116,83	93,00	79,67	123,27
Total de cel.ml-1	874,43	1049,20	786,37	815,03	790,40	706,23	646,80	545,93	590,30	745,40
N° total días del cultivo	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00

ANÁLISIS DE VARIANZA - POR DÍA.

Tabla 11. ANVA para el conteo celular a 01 día de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 01					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	2721,36	302,4	1,4595	0,2295
*Fitohormonas	2	1254,85	627,4	3,0284	0,0710
*Concentraciones	2	109,58	54,8	0,2645	0,7703
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	1290,73	322,7	1,5575	0,2242
*TQ vs T1-T9	1	66,2	66,2	0,3195	0,5782
Error	20	4143,54	207,2		
TOTAL	29	6864,9			

C.V. = 28,25

Tabla 12. ANVA para el conteo celular a 02 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 02					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	3726,86	414,1	1,3045	0,2948
*Fitohormonas	2	2365,50	1182,8	3,7261	0,0421
*Concentraciones	2	585,69	292,8	0,9226	0,4138
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	716,17	179,0	0,5640	0,6915
*TQ vs T1-T9	1	59,5	59,5	0,1874	0,6697
Error	20	6348,54	317,4		
TOTAL	29	10075,4			

C.V. = 28,30

Tabla 13. ANVA para el conteo celular a 03 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 03					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	2110,84	234,5	4,7503	0,0018
*Fitohormonas	2	1179,9	590,0	11,9488	0,0004
*Concentraciones	2	284,72	142,4	2,8834	0,0794
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	603,59	150,9	3,0563	0,0406
*TQ vs T1-T9	1	42,63	42,6	0,8634	0,3639
Error	20	987,46	49,4		
TOTAL	29	3098,3			

C.V. = 16,93

Tabla 14. ANVA para el conteo celular a 04 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 04					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	2171,56	241,3	4,1058	0,0041
*Fitohormonas	2	1537,40	768,7	13,0805	0,0002
*Concentraciones	2	53,70	26,9	0,4569	0,6397
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	537,56	134,4	2,2868	0,0957
*TQ vs T1-T9	1	42,90	42,9	0,7300	0,4030
Error	20	1175,34	58,8		
TOTAL	29	3346,90			

C.V. = 14,81

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
BIBLIOTECA CENTRAL
U.N.U.

Tabla 15. ANVA para el conteo celular a 05 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 05					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	3521,07	391,2	3,3631	0,0114
*Fitohormonas	2	2579,82	1289,9	11,0883	0,0006
*Concentraciones	2	109,96	55,0	0,4726	0,6302
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	757,45	189,4	1,6278	0,2063
*TQ vs T1-T9	1	73,84	73,8	0,6347	0,4350
Error	20	2326,61	116,3		
TOTAL	29	5847,68			

C.V. = 19,00

Tabla 16. ANVA para el conteo celular a 06 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 06					
Fuente	*Gl*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	5911,81	656,9	3,4646	0,0099
*Fitohormonas	2	4668,63	2334,3	12,3121	0,0003
*Concentraciones	2	28,46	14,2	0,0751	0,9280
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	1140,88	285,2	1,5044	0,2387
*TQ vs T1-T9	1	73,84	73,8	0,3895	0,5396
Error	20	3791,89	189,6		
TOTAL	29	9703,7			

C.V. = 26,11

Tabla 17. ANVA para el conteo celular a 07 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 07					
Fuente	*GI*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	4232,61	470,3	1,0982	0,4070
*Fitohormonas	2	2192,10	1096,1	2,5594	0,1024
*Concentraciones	2	37,09	18,5	0,0433	0,9577
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	1938,22	484,6	1,1315	0,3700
*TQ vs T1-T9	1	65,20	65,2	0,1522	0,7005
Error	20	8565,00	428,3		
TOTAL	29	7478,20			

C.V. = 36,73

Tabla 18. ANVA para el conteo celular a 08 días de inicio del cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 08					
Fuente	*GI*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	7794,79	866,1	4,1250	0,0040
*Fitohormonas	2	4372,40	2186,2	10,4124	0,0008
*Concentraciones	2	328,07	164,0	0,7813	0,4713
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	3061,52	765,4	3,6454	0,0218
*TQ vs T1-T9	1	32,80	32,8	0,1562	0,6968
Error	20	4199,21	210,0		
TOTAL	29	11994,00			

C.V. = 38,02

Tabla 19. ANVA para el conteo celular a 09 días de inicio del cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 09					
Fuente	*GI*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	50989,37	5665,5	8,3062	0,0000456
*Fitohormonas	2	45042,51	22521,3	33,0184	0,0000005
*Concentraciones	2	1187,92	594,0	0,8708	0,4338933
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	4669,94	1167,5	1,7117	0,1869252
*TQ vs T1-T9	1	89,00	89,0	0,1305	0,7217196
Error	20	13641,63	682,1		
TOTAL	29	64631,00			

C.V. = 74,01

Tabla 20. ANVA para el conteo celular a 10 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 10					
Fuente	*GI*	*SC Ajust*	*MC Ajuste*	*Valor F*	*Valor p*
Tratamientos	9	27861,11	3095,7	3,5341	0,0090
*Fitohormonas	2	25429,76	12714,9	14,5156	0,0001
*Concentraciones	2	621,97	311,0	0,3550	0,7055
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	1724,68	431,2	0,4922	0,7415
*TQ vs T1-T9	1	84,70	84,7	0,0967	0,7590
Error	20	17518,89	875,9		
TOTAL	29	45380,00			

C.V. = 87,97

Tabla 21. ANVA para el conteo celular a 11 días de iniciado el cultivo microalgal.

Análisis de Varianza- Día 11					
Fuente	Gl	SC Ajust	MC Ajuste	Valor F	Valor p
Tratamientos	9	12499,21	1388,8	2,1439	0,0746
*Fitohormonas	2	10415,94	5208,0	8,0396	0,0027
*Concentraciones	2	742,14	371,1	0,5728	0,5729
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	1263,73	315,9	0,4877	0,7447
*TQ vs T1-T9	1	77,40	77,4	0,1195	0,7332
Error	20	12955,79	647,8		
TOTAL	29	25455,00			

C.V. = 61,64

Tabla 22. ANVA para la determinación de biomasa microalgal.

Análisis de Varianza- Biomasa Seca					
Fuente	Gl	SC Ajust	MC Ajuste	Valor F	Valor p
Tratamientos	9	17,76	2,0	6,2546	0,00032
*Fitohormonas	2	14,13	7,1	22,3930	0,00001
*Concentraciones	2	0,55	0,3	0,8716	0,43356
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	2,67	0,7	2,1157	0,11659
*TQ vs T1-T9	1	0,41	0,4	1,2995	0,26777
Error	20	6,31	0,3		
TOTAL	29	24,07			

C.V. = 16,76

Tabla 23. ANVA para la determinación posible de biomasa microalgal obtenida al día 02.

Análisis de Varianza- Biomasa Seca					
Fuente	GI	SC Ajust	MC Ajuste	Valor F	Valor p
Tratamientos	9	155,2	17,2	54,6575	0,00000
*Fitohormonas	2	144,89	72,4	229,6197	0,00000
*Concentraciones	2	4,88	2,4	7,7338	0,00325
*Fitohormonas vs Concentraciones	4	4,04	1,0	3,2013	0,03478
*TQ vs T1-T9	1	1,39	1,4	4,4057	0,04872
Error	20	174,72	8,7		
TOTAL	29	329,92			

C.V. = 16,76

Tabla 24. Costos unitarios de los diversos ingredientes del medio de cultivo HM.

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

Tabla 25. Datos registrados durante el conteo de células por unidad experimental, expresados en 10^3células.ml^{-1}, durante la fase experimental.

Trat.	Características	Rep.	Día 0	Día 01	Día 02	Día 03	Día 04	Día 05	Día 06	Día 07	Día 08	Día 09	Día 10	Día 11
01	Kinetina en 25 ppm	1	18.3	73.0	98.8	52.5	81.2	72.2	72.7	82.3	62.0	73.7	24.0	25.5
01	Kinetina en 25 ppm	2	18.3	28.0	97.3	61.2	75.5	86.7	74.0	85.3	46.0	68.3	22.3	52.7
01	Kinetina en 25 ppm	3	18.3	56.5	94.8	66.7	88.8	97.8	77.7	72.3	62.0	140.7	71.2	60.5
02	Kinetina en 50 ppm	1	18.3	48.0	139.7	71.0	84.8	77.0	83.5	74.5	89.5	57.3	24.3	28.0
02	Kinetina en 50 ppm	2	18.3	61.2	109.0	88.0	91.3	96.2	83.3	81.8	94.8	75.3	34.0	43.0
02	Kinetina en 50 ppm	3	18.3	57.8	117.7	72.0	91.0	85.0	83.7	76.0	67.8	58.7	17.7	27.3
03	Kinetina en 75 ppm	1	18.3	59.3	117.0	54.3	74.5	84.8	65.5	51.7	53.3	33.3	12.0	29.3
03	Kinetina en 75 ppm	2	18.3	71.3	101.0	78.7	97.0	89.3	101.3	88.0	89.0	63.3	33.5	49.7
03	Kinetina en 75 ppm	3	18.3	65.3	131.0	74.0	94.0	86.2	79.2	72.8	68.0	56.7	43.3	48.7
04	Ácido giberélico en 25 ppm	1	18.3	64.3	104.0	62.7	86.5	76.8	76.2	65.2	70.6	35.7	28.2	44.5
04	Ácido giberélico en 25 ppm	2	18.3	59.2	143.0	55.8	82.0	73.0	89.5	79.3	68.2	50.3	34.3	31.0
04	Ácido giberélico en 25 ppm	3	18.3	89.7	85.0	68.0	76.0	54.5	66.7	49.2	36.0	25.3	11.3	21.8
05	Ácido giberélico en 50 ppm	1	18.3	76.2	116.0	53.8	86.5	76.7	81.2	85.7	89.0	42.0	16.0	17.7
05	Ácido giberélico en 50 ppm	2	18.3	66.5	129.0	41.0	75.0	54.0	49.8	43.0	23.0	19.7	18.3	23.8
05	Ácido giberélico en 50 ppm	3	18.3	62.5	105.5	62.0	69.5	58.0	60.0	53.0	41.1	40.0	22.3	27.7
06	Ácido giberélico en 75 ppm	1	18.3	60.7	88.0	57.5	69.5	67.0	50.2	61.2	56.0	49.0	20.0	25.2
06	Ácido giberélico en 75 ppm	2	18.3	73.3	103.0	49.5	57.0	41.7	28.5	26.0	27.2	20.7	16.5	63.2
06	Ácido giberélico en 75 ppm	3	18.3	51.7	88.0	54.0	58.5	49.0	31.2	38.3	32.0	27.0	17.0	25.3
07	Ácido indol-3-acético en 25 ppm	1	18.3	27.2	84.0	58.5	74.0	66.7	43.8	50.7	45.0	33.7	29.2	30.7
07	Ácido indol-3-acético en 25 ppm	2	18.3	40.8	96.0	42.0	50.5	58.5	43.7	47.8	38.0	32.3	22.3	23.5
07	Ácido indol-3-acético en 25 ppm	3	18.3	48.7	59.0	61.0	70.5	78.7	80.8	84.5	46.0	22.0	51.4	74.5
08	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	1	18.3	43.8	129.0	55.5	87.5	80.3	66.3	87.3	42.3	40.1	38.8	55.3
08	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	2	18.3	40.0	94.0	67.0	87.5	76.0	76.5	105.0	36.3	37.0	42.3	64.7
08	Ácido indol-3-acético en 50 ppm	3	18.3	40.5	100.5	65.0	96.0	84.0	88.3	177.5	18.7	18.0	17.8	22.5
09	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	1	18.3	73.0	98.8	52.5	81.2	72.2	72.7	82.3	62.0	73.7	24.0	25.5
09	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	2	18.3	40.8	96	42	50.5	58.5	43.7	47.8	38	32.3	22.3	23.5
09	Ácido indol-3-acético en 75 ppm	3	18.3	48.7	59	61	70.5	78.7	80.8	84.5	46	22	51.4	74.5
TC	Testigo (TC)	1	18.3	43.8	129	55.5	87.5	80.3	66.3	87.3	42.3	40.1	38.8	55.3
TC	Testigo (TC)	2	18.3	40	94	67	87.5	76	76.5	105	36.3	37	42.3	64.7
TC	Testigo (TC)	3	18.3	40.5	100.5	65	96	84	88.3	177.5	18.7	18	17.8	22.5

Trat.: Tratamiento
Rep.: Repeticiones

IX. ICONOGRAFÍA

Cultivo de microalgas en invernadero

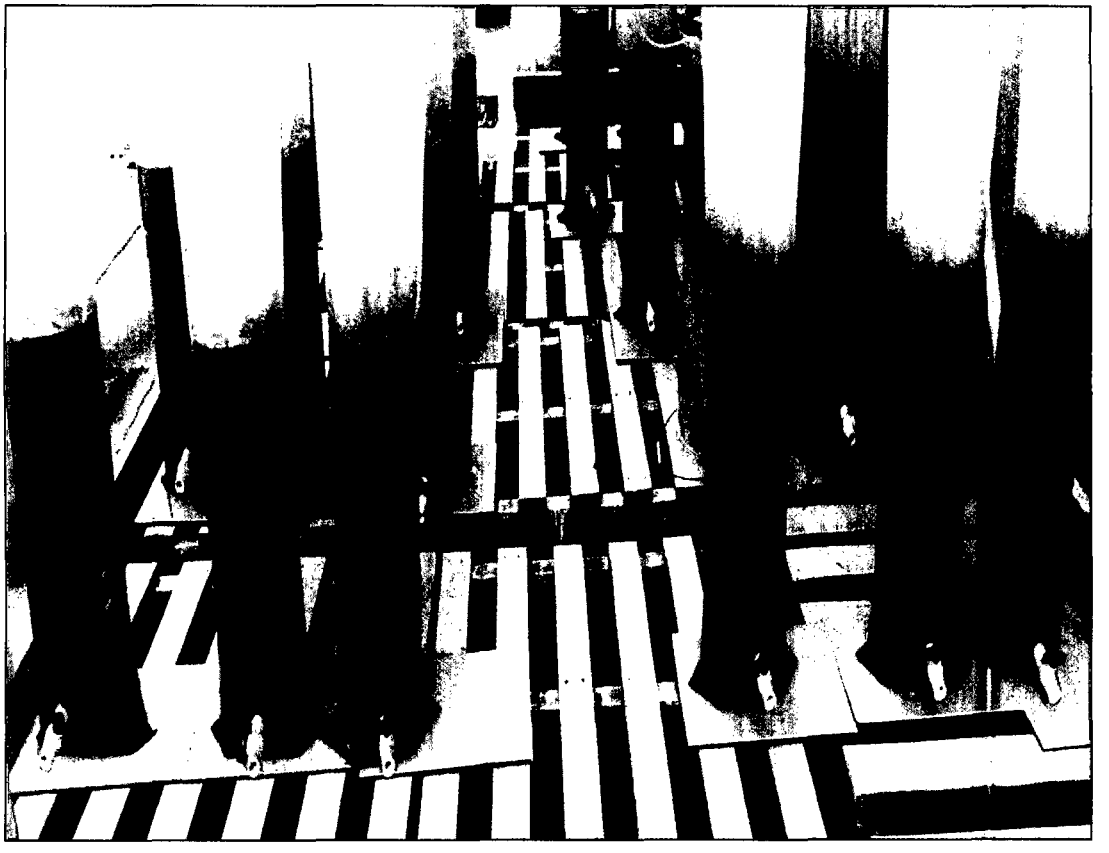


Figura 12. Cultivo de *Scenedesmus acutus,* en ambientes semicontrolados, utilizando fotobiorreactores verticales.

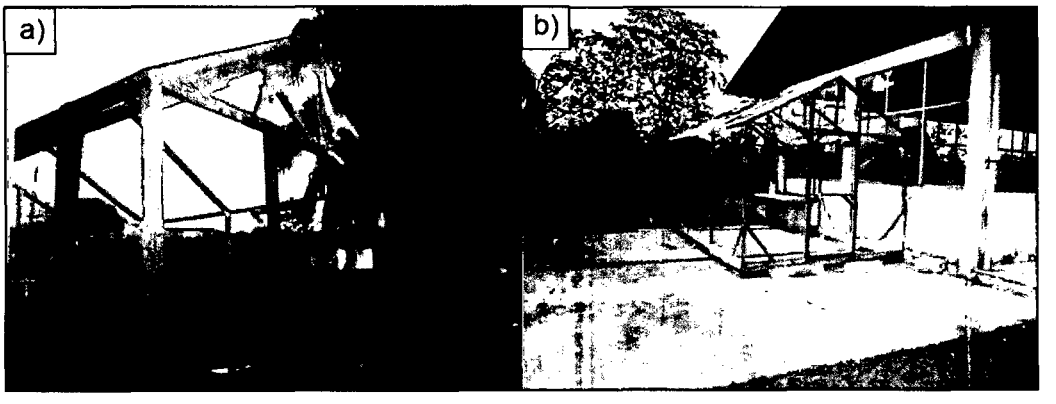


Figura 13. Construcción del invernadero, a). Forrado del invernadero, b). Invernadero terminado.

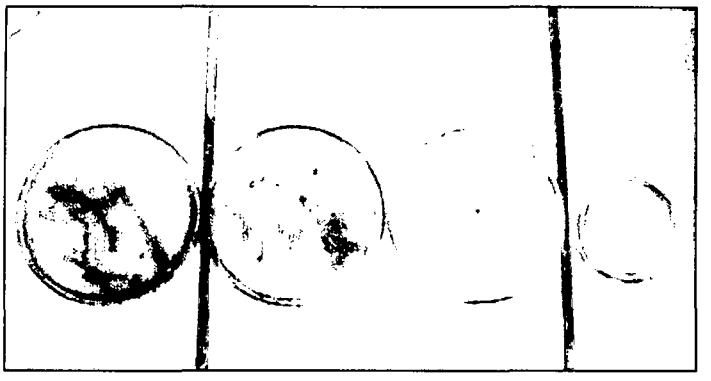


Figura 14. Cepas de *Scenedesmus acutus* conservadas en agar nutritivo (refrigerado).



Figura 15. Incubación de células en medio liquido (H2O + medio HM).

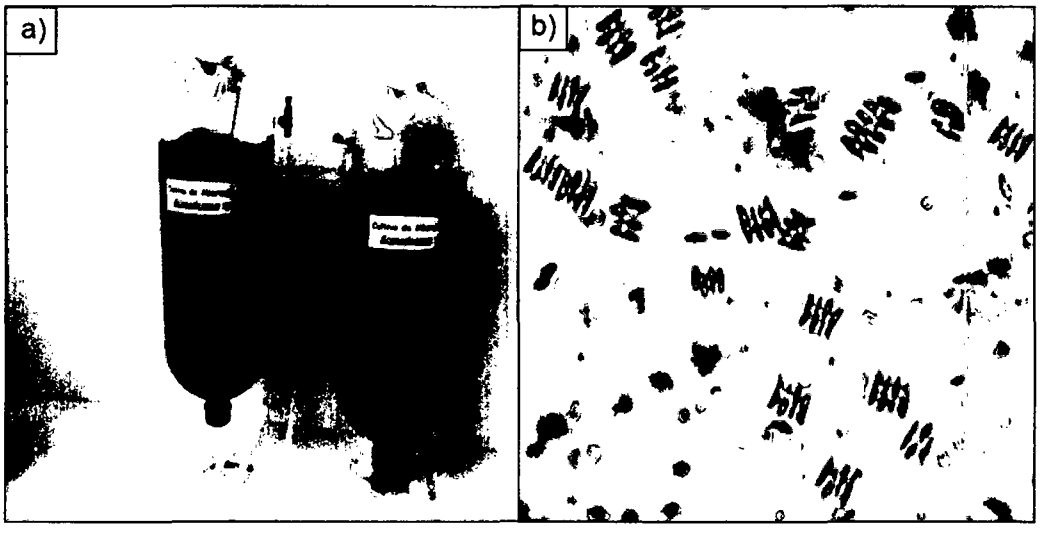


Figura 16. Cepas de *Scenedesmus acutus* en fase exponencial, a). Cultivo en fotobiorreactores, b). Células de *Scenedesmus acutus*.

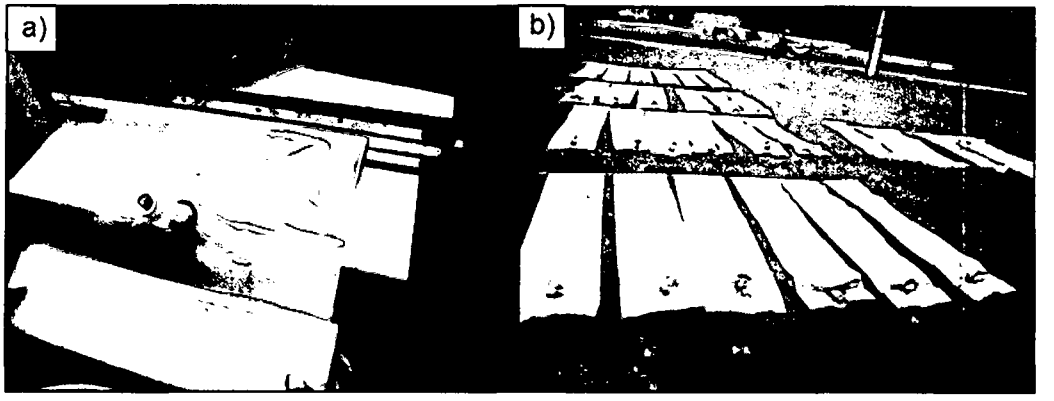


Figura 17. Fotobiorreactores, a). Elaboración y sellado de los fotobiorreactores, b). Fotobiorreactores de 2 x 0,32 m.

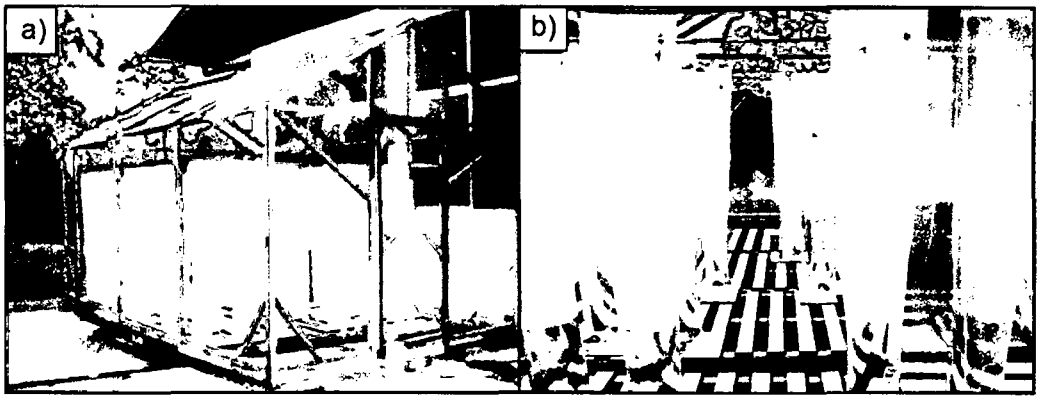


Figura 18. Periodo de prueba del invernadero y fotobiorreactores, a). Vista del invernadero con las U.E; b). Vista frontal del invernadero.

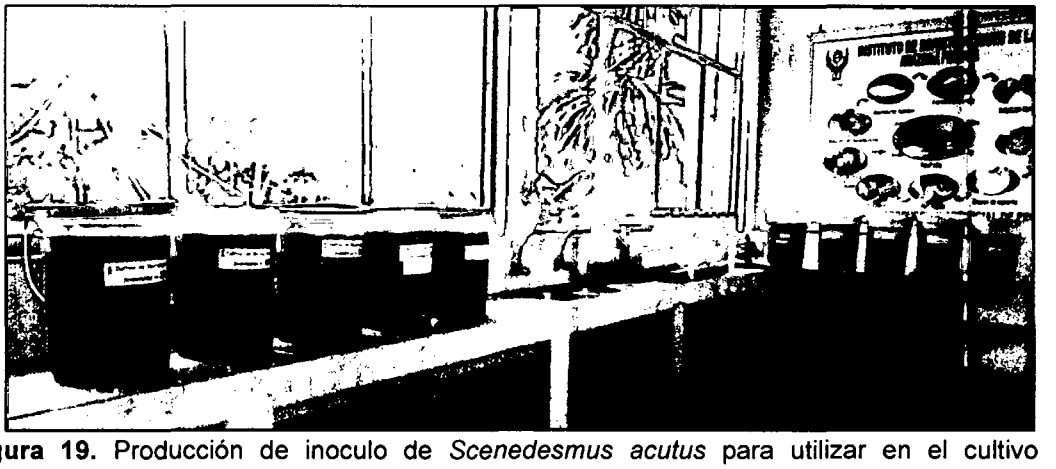


Figura 19. Producción de inoculo de *Scenedesmus acutus* para utilizar en el cultivo experimental.

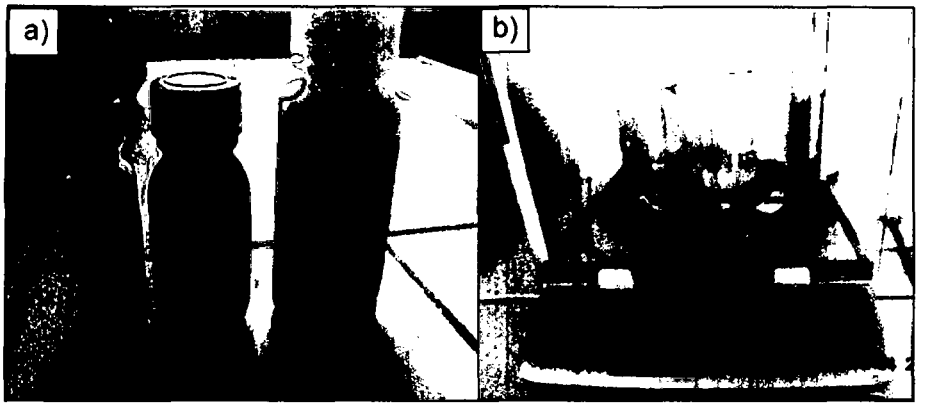


Figura 20. Las fitohormonas en estudio, a). Ácido giberélico, Kinetina y Ácido indol-3-acético, b). Pesaje para la dosificación.

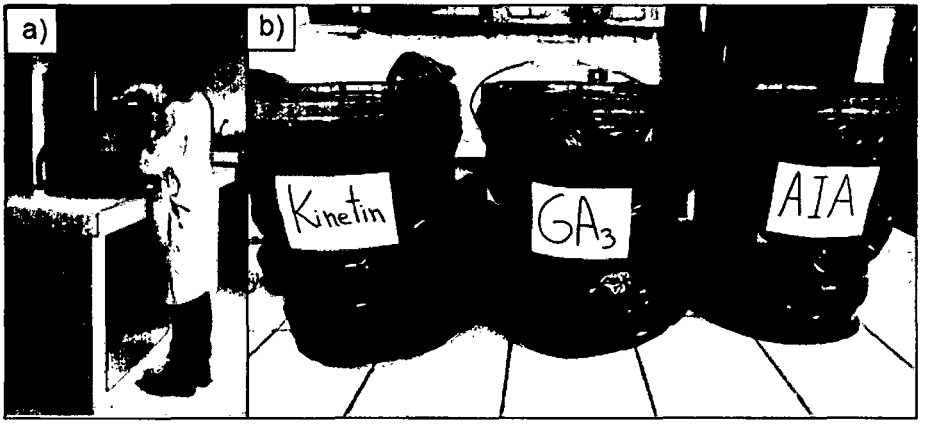


Figura 21. Activación de las fitohormonas en estudio, a).Dilución de fitohormonas en agua no clorada, b).Almacenamiento.

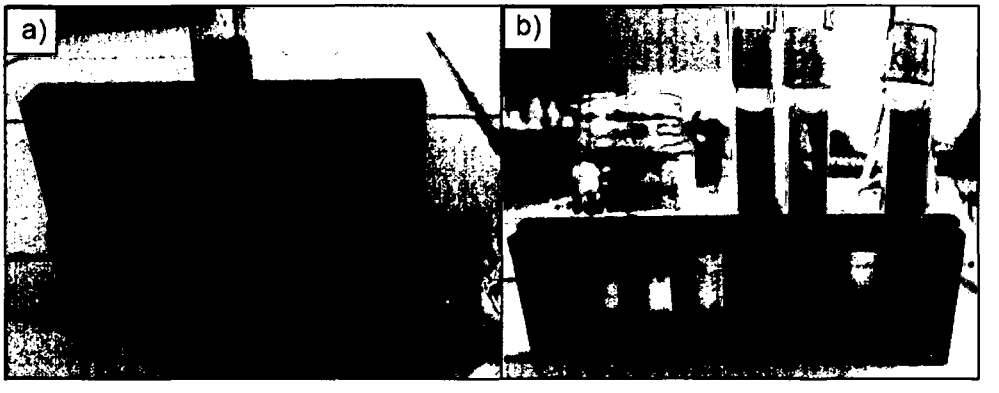


Figura 22. Análisis de calidad de agua, a). Kit de análisis de calidad de agua marca "LaMotte", b). Análisis de pH de las fitohormonas, c). Análisis de pH del agua a utilizar.

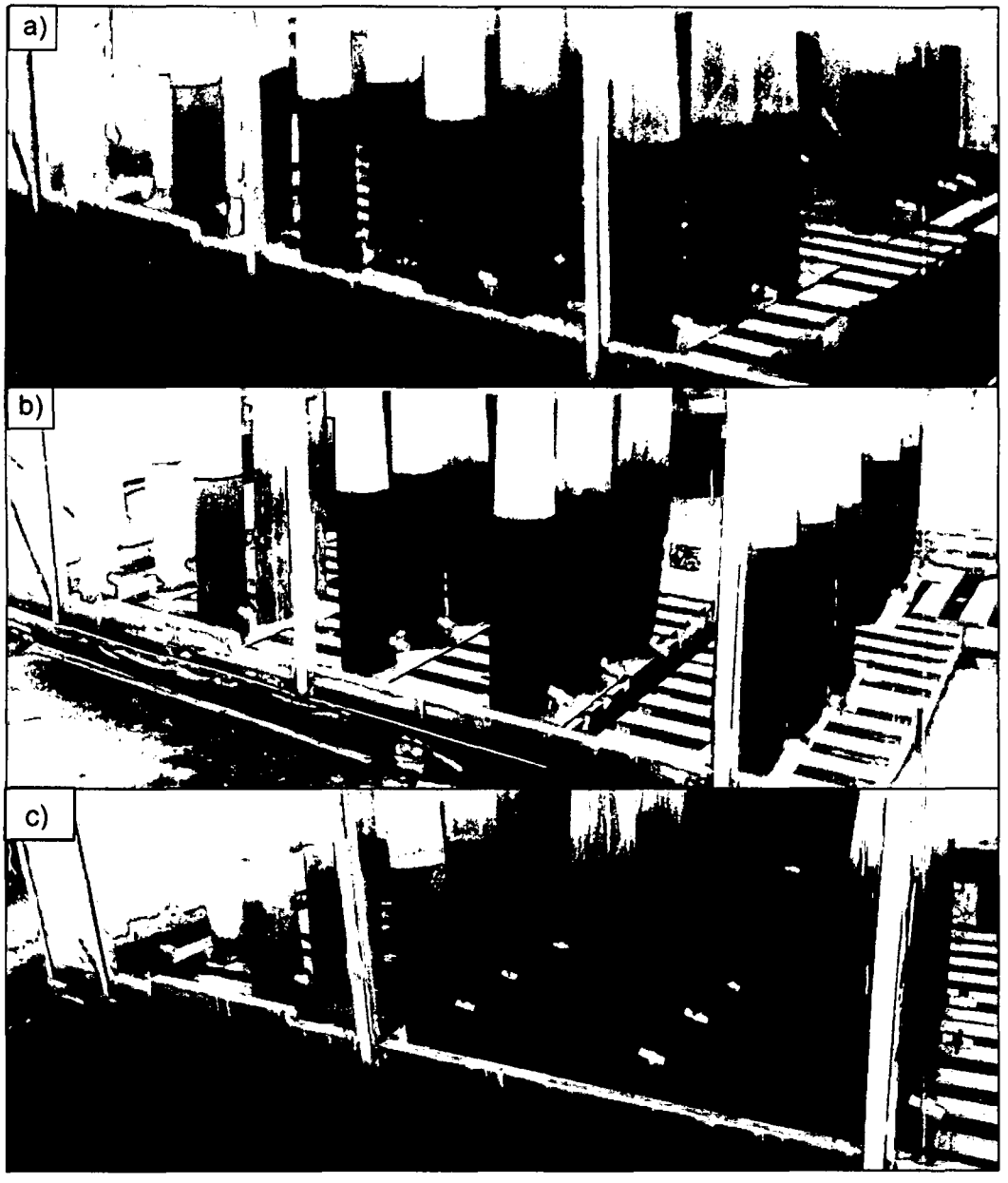


Figura 23. Cultivo *Scenedesmus acutus* durante la fase experimental, a). Día 01 del cultivo, b). Día 05 del cultivo, c). Día 10 del cultivo.

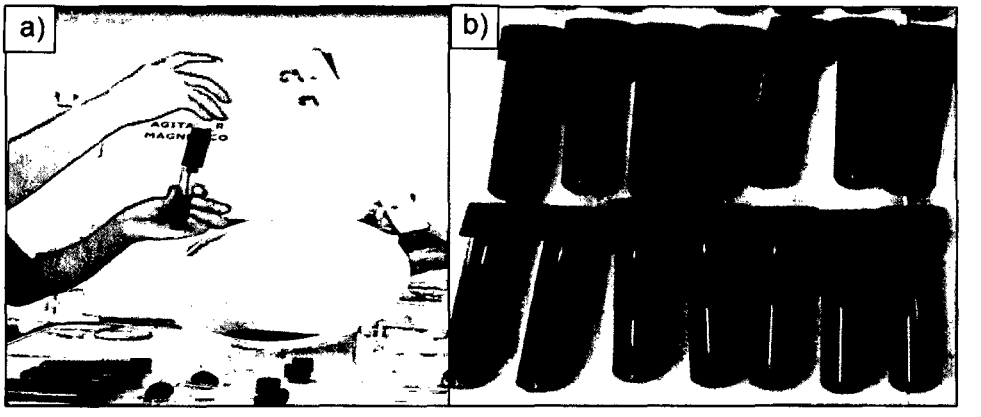


Figura 24. Preparación de Biomasa, a). Llenado en los tubos de ensayo, b). Biomasa lista para ser centrifuga.

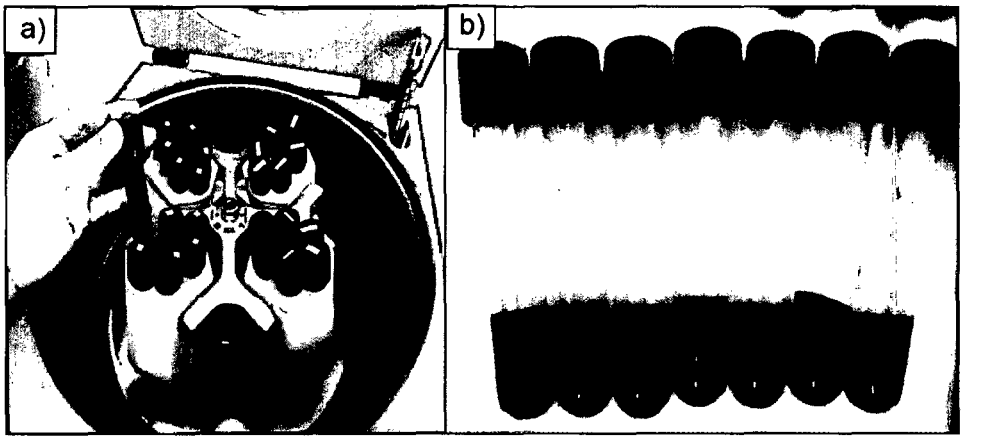


Figura 25. Proceso de centrifugación, a). Instalación de los tubos de ensayo en la centrifuga, b). Separación entre la biomasa y el exceso del medio de cultivo.

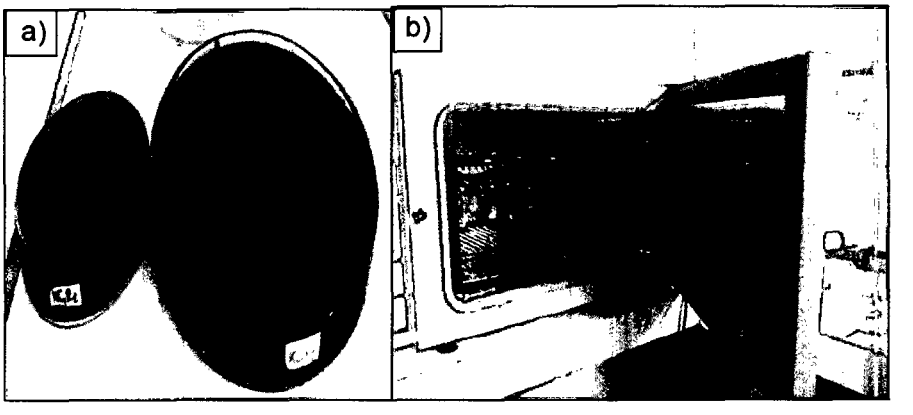


Figura 26. Obtención de biomasa, a). Biomasa húmeda luego del proceso de centrifugación, b). Estufa utilizada para obtener la biomasa seca microalgal.

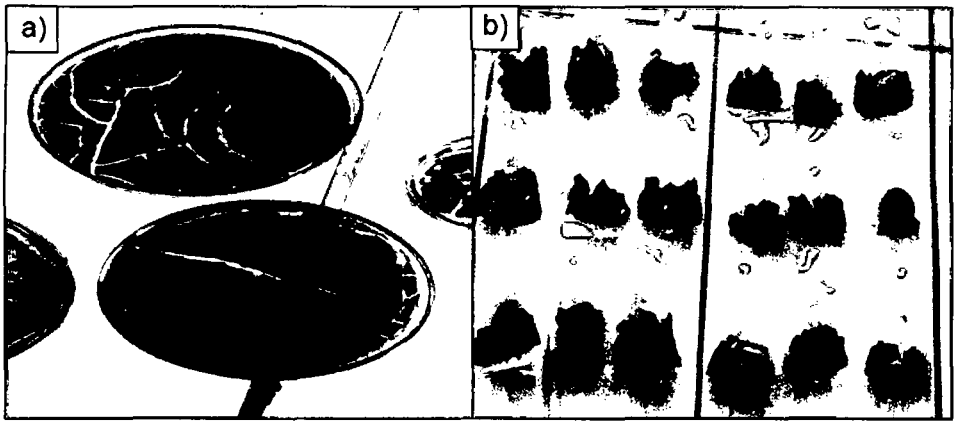


Figura 27. Biomasa seca, a). Biomasa deshidratada obtenida después del proceso de secado, b). Biomasa seca embolsada según su tratamiento.

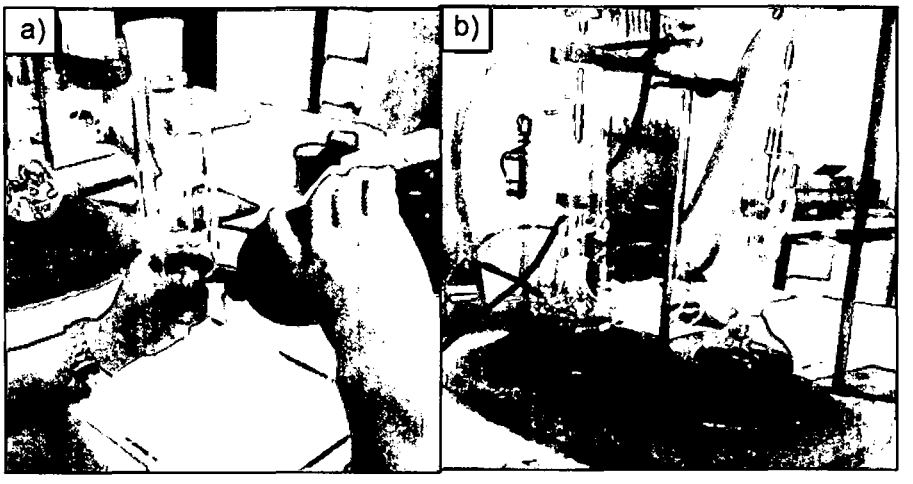
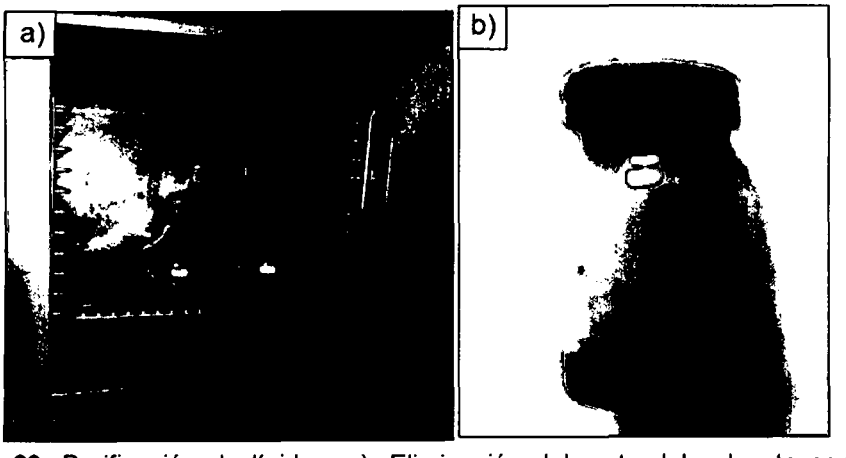


Figura 28. Funcionamiento del equipo Soxhlet. a). Éter de petróleo distribuido dentro del balón de vidrio, b). Extracción de lípidos microalgales.



DAD NACIONAL DE UCAYALI
TECA
TRAL

Figura 29. Purificación de lípidos, a). Eliminación del resto del solvente con altas temperatura, b). Lípidos microalgales logrados.