

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**



**“OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS A PARTIR DE  
*Chlorella sp.* UTILIZANDO UN FOTOBIORREACTOR (FBR) CON  
SUSTRATO NO CONVENCIONAL BASE DE ESTIÉRCOL DE VACA”**

**Tesis presentada por las bachilleres**

**CAJCHAYA CARY MARIA DEL PILAR**

**QUISPE PUMA MELISA ROMINA**

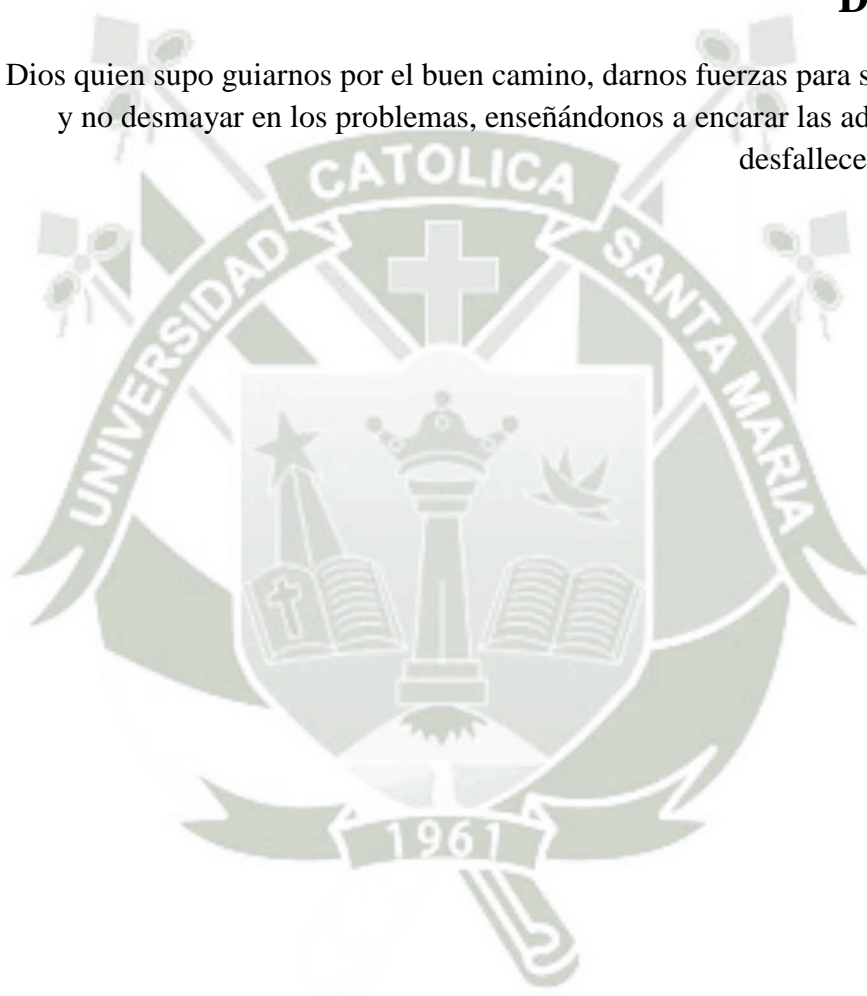
**Para optar El Título Profesional de ING. BIOTECNOLOGO**

**AREQUIPA – PERU**

**2016**

## Dedicatoria

A Dios quien supo guiarnos por el buen camino, darnos fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas, enseñándonos a encarar las adversidades sin desfallecer en el intento.



## **Agradecimiento:**

Primeramente damos gracias a Dios por permitirnos realizar esto, a nuestra familia que por ellos somos lo que somos, a nuestros padres por su apoyo, consejo, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarnos con los recursos necesarios para estudiar. Nos han dado todo lo que somos como personas, nuestros valores, nuestros principios, nuestro carácter, nuestro empeño, nuestra perseverancia y nuestro coraje para seguir nuestros sueños.

Gracias a nuestra universidad por permitirnos convertirnos en los profesionales que tanto nos apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación.

Gracias también a nuestros compañeros quienes pusieron toda su pasión y entrega para hacer de nuestra carrera cada día más fuerte, que nos apoyaron, que nos dejaron entrar en su vida y compartir momentos durante estos cinco años.

## INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I .....	13
1.1 INTRODUCCION .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	15
1.3 HIPOTESIS.....	16
CAPITULO II: MARCO TEORICO .....	17
2.1. MICROALGAS .....	17
2.1.1. Características generales de las microalgas .....	17
2.1.2. Morfología y Taxonomía de <i>Chlorella</i> .....	17
2.1.3. Composición Bioquímica.....	19
2.1.4. Reproducción .....	19
2.1.5. Cinética de crecimiento de las microalgas .....	20
2.1.6. Medios de Cultivo para Microalgas .....	20
2.1.7. Parámetros de cultivo.....	22
2.1.8. Contenido lipídico de las microalgas .....	25
2.1.10 Síntesis de Lípidos .....	26
2.1.11 Usos y aplicaciones de las microalgas .....	27
2.2. SISTEMAS DE CULTIVO .....	28
2.2.1. Sistemas Abiertos.....	28
2.2.2. Sistemas cerrados.....	28
2.3 TE DE COMPOST .....	33
2.3.1 Biodigestor .....	33
2.3.2 Características del Te de compost.....	34
2.3.3 Características de la materia prima .....	35
2.3.3 El proceso del Te de compost .....	36
2.4 LIPIDOS EN MICROALGAS .....	38
2.4.1 Ácidos Grasos Poliinsaturados.....	38
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	45
3.2 MATERIALES .....	45
3.2.1 Material Biológico .....	45
3.2.2 Material de Laboratorio .....	45

3.2.3 Medios de cultivo.....	47
3.2.4 Equipos de Laboratorio.....	47
3.3 MÉTODOS .....	47
3.3.1 Obtención de la fuente de <i>Chlorella sp.</i> .....	47
3.3.2 Aislamiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	48
3.3.3 Obtención y caracterización fisicoquímica del estiércol de vaca.....	49
3.3.4 Construcción del biodigestor. ....	51
3.3.5 Obtención y caracterización del Te de compost .....	52
3.3.6 Selección del medio de cultivo y determinación de la cinética de crecimiento de biomasa .....	53
3.3.7 Masificación de la cepa <i>Chlorella sp.</i> .....	55
3.3.8 Diseño y construcción del fotobiorreactor .....	55
3.3.9 Cultivo en un Sistema cerrado – fotobiorreactor tubular .....	57
3.3.10 Cosecha de las microalgas .....	58
B. Secado de las microalgas .....	58
3.3.11 Extracción de aceites.....	58
3.3.12 Análisis de aceites.....	59
3.4 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	61
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION .....	62
4.1 Obtención y aislamiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	62
4.2 Caracterización del estiércol de vaca .....	64
4.2.1 Calidad del estiércol de vaca.....	64
4.2.2 Caracterización fisicoquímica del estiércol de vaca .....	64
4.3 Construcción del biodigestor y análisis del Te de compost .....	65
4.3.1 Construcción del biodigestor .....	65
4.3.2 Monitoreo de la temperatura del biodigestor .....	66
4.3.3 Análisis de sales de interés del Te de Compost .....	67
4.4 Cultivos de microalgas.....	69
4.4.1 Selección del medio de cultivo y cinética de crecimiento .....	69
4.4.2 Masificación de la cepa y cinética de crecimiento.....	74
4.4.5 Diseño y construcción del Fotobiorreactor .....	76
4.4.6 Cultivo en el fotobiorreactor .....	77
4.5 Aceite a partir de microalgas .....	79

4.5.1 Cosecha de microalgas.....	79
4.5.2 Extracción de aceites.....	80
4.5.3 Análisis del aceite .....	81
CONCLUSIONES .....	90
RECOMENDACIONES.....	91
BIBLIOGRAFIA .....	92



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación Taxonómica de <i>Chlorella</i> .....	18
Tabla 2 Composición bioquímica de Microalgas.....	19
Tabla 3 Parámetros de Diseño del Fotobiorreactor.....	56
Tabla 4 Condiciones óptimas de Diseño.....	57
Tabla 5 Valores en porcentaje de características fisicoquímicas del estiércol de vaca.....	65
Tabla 6 Temperatura promedio diaria del biodigestor.....	66
Tabla 7 Concentración de sales del Te de Compost .....	68
Tabla 8 Concentración de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en medio de cultivo a base de Te de Compost – 10ml .....	69
Tabla 9 Velocidad de Crecimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en medio de cultivo a base de Te de Compost – 10ml .....	71
Tabla 10 Concentración de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en Medio de cultivo Hidropónico. ....	72
Tabla 11 Concentración y velocidad de crecimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i> .....	73
Tabla 12 Concentración de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en Medio de cultivo a base de Te de Compost – 240ml.....	74
Tabla 13 Velocidad de Crecimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en Medio de cultivo a base de Te de Compost – 240ml.....	76
Tabla 14 Densidad poblacional y velocidad de Crecimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i> en Medio de cultivo a base de Te de Compost en el Fotobiorreactor.....	78
Tabla 15 Cuadro de comparación de la <i>Chlorella sp.</i> con otras fuentes lipídicas .....	81
Tabla 17 Perfil de Ácidos grasos saturados presentes en aceite de microalgas .....	84
Tabla 18 Perfil Ácidos grasos monoinsaturados presentes .....	85
Tabla 19 Concentración de ácido nervónico de diferentes fuentes.....	85
Tabla 20 Perfil de Ácidos grasos poliinsaturados en aceite de <i>Chlorella sp.</i> .....	86
Tabla 21 Porcentaje de ácido graso obtenido del aceite de <i>Chlorella sp.</i> .....	87
Tabla 22 Porcentaje de ácidos grasos en aceites.....	87
Tabla 23 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados – ácido linoleico y ácido $\alpha$ linolénico (ALA) en diferentes tipos de aceites.....	88

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Chlorella sp.</i> .....	18
Figura 2 Esquema de la síntesis de lípidos en microalgas (Fernández et al. 2012) .....	27
Figura 3 Variedad de microorganismos presentes en el Te de compost .....	35
Figura 4 Evolución de la temperatura y el pH durante el proceso de maduración en el biodigestor.....	37
Figura 5 Sistema Soxhlet .....	42
Figura 6 Esquema de Cromatografía de gases .....	44
Figura 7 Laguna de oxidación de La Joya – Sector Rio Seco.....	62
Figura 8 Batería “B” de diluciones seriadas .....	63
Figura 9 Microalgas aisladas: (a) <i>Chlorella sp.</i> (b) <i>Scenedesmus sp.</i> .....	63
Figura 10 Material utilizado para el biodigestor.....	65
Figura 11 Biodigestor aeróbico construido, vista exterior. ....	66
Figura 12 Temperatura promedio diaria del biodigestor.....	67
Figura 13 Filtración del Te de Compost .....	67
Figura 14 Curvas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> a diferentes concentraciones de medio Te de Compost – 10ml .....	70
Figura 15 Curvas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> a diferentes concentraciones de medio Hidropónico .....	73
Figura 16 Adaptación y masificación en un volumen de 240ml a los 3 días.....	74
Figura 17 Curvas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> a diferentes concentraciones de medio Te de Compost – 240ml .....	75
Figura 18 Construcción del fotobiorreactor. ....	77
Figura 19 Sistema completo del fotobiorreactor.....	77
Figura 20 Curva de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> en medio Te de Compost en un Fotobiorreactor.....	78
Figura 21 Cosecha de microalgas por gravedad .....	80
Figura 22 Biomasa fresca de <i>Chlorella sp.</i> .....	80
Figura 23 Aceite crudo obtenido a partir de microalgas .....	81
Figura 24 Cromatograma del Perfil de Ácidos Grasos .....	83
Figura 25 Perfil de ácidos grasos poliinsaturados.....	88
Figura 26 Obtención de la fuente para <i>Chlorella sp.</i> .....	98
Figura 27 Obtención del Estiércol de vaca .....	98
Figura 28 Determinación de humedad del estiércol de vaca.....	98
Figura 29 Determinación de ceniza de estiércol de vaca .....	99
Figura 30 Determinación del contenido de materia orgánica, titulación de la muestra .....	99
Figura 31 Determinación del contenido de materia orgánica, muestra y blanco .....	99
Figura 32 Filtración del Te de Compost en el biodigestor.....	100
Figura 33 Adaptación y masificación en un volumen de 240 ml.....	100
Figura 34 Fotobiorreactor (FBR) tubular de 5L a los 2 días, en periodo de oscuridad.....	101
Figura 35 Fotobiorreactor (FBR) tubular de 5L a los 4 días, en periodo de luz.....	101
Figura 36 Biomasa seca de <i>Chlorella sp.</i> .....	102

Figura 37	Peso de Biomasa seca de <i>Chlorella</i> sp.....	102
Figura 38	Extracción de aceite por soxhlet.....	103
Figura 39	Aceite de <i>Chlorella</i> sp. contenido en Hexano.....	103
Figura 40	Soluciones de titulación para el Índice de Yodo .....	104
Figura 41	Muestra de la Titulación.....	104
Figura 42	Cromatografo de gases FID.....	105





## RESUMEN

El presente trabajo es un estudio acerca del cultivo masivo de *Chlorella sp.* en un fotobiorreactor tubular usando un medio no convencional, como es el Te de compost, producido en un biodigestor aerobio con el propósito de obtener aceites y por lo tanto ácidos grasos saturados y/o insaturados.

Se utilizaron diferentes métodos para la experimentación, donde primeramente se obtuvo el Te de compost a partir de la digestión aerobia por microorganismos del estiércol de vaca. En esta etapa se realizó el análisis fisicoquímico del estiércol de vaca tales como análisis de humedad, cenizas y materia orgánica. En el biodigestor se evaluó la temperatura, la cual se encontró sujeta a la temperatura ambiente, una vez obtenido el Te de compost se le realizó un análisis químico para conocer la concentración de sales presentes en el medio requeridas para el crecimiento de *Chlorella sp.* En una segunda etapa, se procedió a evaluar la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 15% con el medio Te de compost, comparando la velocidad con un medio convencional (Medio Hidropónico). Se procedió a realizar una masificación y adaptación de la

cepa con el medio Te de compost a concentraciones de 100%, 75% y 50% donde se volvió a evaluar su cinética de crecimiento para confirmar la mejor velocidad de crecimiento, por último se pasó a un fotobiorreactor con medio Té de compost al 75%.

Del fotobiorreactor se procedió a cosechar las microalgas por gravedad, la biomasa obtenida se secó artificialmente, obteniéndose 1,77gr. Peso seco, de donde se extrajo el aceite por métodos de extracción solido-liquido un volumen de 0,46ml obteniéndose un rendimiento de 22,03% a partir de biomasa seca. Al aceite obtenido se le realizó un análisis fisicoquímico como densidad e índice de yodo. Finalmente se le realizo un perfil de ácidos grasos (análisis cuantitativo y cualitativo) al aceite obtenido de *Chlorella sp.* Donde los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en un 42% con respecto a todo el aceite extraído.

En conclusión, el medio de Te de compost puede ser utilizado como un medio alternativo sostenible y económico para el cultivo de microalgas y la obtención de aceites como una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados.

**Palabras clave:** *Biodigestor, Te de Compost, Chlorella sp., Fotobiorreactor, velocidad de crecimiento, aceites, ácidos grasos poliinsaturados.*

## ABSTRACT

The present work is a study about the mass cultivation of *Chlorella sp.* in a photobioreactor tubular using a non-conventional, as is the compost Tea, produced in a biodigester, aerobic with the purpose of obtaining oils and therefore fatty acids, saturated and unsaturated. We used different methods for experimentation, where he first got the compost Tea after the aerobic digestion by microorganisms in the cow dung. In this stage, we performed the analysis of physico-chemical of the manure of the cow such as the analysis of moisture, ash and organic matter. In the biodigester, it was assessed the temperature, which was found to be subject to the temperature environment, once the compost Tea performed a chemical analysis to determine the concentration of salts present in the medium required for the growth of *Chlorella sp.* In a second stage, we proceeded to evaluate the kinetics of growth of *Chlorella sp.* to different concentrations of 100%, 75%, 50%, 25% and 15% with the middle compost Tea, comparing the speed with a conventional means (Hydroponic Medium). It proceeded to conduct a mass and adaptation of the strain with the medium You compost at concentrations of 100%, 75% and 50% where it came back to evaluate their growth kinetics to confirm the better growth rate, finally was passed to a photobioreactor with half compost Tea to 75%. The photobioreactor proceeded to harvest the microalgae by gravity, the biomass obtained was dried artificially, obtaining 1,77 g dry Weight, from which it is extracted the oil by extraction methods solid-liquid a volume of 0.46 ml resulting in a yield of 22,03% from dry biomass. The oil obtained was performed an analysis physico-chemical as density and index of iodine. Finally, we do a fatty acid profile (qualitative and quantitative analysis) to the oil obtained from *Chlorella sp.* Where polyunsaturated fatty acids are found in 42% with respect to all the extracted oil. In conclusion, the middle of compost Tea can used as an alternative means of sustainable and economic for the cultivation of microalgae and obtaining of oils as a good source of polyunsaturated fatty acids.

**Key words:** *biodigester, tea of Compost, Chlorella sp., photobioreactor, speed of growth, oils, fatty acids.*

## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCION

En la actualidad el manejo de los recursos naturales es la llave principal de la sostenibilidad económica y ambiental, esto ha generado la búsqueda de nuevas tecnologías para producir un impacto positivo tanto para el medio ambiente como en la economía de la sociedad. (Palomino, 2010).

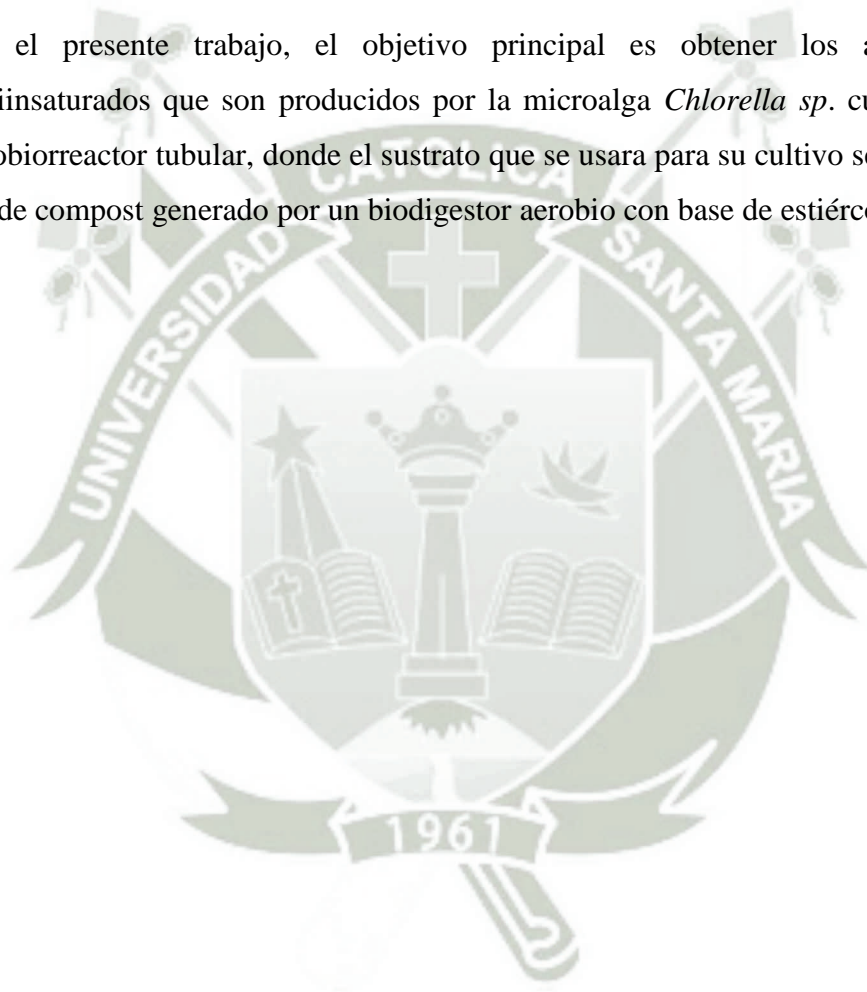
Las microalgas son un grupo de organismos unicelulares, considerados como uno de los grupos más versátiles en términos de su tamaño, forma y función ecológica. Poseen un gran potencial como fuente de varios productos químicos de indiscutible importancia económica. (Albarracín, 2007). Las microalgas vienen a ser una alternativa a las problemáticas que se han generado, tanto por el cultivo y uso de aceites comestibles para la producción de los biocombustible; como a la disminución de los gases invernaderos mitigando las emisiones de CO<sub>2</sub>. Teniéndola como una seria posibilidad para poder aliviar en cierta medida el impacto ambiental causado por la contaminación provocada por el hombre. (Alvear et al., 2011)

La producción de biocombustibles a partir de aceites vegetales, viene presentando dificultades debido principalmente a que es necesario el uso de enormes extensiones de tierra fértil, lo que nos lleva a una crisis alimentaria. Las microalgas se presentan como la materia prima alternativa debido a sus ventajas tales como el área de producción es mínima, presentan un alto rendimiento lipídico, no dependen las condiciones climáticas, periodo de producción corto.

Las diversas investigaciones en biotecnología de microalgas principalmente conducen a la obtención de cepas con alto contenido lipídico y el desarrollo de métodos de extracción y purificación de estos a escala industrial. (García et al, 1993). Para la obtención de estos productos es necesario contar con las condiciones necesarias, un equipamiento (Fotobiorreactor), con un microambiente adecuado para así poder generar las cantidades importantes de biomasa, donde sea posible extraer su máximo de aceites en especial de ácidos grasos.

Actualmente se vienen realizando estudios para poder evaluar distintos métodos de extracción de estos aceites, debido a la importancia que presenta esta etapa. Los métodos de extracción están orientados a alcanzar el mayor rendimiento de aceite. Sin embargo; el costo que implica esta etapa en la obtención de los aceites, es sin duda mayor que en las otras etapas. (Salazar, 2012). En las investigaciones que se vienen realizando, se está optimizando los métodos de los distintos pasos desde la recolección del alga hasta el proceso de obtención de las mismas y la posterior extracción de ácidos grasos.

En el presente trabajo, el objetivo principal es obtener los ácidos grasos poliinsaturados que son producidos por la microalga *Chlorella sp.* cultivada en un fotobiorreactor tubular, donde el sustrato que se usara para su cultivo será a partir del Te de compost generado por un biodigestor aerobio con base de estiércol de vaca.



## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener ácidos grasos poliinsaturados a partir de *Chlorella sp.* utilizando un fotobiorreactor en sustrato no convencional en base estiércol de vaca.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar una cepa *Chlorella sp.* nativa de la región Arequipa.
2. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el estiércol
3. Construir un biodigestor aeróbico en base a estiércol de deshecho de granjas lecheras y analizar el Te de compost para ser utilizado como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas.
4. Evaluar la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de medio Te de compost y seleccionar la concentración adecuada de medio.
5. Masificar y adaptar las cepa *Chlorella sp.* al medio de cultivo seleccionado.
6. Diseñar y construir un fotobiorreactor tubular horizontal para la producción de aceites esenciales.
7. Caracterizar los ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de *Chlorella sp.*

### 1.3 HIPOTESIS

Dado que el estiércol es un recurso orgánico abundante de desecho, proveniente del ganado vacuno lechero en la región Arequipa y que por biodigestión aerobia produce el Te de compost.

Es probable que pueda ser utilizado como medio no convencional para el cultivo masivo de microalgas como la *Chlorella sp.* para la producción de aceites conformando una fuente de ácidos grasos poliinsaturados.



## CAPITULO II: MARCO TEORICO

### 2.1. MICROALGAS

#### 2.1.1. Características generales de las microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo. Su biodiversidad es enorme, se han estudiado cerca de 30000 especies, siendo las algas verdes y las diatomeas las más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas. (Garibay et al, 2009).

El mecanismo de fotosíntesis en las microalgas es generalmente más eficiente al convertir la energía solar debido a su estructura celular simple. Además, logran asimilar el CO<sub>2</sub> del ambiente debido a que crecen en suspensión acuosa, teniendo disponibilidad de nutrientes, rayos solares, un amplio rango de temperaturas y pH, favoreciendo la producción de O<sub>2</sub> sumado a la acumulación de líquidos de alta densidad como forma de energía (aceites). (Alvear et al, 2011; Dragone et al, 2010).

El crecimiento fotosintético requiere de luz, dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas. La temperatura debe permanecer alrededor de los 20°C – 30°C. El medio de crecimiento debe aportar los elementos inorgánicos que constituyen la célula. Los elementos esenciales incluyen el nitrógeno (N), fósforo (P), hierro y en algunos casos silicio. El mínimo de requerimientos nutricionales puede ser estimado usando la fórmula molecular de la biomasa microalgal, que es CO<sub>0.48</sub>H<sub>1.83</sub>N<sub>0.11</sub>P<sub>0.01</sub> mencionada por Grobbelaar (2004). (Chisti, 2007).

#### 2.1.2. Morfología y Taxonomía de *Chlorella*

La *Chlorella* forma parte del género de algas verdes unicelulares de agua dulce del filo *Chlorophyta* de las cuales existen 30 especies según clasificación botánica. Poseen una forma esférica con un tamaño aproximado de 2-10 µm de diámetro y se encuentran en lagos y pantanos por todo el mundo formando aproximadamente el 90% del plancton de agua dulce. (Alvear et al, 2011; Moronta et al, 2006).

Reino: <i>Protista</i>
División: <i>Chlorophyta</i>
Clase: <i>Chlorophyceae</i>
Orden: <i>Chlorococcales</i>
Familia: <i>Oocystaceae</i>
Género: <i>Chlorella</i>

**Tabla 1 Clasificación Taxonómica de *Chlorella***

**Fuente: López S. & Barrientos R. 2007**

El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y el latín *ella*, que significa cosa pequeña. Su color es un verde fuerte gracias a su elevado contenido de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis se multiplica rápidamente requiriendo solo CO<sub>2</sub>, agua, luz solar y minerales. (Alvear et al, 2011).

Las células son esféricas, ovoides o elipsoides, solitarias o agrupadas. El protoplasto consta de un cloroplasto en forma de copa que puede contener o no un pirenoide, y de un citoplasma central incoloro, en el cual está inmerso el núcleo diminuto. (González 2010, Se, 1998).



**Figura 1 *Chlorella* sp.**

**Fuente: Culture Collection of Autotrophic Organisms**

### 2.1.3. Composición Bioquímica

Becker y colaboradores realizaron estudios sobre la composición bioquímica y las características del perfil aminoácido de esta microalga cultivada en régimen autotrófico y evaluaron la calidad de la proteína mediante métodos químicos. (Becker, 1994).

**Tabla 2 Composición bioquímica de Microalgas**

Componentes	Porcentaje
Perdidas por desecación	7 – 8
Nitrógeno total	6 – 7
Proteína bruta	51 – 58
Carbohidratos	12 – 17
Fibra cruda	8 – 10
Lípidos	14 – 22
Cenizas	8 – 9
Ácidos nucleicos totales	4 – 5

Fuente: Becker, 1994

### 2.1.4. Reproducción

La *Chlorella* se multiplica continuamente según un proceso de división celular en que cada célula se divide 1:4, hasta conducir a una proliferación multitudinaria. En esta especie todas las células son parecidas y capaces de dividirse por bipartición o transformarse en esporocistes o gametocistes y dar esporas o gametos. (Alvear et al, 2011).

Esto se debe a que sus células esféricas aisladas contienen un plasto parcial voluminoso provisto de un pirenoide. Cuando estas células alcanzan su tamaño máximo, el núcleo se divide en 4 o en 8 y se forman en el interior de la célula madre 4 a 8 células más pequeñas, idéntica a ella; son las autosporas, liberadas por dehiscencia (apertura natural o espontánea) de la pared de la célula madre, transformándose directamente en nuevas *Chlorella* al crecer. (Maldonado, 2014; Alvear et al, 2011; Des Abbayes, 1989).

### 2.1.5. Cinética de crecimiento de las microalgas

Las fases de crecimiento se definen por el número de células presentes a un tiempo determinado y por las condiciones de cultivo. (Gómez, 2012; Gonzáles, 2000).

#### **Fase Inicial o de latencia:**

Se da la inoculación del medio con la microalga, esta se adapta a las condiciones establecidas. Esta fase puede durar de 1 a 3 días dependiendo del tamaño del inoculo. (Gonzales, 2000).

#### **Fase Exponencial:**

El cultivo se ha adaptado a las condiciones. La división celular se incrementa en función del tiempo debido a que los nutrientes están siendo asimilados y el proceso de reproducción es activo. (Gonzales, 2000).

#### **Fase de declinación de la fase exponencial:**

El tiempo requerido para duplicar la población aumenta, reduciéndose la tasa de crecimiento ya que los nutrientes han sido consumidos, se produce un aumento en la concentración de metabolitos y una reducción de la actividad fotosintética por el incremento de la densidad de la población, reduciendo la disponibilidad de la luz. (Maldonado, 2014; Álvarez, 1994).

#### **Fase estacionaria**

La densidad celular se mantiene constante por periodos más o menos prolongados. Esta fase es corta debido a que los nutrientes han sido consumidos. (Gonzales, 2000).

#### **Fase de muerte o declinación**

Esta fase es causada por las condiciones desfavorables del ambiente, sobre el cultivo y el limitado suplemento de nutrientes o la contaminación por otros microorganismos oportunistas. (Rodríguez, 2006).

### 2.1.6. Medios de Cultivo para Microalgas

Para el cultivo de microalgas existen diferentes fórmulas para medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio. Muchas de ellas presentan modificaciones de fórmulas previamente publicadas y algunas derivadas de análisis de agua en el hábitat nativo y consideraciones ecológicas.

Los medios de cultivo pueden ser clasificados como Medios enriquecidos (usados en acuicultura) donde solamente se conoce lo que uno esta adicionando al agua de mar o agua dulce y los Medios químicamente definidos, en los cuales se conoce toda la composición química del medio partiendo de agua desionizada (McLachlan, 1973)

### A) Medios Enriquecidos

Estos medios se encuentran constituidos por: medios que contengan macronutrientes, micronutrientes y compuestos orgánicos, medios que contengan macro y micronutrientes y medios que contengan macronutrientes. Dentro de estos tipos podemos encontrar los siguientes medios:

**Medio f de Guillard.** Es muy utilizado en la acuicultura en el mantenimiento de ceparios, ya que contiene una gran cantidad de nutrientes. Es posible encontrarlo en dos formas: como grado reactivo, se encuentra libre de contaminantes, y como grado industrial. (Valenzuela, 1993)

**Medio de Fertilizantes.** Se usan debido a que es una fuente barata de nutrientes para la producción masiva de las microalgas y que ha tenido resultados exitosos, por tal razón algunas veces se prefiere usar esta técnica de cultivo como método de experimentación de bajo costo. Estos fertilizantes, además de contener nitrógeno y fosforo, también contienen varios micronutrientes que son necesarios para las microalgas. (Valenzuela, 1993)

**Biodigeridos.** Para elegir los recursos orgánicos necesarios para hacer el medio de cultivo, debemos de tener en cuenta que sean abundantes en la región, subutilizables y contener la mayoría de los elementos requeridos por las microalgas para el crecimiento. Los recursos orgánicos que se pueden utilizar son: excretas de gallina, vaca, macroalga, etc. De donde se obtienen los nutrientes, metales traza, quelantes, ciertas vitaminas y sustancias promotoras del crecimiento de las microalgas cuya disponibilidad depende de gran parte del tipo de recurso utilizado. (Valenzuela, 1993)

Para extraer los nutrientes de los estiércoles se usan los biodigestores aerobios, porque son de bajo costo y el residuo resultante es estable. Es importante cargar adecuadamente el digestor tanto orgánica como hidráulicamente, para lograr una eficiente nitrificación. (Valenzuela, 1993)

**Medios de Agua de Desecho.** La razón por la cual es factible que se utilicen aguas de desecho como materia orgánica para elaborar medios de cultivo es por su contenido de nitrógeno, fósforo y carbono orgánico. Esto se debe a que se le da tratamiento a dichas aguas, usando la técnica de eutrofización controlada, donde se puede extraer hasta el 95% del nitrógeno y fósforo. (Valenzuela, 1993).

## **B) Medios Químicamente Definidos**

En este tipo de medios se conocen todas las sales y nutrientes que contengan. En estos medios se hacen ciertas modificaciones para mejorar el crecimiento de las algas, por ejemplo la concentración del buffer, adición de  $\text{NaHCO}_3$  o suplementar con suelo u otros extractos. Algunos ejemplos son: ASP-2, ASP-6, Muller, etc. (Valenzuela, 1993).

### **2.1.7. Parámetros de cultivo**

#### **A) Luz**

Es el factor fundamental en el cultivo de las microalgas, debido a que posee propiedades importantes como son:

##### **Calidad espectral**

Depende de la longitud de onda, se utiliza la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir de 350 a 700nm (Maldonado, 2014; Stephens & Ross, 2010).

##### **Intensidad**

Se expresa como la cantidad de energía en una superficie durante un periodo de tiempo. (Gliessman, 2002). Hay reportes donde la producción y acumulación de metabolitos de interés es afectado por la radiación de luz blanca, sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga. (Maldonado, 2014; Martin, 2010):

##### **Fotoperiodo**

El fotoperiodo, tiempo de exposición a la luz, tiene efecto en los ciclos de vida y las actividades metabólicas de las microalgas. (Maldonado, 2014).

## **B) Temperatura**

La tasa de crecimiento aumenta cuando la temperatura aumenta, dentro de un rango óptimo, ya que si no se obtiene el efecto contrario. La temperatura óptima para la fotosíntesis aumenta cuando aumenta la intensidad de luz. La temperatura también influye en la disponibilidad de nutrientes. La temperatura mínima ( $16^{\circ}\text{C}$ ) por debajo de la cual no hay crecimiento; una temperatura óptima ( $16^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ ) se produce un crecimiento rápido; y una temperatura máxima ( $35^{\circ}\text{C}$ ) encima de esta no hay crecimiento. (Maldonado, 2014; Madigan et al, 2004).

## **C) pH**

El rango de pH esta entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo es generalmente mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con  $\text{CO}_2$ . El pH aumenta conforme la edad del cultivo sea mayor, debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes. (Maldonado, 2014; Benavente et al, 2012).

## **D) Agitación**

Requisito importante para obtener altos rendimientos de biomasa microalgal. Los efectos que produce son: (Maldonado, 2014; Richmond, 1986).

Asegura la distribución homogénea de la células y nutrientes dentro del cultivo.

Mejora la distribución de la luz evitando el efecto de ensombrecimiento.

Evita la sedimentación celular en el fondo del cultivo, estimulando el metabolismo celular.

## **E) Nutrientes**

Los requerimientos nutritivos varían de acuerdo a la especie y las condiciones ambientales de los cultivos. Los nutrientes inorgánicos pueden dividirse en dos grupos: macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluye compuestos de nitrógeno, fósforo, silicio y azufre) son componentes fundamentales de

macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular. Por su parte, los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas. (González, 2010).

La proporción óptima específica para cada especie puede variar dependiendo de varios factores como la tasa de crecimiento, temperatura, luz o disponibilidad de CO<sub>2</sub> (Lagus, 2009). Así mismo, las especies difieren en sus requerimientos de fósforo y nitrógeno y en la cinética de asimilación de nutrientes, por lo cual presentan diferentes proporciones óptimas.

### **Nitrógeno**

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas clave, como aminoácidos y nucleótidos. La síntesis de proteínas normalmente depende de un adecuado suministro de nitrógeno. El nitrógeno se presenta de diferentes formas en el agua, incluyendo nitrógeno diatómico (N<sub>2</sub>), amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), otros óxidos de nitrógeno y nitrógeno en compuestos orgánicos. (Se, 1998).

El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía, resultando más favorable para las algas usar el amonio cuando éste está disponible (Se, 1998).

### **Fosforo**

El fósforo juega un papel importante en la mayoría de procesos celulares, especialmente los que están implicados en la generación y transformación de energía metabólica, por lo que es indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas (González, 2010; Stewart, 1974).

Mientras que las algas pueden utilizar el nitrógeno en diferentes formas, el fósforo casi exclusivamente debe ser asimilado en forma de fosfatos y es la concentración de este compuesto la que determina la tasa de crecimiento algal. (González, 2010).

La composición de especies en un determinado ecosistema estará determinada no solo por la disponibilidad de nutrientes sino también por su adecuada proporción,

esto se debe a que los cambios en la proporción de nutrientes generan cambios en las comunidades de fitoplancton y por consiguiente en las redes tróficas. Diferentes combinaciones de nutrientes tienen diferentes efectos en las comunidades fitoplanctónicas porque no todas las especies responden de la misma forma en su tasa de crecimiento ante la deficiencia de diferentes recursos. (González, 2010).

#### **2.1.8. Contenido lipídico de las microalgas**

Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (membrana cloroplastica), fosfolípidos (plasmalema y sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.). (Garibay et al, 2009).

La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas es complicada debido a la variación ante las distintas condiciones de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica. (Garibay et al, 2009).

La acumulación de lípidos en especies oleaginosas, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias, funcionan como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo. El comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es variable y por lo tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales. (Garibay et al, 2009).

#### **2.1.9 Fotosíntesis**

La fotosíntesis es el proceso en el cual los fototrofos, organismos que utilizan la luz como fuente de energía, capturan y convierten la energía de fotones a energía utilizada bioquímicamente, es a través de la fotosíntesis que los fototrofos obtienen la energía y poder reductor necesario para incorporar CO<sub>2</sub> y la fabricación de moléculas orgánicas que se requieren para el crecimiento. (López, Rojas, 2010).

La habilidad del rendimiento de la fotosíntesis depende de la presencia de los pigmentos absorbedores de luz, las clorofilas. Las clorofilas absorben la luz principalmente en las regiones azul – violeta y rojo del espectro y absorben débilmente en la región verde; es por esto que muchos fototrofos son de color verde. (López, Rojas, 2010).

Las microalgas son en su mayoría aeróbicas y autotróficas. (López, Rojas, 2010). Las microalgas tienen un tipo de fotosíntesis que envuelve dos fotosistemas (PSI y PSII), usan H<sub>2</sub>O como donador de electrón, y evoluciona el oxígeno como un resultado de la fotólisis de agua.

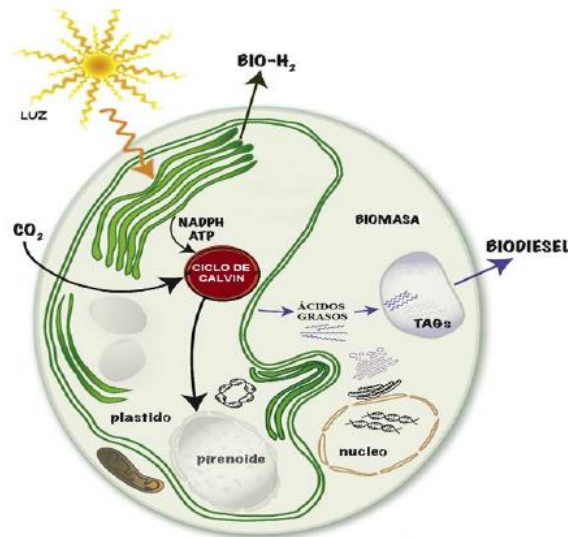
#### **2.1.10 Síntesis de Lípidos**

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies.

La variación del perfil de ácidos grasos entre grupos algales diversos es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo. (Garibay et al, 2009).

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis de novo de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades

acilo y  $\beta$ -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas. (Garibay et al, 2009).



**Figura 2 Esquema de la síntesis de lípidos en microalgas (Fernández et al. 2012)**

Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 $\omega$ 9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación. Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la desfosforilación del ácido fosfatídico previamente formado. (Garibay et al, 2009).

### 2.1.11 Usos y aplicaciones de las microalgas

Reconociendo las propiedades de las microalgas, se han iniciado diferentes líneas en el campo de investigación. Siendo organismos unicelulares, su biomasa entera posee los productos de interés comercial tales como proteínas, lípidos, pigmentos, enzimas y biopolímeros. Constituye también un valioso recurso medioambiental y biotecnológico; es así que para los problemas de contaminación ambiental y reciclaje de residuos, se comprobó que las algas juegan un papel importante en la transformación de la materia orgánica. Se ha demostrado que la biomasa microalgal puede proporcionar diversos productos ricos en energía. (Albarracin, 2007).

## **2.2. SISTEMAS DE CULTIVO**

Existen dos sistemas de cultivo utilizados para la producción de microalgas. Se suelen clasificar por su configuración y tipo de funcionamiento en: los sistemas abiertos en los que el cultivo se encuentra expuesto y sistemas cerrados (Fotobiorreactores), en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmosfera.

### **2.2.1. Sistemas Abiertos**

Sistema utilizado comúnmente para la producción comercial. Destacan por asemejarse al entorno natural de las microalgas. Consiste en realizar cultivos en aguas superficiales naturales como estanques, lagunas y lagos, y estanques artificiales o tipo circuito (raceway) de 20 a 50 cm de profundidad, permitiendo una difusión con la atmosfera para obtener CO<sub>2</sub> necesario para el crecimiento. (Maldonado, 2014; Ruiz, 2011). Las ventajas inherentes a los cultivos abiertos radican en su sencillez y su bajo costo de inversión en contraste con los cerrados y la facilidad que ofrecen para su operación y mantenimiento. Los sistemas abiertos presentan diversos inconvenientes tales como pérdidas de agua debido a la evaporación, transferencia limitada de CO<sub>2</sub> al cultivo por su baja concentración en el aire y su difusión en la atmosfera, control es limitado, alta susceptibilidad de contaminación, requerimiento de superficies extensas, amplios periodos de producción, producción reducida de biomasa y penetración limitada de luz. (Garibay et al, 2009).

### **2.2.2. Sistemas cerrados**

Basado en el cultivo en reactores transparentes, con distintas geometrías como tubulares, planas o cilíndricas. La principal ventaja es la facilidad de mantener un monocultivo lo que proporciona un producto de pureza para su procesado en la industria. (Maldonado, 2014; Ruiz, 2011).

Los sistemas cerrados, ofrecen numerosas ventajas tales como pérdidas mínimas de CO<sub>2</sub>, riesgo reducido de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, menores requerimientos de superficie, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción y productividades considerablemente superiores. (Garibay et al, 2009).

### A) Fotobiorreactor

Un fotobiorreactor es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz para proporcionar una fuente de energía fotónica en el reactor. (Chisti, 2007). Ya que estos sistemas son cerrados, el cultivo de microalgas no interactúa con los gases del medio ambiente evitando su contaminación. En este sistema se introduce un medio de cultivo que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas.

Los fotobiorreactores se construyen a partir de materiales transparentes con el fin de permitir el paso de la radiación lumínica necesaria para los procesos fotosintéticos que se dan en el interior. Pueden ser diseñados para que su iluminación sea por métodos artificiales, por luz solar o por ambas. (Piedrahita et al., 2012).

Los fotobiorreactores permiten establecer cultivos de alta densidad celular, 3 o más veces en comparación con los sistemas abiertos. Esto tiene ventajas como:

- Facilidad para cosechar biomasa.
- Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
- Mejor control de las condiciones de cultivo.
- Menor inversión de capital en el fotobiorreactor.

Este último es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de las microalgas. (Contreras et al, 2003).

Algunos parámetros que debemos tener en cuenta en el diseño del fotobiorreactor.

#### **Suministro de Luz.**

La fuente de luz y la intensidad de energía son factores que afectan el desarrollo y crecimiento de las microalgas. La intensidad de luz puede verse afectada por factores como: distancia entre la energía lumínica y el fotobiorreactor, geometría del fotobiorreactor, longitud de onda, aumento de concentración celular, formación de biopelículas en las paredes y formación de productos. Para el suministro de luz encontramos diferentes fuentes

luminosas a utilizar: tales como: lámparas de tungsteno o halógeno, diodos emisores de luz (LED), lámparas fluorescentes, fibra óptica y laser. (Janssen et al., 2000)

Las investigaciones actuales se basan en sistemas que tengan un menor costo; Melnicki et al. (2013) usando luz tipo LED logro mejorar los sistemas de cultivo, alcanzando nuevas capacidades para la investigación. Sepulveda (2011) utilizo un sistema de iluminación con LEDS donde se generó el doble de masa, debido a la mayor trayectoria de fotones dentro del fotobiorreactor. (Ramírez et al, 2013).

El fotoperiodo al que se somete el cultivo es importante en el diseño del proceso ya que la fotosíntesis conlleva reacciones de luz y oscuridad. La duración de los ciclos luz/oscuridad son determinantes en el desarrollo de fotobiorreactores para ser considerado en la producción de biomasa y en la absorción del CO<sub>2</sub>. (Ramírez et al, 2013).

### **CO<sub>2</sub>**

El CO<sub>2</sub> es generalmente introducido al fotobiorreactor por inyección continua o intermitente en la parte inferior del recipiente. Los límites máximos y mínimos de CO<sub>2</sub> necesarios no están bien definidos pero en la práctica se usa comúnmente aireación con 5-15% de CO<sub>2</sub>, aunque esto varía en relación a la cepa microbiana (Jaiswal y Kashyap, 2002).

Entre los sistemas más utilizados se encuentra la alimentación directa del gas en columnas de burbujeo o reactores airlift. (Ramírez et al, 2013).

### **Acumulación de Oxígeno**

La acumulación de oxígeno es un serio problema en los fotobiorreactores. El oxígeno es un producto de la fotosíntesis, cuando queda atrapado en el medio de cultivo causa un efecto tóxico reduciendo la eficiencia fotosintética, generando inhibición del crecimiento incluso a concentraciones altas de CO<sub>2</sub>. Por esto, se necesita un sistema eficaz de desgasificación para remover el oxígeno formado. Es necesario tener entonces una unidad separada de desgasificación. (Ramírez et al, 2013).

### **Mezcla**

El mezclado debe permitir condiciones homogéneas, favorecer la transferencia de nutrientes, dispersión uniforme de cianobacterias entre las zonas oscuras e iluminadas, transferencia de energía, romper gradientes de difusión en la superficie celular, retirar el oxígeno fotosintético generado, evitar estratificación térmica ya que puede existir amplitud térmica entre fondo y superficie del fotobiorreactor de hasta 8° C (Carvalho et al., 2006).

Un buen mezclado debe aumentar la productividad hasta el 40% en un reactor tubular. El sistema de mezcla de gases causa menores daños que otros métodos. A pesar de ello, el sistema no está libre de estrés o daños celulares. (Ramírez et al, 2013).

### **Control de pH**

Controlar el pH resulta difícil debido al consumo de carbono en la fotosíntesis. El pH afecta la polaridad de los compuestos del medio de cultivo así como la disponibilidad de nutrientes, CO<sub>2</sub>, hierro y ácidos orgánicos.

El pH se eleva al disminuir la concentración de CO<sub>2</sub> debido al consumo algal. La concentración de CO<sub>2</sub> puede ser controlada mediante su inyección en las zonas donde la concentración ya no permite la capacidad fijadora máxima. El pH se controlará al mismo tiempo debido al conocido equilibrio del CO<sub>2</sub> con el agua (Ramírez et al, 2013; Camacho et al., 1999).

Algunas de las recomendaciones para el diseño del fotobiorreactor son los siguientes: (Contreras et al, 2013).

La trayectoria de la luz debe ser pequeña (2,5cm)

Mantener una alta densidad celular.

Un mezclado vigoroso para asegurar ciclos L/O de alta frecuencia.

Usar tramos cortos de tuberías para evitar la inhibición del crecimiento por acumulación de O<sub>2</sub>.

Evitar la acumulación de sustancias inhibitorias.

Mantener temperatura y pH óptimos.

## B) Tipos de Fotobiorreactores

La eficiencia de un fotobiorreactor es determinada en base a la captación, transporte, distribución y uso de la luz (Zijffers et al., 2008). Se han diseñado diferentes fotobiorreactores con propiedades específicas que pueden agruparse en tres tipos básicos: tubulares, de superficie plana (flat plate) y de tanque agitado. Los tubulares y de superficie plana son los más empleados considerando que utilizan luz solar. (Merida, 2013).

### Fotobiorreactores de Placa Plana

Los fotobiorreactores de placa plana han recibido mucha atención para el cultivo de microorganismos fotosintéticos debido a su amplia superficie de iluminación.

Las bondades del diseño son su gran superficie de iluminación, buena capacidad para la movilización de las algas, alta productividad de biomasa, relativamente económica, fácil de limpiar, con poca acumulación de oxígeno. Aunque presenta aspectos negativos tales como el escalamiento lo hace poco económico y hay dificultad para controlar la temperatura. (Piedrahita et al., 2012).

### Fotobiorreactores de columna de burbujas

Estos fotobiorreactores son compactos, de bajo costo, y fácil de operar. Por otra parte, son muy prometedores para el cultivo a gran escala para las microalgas. Las virtudes de este tipo de fotobiorreactor son la alta transferencia de masa, una buena mezcla, bajo consumo de energía, alto potencial de escalamiento, fácil de esterilizar y presenta una notable reducción de foto-inhibición. Las limitaciones son las pequeñas áreas de iluminación de superficie, su construcción requiere de materiales sofisticados, alto esfuerzo cortante de cultivos de microalgas, disminución del área de iluminación superficie sobre la extensión del fotobiorreactor. (Piedrahita et al., 2012).

## Fotobiorreactores Tubulares

El fotobiorreactor tubular es uno de los más adecuados para cultivos en exteriores bajo la acción de la radiación solar. Consiste de colector solar, conformado de un arreglo de tubos rectos transparentes, generalmente de plástico o vidrio, cuya su función es capturar la mayor cantidad de luz solar posible para el cultivo microalgal presente en su interior. (Piedrahita et al., 2012).

Las ventajas de los fotobiorreactores tubulares son principalmente la gran área de exposición a la luz solar, por lo tanto su actividad fotosintética es elevada al igual que su productividad de biomasa; son relativamente económicos. Sin embargo, algunas desventajas son la poca transferencia de masa, altos niveles de pH y oxígeno en la mezcla; se presenta algún grado de adherencia y crecimiento algal en las paredes, debe realizarse mantenimiento de los niveles de dióxido de carbono disueltos a lo largo de los tubos. (Piedrahita et al., 2012).

## 2.3 TE DE COMPOST

### 2.3.1 Biodigestor

Un biodigestor es un sistema mediante el cual se genera un ambiente adecuado para la descomposición de la materia orgánica ya sea con o sin presencia de oxígeno, en su forma más simple, un contenedor cerrado, hermético e impermeable (llamado reactor), dentro del cual se deposita el material orgánico a fermentar (excrementos de animales y humanos, desechos vegetales no se incluyen cítricos ya que acidifican-, etc.) en determinada dilución de agua para la fermentación. Al fenómeno de fermentación con presencia de oxígeno se le llama “digestión aeróbica”, y el fenómeno que trabaja con ausencia de oxígeno se le llama “digestión anaeróbica”. Estos sistemas funciona de una manera muy similar al estómago de una persona, ya que dentro del biodigestor encontramos que viven unas bacterias que son capaces de descomponer el estiércol y otros residuos orgánicos, que después se convierten en productos de beneficio tanto para la agricultura, la ganadería y la comunidad. Una de las características más importantes de la biodigestión es que disminuye el

potencial contaminante de los excrementos de origen animal y humano. (Cotrina et al., 2013)

#### **A) Biodigestor anaerobio**

Es donde se da el proceso biológico por el cual se realiza la digestión anaeróbica de los desechos orgánicos, en ausencia de oxígeno, y mediante la acción de un grupo de bacterias anaeróbicas, se descompone en productos gaseosos o “biogás” ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , etc.), y en digestado o “biol”, que es una mezcla de productos minerales (N, P, K, Ca, etc.) y compuestos de difícil degradación.

El biogás contiene un alto porcentaje en metano,  $\text{CH}_4$  (entre 50-70%), por lo que es susceptible de un aprovechamiento energético mediante su combustión en motores, en turbinas o en calderas, bien sólo o mezclado con otro combustible. (IDEA, 2007)

#### **B) Biodigestor aerobio**

Es donde se da el proceso biológico por el cual se realiza la digestión aeróbica de los desechos orgánicos, con presencia de oxígeno y un grupo de bacterias anaeróbicas, en el cual se obtiene un extracto principal o “Te de compost”.

#### **2.3.2 Características del Te de compost**

El Te de compost es una extracción líquida de la cual se extraen microorganismos y los nutrientes de forma aeróbica o anaeróbica. Estas dos formas de extracción tienen diferentes ventajas, sin embargo, la forma aeróbica permite extraer y multiplicar un conjunto de microorganismos más diversos. (Francescangeli, 2013).

El Te de compost es una terminología moderna, sin embargo, la utilización de extractos biológicos data desde hace miles de años por diferentes culturas (Griegos, Egipcios y mayas), pero solo actualmente a través del uso de bombas que suministran aire se han logrado obtener soluciones biológicas de microorganismos y nutrientes benéficos. El Te de compost es un extracto acuoso de alta actividad biológica que se consigue por una fermentación aeróbica de la materia orgánica. (Riegel, 2008).



**Figura 3 Variedad de microorganismos presentes en el Te de compost**

### **2.3.3 Características de la materia prima**

#### **A) Materia orgánica**

Los residuos orgánicos son los restos biodegradables de plantas y animales, que incluyen restos de frutas y verduras de la poda de plantas o productos de desecho de los animales como el estiércol la más usada, que al ser recuperados son utilizados para la fabricación de un fertilizante eficaz y beneficioso para el medio ambiente.

Los residuos orgánicos pueden convertirse fácilmente en Te de compost, al fabricar el Te de compost los residuos orgánicos no se convierten en basura, al contrario son beneficiosos para la tierra y la producción de alimentos.

#### **B) Carga microbiana**

La carga microbiana son los encargados de degradar y transformar la materia orgánica dando como fruto el compostaje. (Goyal 2005).

Actúan sobre los nutrientes macromoleculares, llevándolos a estados directamente asimilables por las plantas, lo cual se manifiesta en notables mejoras de las cualidades organolépticas de frutos y flores y mejor resistencia a los agentes patógenos. Su riqueza en oligoelementos lo convierte en un fertilizante completo. Aporta a las plantas sustancias necesarias para su metabolismo. Se puede utilizar a altas dosis sin contraindicaciones, ya que no quema las plantas, ni siquiera las más delicadas. (Márquez et al, 2012).

### C) Agua

Olor: Son inodoras.

Sabor: Un agua potable debe tener un sabor débil y agradable. Las aguas muy puras son menos agradables, debido a que tienen menos minerales. Los cloruros dan sabor salobre (con presencia de sal). El magnesio produce un sabor amargo.

Color: No tiene color Si aparece color es debido a sustancias en suspensión o en solución. Color verde se debe a algas.

Turbidez: Toda agua debe ser transparente, y no tener partículas insolubles en suspensión como limo, arcilla, materia mineral, algas, materia fecal, etc. (Márquez et al, 2012).

#### 2.3.3 El proceso del Te de compost

El proceso de compostaje se define como una descomposición biológica de la materia orgánica, bajo condiciones que permitan un desarrollo de temperaturas termofílicas como consecuencia de una producción biológica de calor, que da un producto final estable, libre de patógenos y semillas de malas hierbas y que aplicado a la agricultura produce un beneficio. (Haug 1993, citado por Álvarez 2006).

Preparación: en donde se acondicionan, selecciona y mezclan los materiales de partida para regular su contenido en agua y ajustar la relación adecuada de C/N.

Descomposición mesofílica: se da una degradación de azúcares y aminoácidos por la acción de grupos de bacterias a menos de 40 °C.

Descomposición termófila: se degradan polímeros y hemicelulosa por hongos del grupo de actinomicetos entre 40 y 60 °C.

Descomposición mesófila de enfriamiento: se realiza la degradación de celulosas y ligninas por bacterias y hongos a menos de 40 °C.

Maduración: se estabiliza y polimeriza la materia orgánica, desciende el consumo de oxígeno y desaparece la fitotoxicidad.

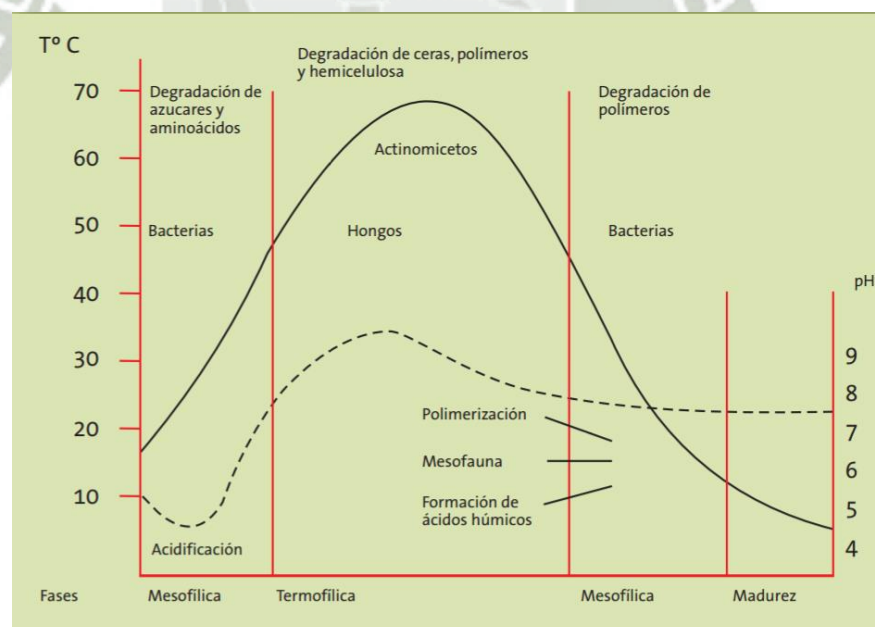
El pH de la masa durante el proceso de maduración también sufre una variación similar en casi todos los sustratos. El descenso inicial en el pH coincide con el

paso de la fase mesofílica a la fase termofílica. Se da una producción de CO<sub>2</sub> y liberación de ácidos orgánicos, al descender el pH favorece el crecimiento de hongos (5.5 – 8 pH) y el ataque a lignina y celulosa.

Durante la fase termofílica se pasa a una liberación de amoníaco como consecuencia de la degradación de aminas procedentes de proteínas y bases nitrogenadas y una liberación de bases incluidas en la materia orgánica, resultando de estos procesos se da una subida en pH y retoman su actividad las bacterias. (6-7.5 pH)

Tras el incremento del pH se da una liberación de nitrógeno por el mecanismo anteriormente citado y que es aprovechado por los microorganismos para su crecimiento, dando paso a la siguiente fase de maduración.

Finalmente se da una fase estacionaria de pH próximo a la neutralización en la que se estabiliza la materia orgánica y se dan reacciones lentas de poli condensación. (Laos, 2003; Mustin, 1987)



**Figura 4 Evolución de la temperatura y el pH durante el proceso de maduración en el biodigestor.**

## 2.4 LÍPIDOS EN MICROALGAS

Los lípidos constituyen un grupo de compuestos químicamente diverso cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua, pero que, en cambio, se disuelven fácilmente en los disolventes apolares orgánicos. La fracción lipídica de la biomasa microalgal está constituida por lípidos neutros y lípidos polares. Los lípidos neutros constituyen la reserva energética de la célula y los lípidos polares, son lípidos estructurales. (Belarbi, 2004)

### 2.4.1 Ácidos Grasos Poliinsaturados

Los ácidos grasos que poseen más de dos dobles enlaces, se denominan poliénoicos o poliinsaturados (PUFAs) y uno de los dobles enlaces se halla entre los átomos de carbono 9 y 10, y los demás dobles enlaces adicionales están situados generalmente entre este doble enlace y el grupo metilo terminal de la cadena. En la mayoría de los casos, los dobles enlaces se hallan separados por un grupo metileno y suelen tener configuración *cis*. La nomenclatura usual para estos compuestos consiste en indicar la longitud de la cadena, el número de insaturaciones y la posición del doble enlace más cercano al grupo metilo terminal. Entre los PUFAs se distinguen dos grandes familias: (Belarbi, 2004)

Serie n-6, está constituida por el ácido linoleico (18; 2n-6, LA), el ácido  $\gamma$ -linolenico (18; 3n-6, GLA) y el ácido araquidónico (20; 4n-6, AA).

Serie n-3, está constituida por el ácido  $\alpha$ -linolenico (18; 3n-3, ALA), el ácido eicosapentaenoico (20; 5n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22; 6n-3, DHA).

Existen tres tipos principales de ácidos grasos de omega-3 que se ingiere a través de los alimentos y que el organismo utiliza: el ácido alfa-linolénico (ALA) y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. El ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), una vez ingeridos, el cuerpo convierte los ALA en EPA y DHA.

La mayoría de los ácidos grasos omega-6 se consumen en la dieta a partir de aceites vegetales como el ácido linoleico. El organismo convierte el ácido linoleico en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: gamma-linolénico (GLA) y el ácido araquidónico (AA).

La ingesta suficiente de ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6) es importante por el papel crucial que desempeñan en la salud:

El desarrollo y mantenimiento de una correcta función cerebral, en recién nacidos, embarazo y lactancia, el DHA es un constituyente esencial de las membranas de las células cerebrales y de otros tejidos nervioso.

La visión, el DHA constituye de las membranas de las células de la retina.

Las respuestas inmunitarias e inflamatorias, en procesos inflamatorios de las articulaciones, el uso de suplementos con ácidos grasos omega-3 alivian el dolor de la articulaciones disminuyen la rigidez matutina y permite reducir la cantidad de medicamentos que las personas con artritis reumatoidea necesitan.

La producción de moléculas semejantes a las hormonas, en los trastornos mentales, los ácidos grasos omega-3 son componentes importantes de las membranas de las células nerviosas ayudándolas a comunicarse entre si, lo cual es un paso esencial para mantener una buena salud mental.

Cáncer, el equilibrio entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6 parece tener un papel importante en el desarrollo y crecimiento de algunas formas de cáncer, como el de mama, colon y próstata, pero aunque se requieren más estudios se especula, que en combinación con otros nutrientes como la vitamina C, vitamina E, el beta-caroteno y la coenzima Q10, estos ácidos pueden ser especialmente valiosos en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.

Osteoporosis, los estudios sugieren que el ácido graso omega-3, EPA, pueden ayudar a aumentar los niveles de calcio en el cuerpo, favoreciendo el depósito de calcio en los huesos.

Enfermedades cardiovasculares, los estudios han demostrado que una ingesta elevada de ácidos grasos de cadena larga omega-3 EPA y DHA contribuye a

disminuir los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, principalmente, la presión arterial alta y los niveles de triglicéridos en la sangre.

Los PUFAs pueden ser obtenidos tanto de fuentes vegetales como de animales terrestres y marinos. La elección de una fuente depende de la concentración del PUFAs deseado, de la disponibilidad de la fuente y de la presencia o ausencia de impurezas. En la actualidad los aceites de pescado al contener una alta proporción de ácidos grasos, son los más utilizados para su producción. (Ibáñez, 2005).

Las microalgas son fuentes económicamente atractivas. El contenido en PUFAs de la microalga no solo depende de la especie sino también de las condiciones de cultivo a la que se encuentra sometida, siendo estas: composición del medio de cultivo, aireación, intensidad de luz, duración del fotoperíodo, temperatura y edad del cultivo. (Ibáñez, 2005).

Algunas de las ventajas que poseen los aceites extraídos de las microalgas en comparación con los extraídos a partir de aceites de pescado, son las siguientes: (Ibáñez, 2005)

Las microalgas presentan una producción estable durante todo el año.  
(Producciones controladas)

La composición en ácidos grasos más sencilla, lo que simplifica los procedimientos de fraccionamiento y purificación.

La composición uniforme y posibilidad de buscar especies y condiciones superproductoras (modificaciones genéticas, selección de cepas y mutación) en ácidos grasos de interés.

Presentan buen sabor.

La biomasa se encuentra libre de partículas y materiales pesados.

Ausencia de colesterol.

## A) Extracción de Aceites

En general la extracción de los lípidos debe ser rápida, fiable, y lo suficientemente suave para minimizar las degradaciones por auto oxidación y la aparición de productos de degradación.

Los disolventes a usar deben ser seleccionados teniendo en cuenta; su toxicidad; facilidad de manejo; seguridad y costo; alta volatilidad para facilitar la eliminación posterior, posibilidad de formar dos fases con agua para retirar la fracción no lipídica de la biomasa; poco poder de extracción para compuestos indeseados y un intervalo de extracción adecuado para los diferentes tipos de lípidos.

Hay que tener en cuenta las interacciones y enlaces que existen entre los lípidos y los componentes no lipídicos. Los lípidos polares de las membranas forman interacciones hidrofóbicas que pueden romperse por disolventes apolares como el hexano o el cloroformo. (Richmond A., 2004).

Los lípidos extraídos deben ser purificados, porque en la mayoría de los casos están contaminados, con aminoácidos libres, pigmentos, que se arrastran con los lípidos al usar disolventes polares.

### Extracción con solvente químico

Este tipo de extracción es muy utilizada para obtener lípidos de origen animal y vegetal, en el caso de las microalgas, el solvente es adicionado a la biomasa seca aunque en algunos casos es utilizada biomasa con cierta cantidad de agua, disminuyendo los costos, pero disminuye también la eficiencia de la extracción.

Una gran variedad de solventes orgánicos suelen ser utilizados en la extracción de aceite de microalgas, siendo los más populares el hexano y el etanol, mediante una mezcla hexano: etanol es posible extraer más del 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa (Richmond A., 2004).

El sistema de extracción Soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas, este sistema, se compone de un balón donde se encuentra un solvente orgánico que se calienta hasta ebullición, un tubo de extracción Soxhlet,

donde se coloca la muestra, la cual va contenida en un cartucho, y un condensador; en el cual, después de evaporarse, el solvente orgánico se condensa y cae al tubo Soxhlet, donde extrae el aceite contenido en la biomasa seca hasta que el tubo se llena, cuando el tubo está lleno de solvente, este, por medio de un sifón, vuelve al balón arrastrando el aceite que contiene el resto de solvente y se repite el proceso. (Salazar, 2012).

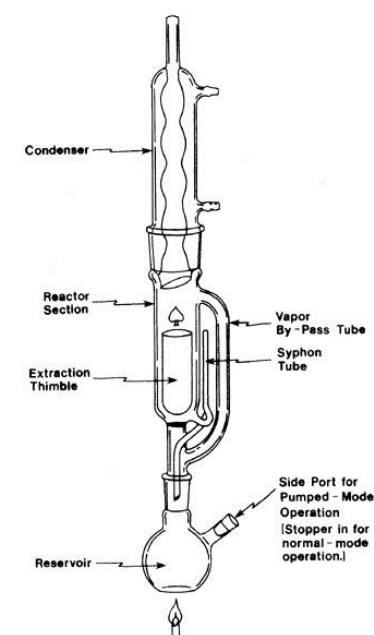


Figure 1 SOXHLET EXTRACTOR

### Figura 5 Sistema Soxhlet

El solvente hexano también ha sido ampliamente utilizado como solvente de extracción para microalgas en el sistema Soxhlet con resultados interesantes (Anderson & Sorek; 2008), el hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia lípidos neutros, también puede ser utilizado en mezcla con isopropanol, esta mezcla se considera segura a escala industrial, eficiente en la extracción de ácidos grasos y de baja toxicidad. (Salazar, 2012).

## B) Caracterización de Ácidos Grasos

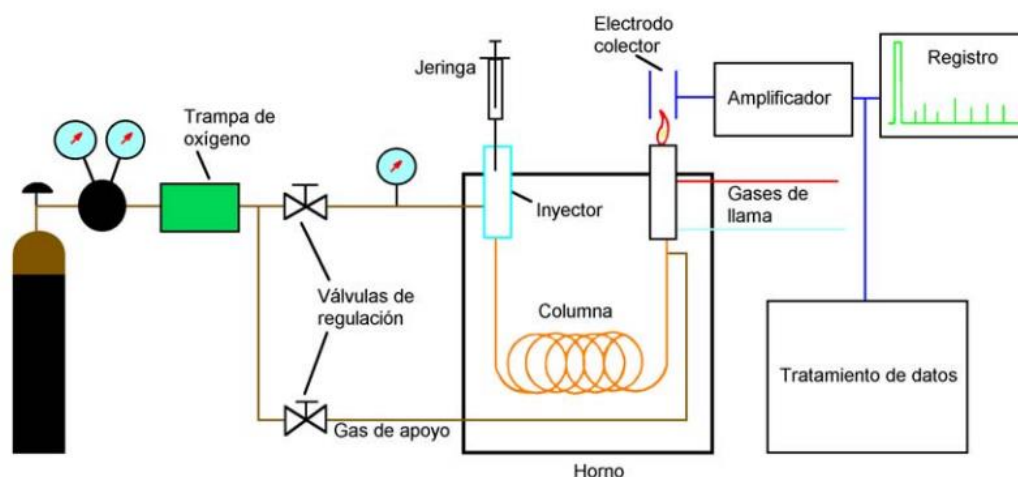
La cromatografía en general es la técnica tradicional utilizada en la separación y análisis de los lípidos. La cromatografía es el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas y se emplea también para la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas. En todas las técnicas cromatográficas es común el uso de dos fases: una fija y otra móvil. En la relación de reparto del soluto entre estas dos fases está el fundamento de la separación. (Belarbi, 2004).

### Cromatografía de gases

Es la técnica más utilizada en la separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos. Es una técnica rápida y eficiente de análisis que se utiliza para la identificación y cuantificación de lípidos. Viene siendo empleada habitualmente en el análisis de los ácidos grasos desde mediados de los años setenta. (Campra, 2003)

La separación se basa en la diferencia de los puntos de ebullición y de la diferencia en la polaridad de los diferentes componentes en la muestra problema. A medida que la muestra vaporiza avanza en la columna, se verificara el reparto de los componentes de la misma, entre las dos fases, la estacionara y la fase móvil constituida por el gas portador. La característica más importante de la fase es la polaridad, porque esta determina la selectividad o la capacidad de la columna para separar compuestos de la muestra. (Belarbi, 2004).

Siendo el fundamento de la cromatografía de gases es sencillo, Pero es necesario un montaje instrumental más complejo que la mayor parte del resto de cromatografías, debido fundamentalmente a que opera con gases, lo que obliga a trabajar en sistemas cerrados y a controlar cuidadosamente caudales, presiones y temperaturas. Los sistemas de detección y registro grafico añaden complicaciones adicionales a la instrumentación del cromatógrafo. (Campra, 2003).



**Figura 6 Esquema de Cromatografía de gases**

El gas inerte que actúa de fase móvil está contenido en una botella, de la que se extrae mediante una válvula manorreductora y se hace pasar por un desecante, un medidor de flujo y un manómetro de presión. Después de pasar por la célula de referencia del detector, el gas es conducido hasta la columna cromatográfica. El cromatógrafo dispone de un sistema de inyección para introducir la muestra, la cual se coloca en un horno termorregulador. A la salida de la columna los gases pasan por un medidor de caudal y por la célula de medida del detector. La señal del detector está conectada a un sistema rápido de registro. Los gases de salida se pueden expulsar al exterior o pueden recogerse mediante sistemas adecuados.

La identificación de los ácidos grasos se realiza mediante la comparación de los tiempos de elución de la muestra con los de estándares conocidos. (Campra, 2003).

## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Institución Educativa Arcángel San Miguel ubicada en la Avenida Caracas A-99 Urbanización Simón Bolívar del distrito de José Luis Bustamante y Rivero. Y para los análisis se utilizaron los laboratorios H – 101 y H – 302 de la Universidad Católica de Santa María.

### 3.2 MATERIALES

#### 3.2.1 Material Biológico

1. Estiércol de vacas lecheras.
2. Microalga *Chlorella sp*

#### 3.2.2 Material de Laboratorio

##### Materiales de vidrio

1. Bagueta
2. Balones de 250ml, 500ml, 1000ml
3. Beakers de 1000ml
4. Bureta
5. Cámara de Neubauer
6. Fiolas 50ml, 100ml
7. Frascos de vidrio 300ml
8. Matraces de 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml
9. Matraz Kitasato de 250ml
10. Pera de decantación
11. Picnómetro
12. Pipetas de 10ml
13. Placas Petri
14. Probetas de 100ml, 500ml y 1000ml

### Reactivos

1. Ácido fosfórico 95%
2. Ácido sulfúrico concentrado
3. Agar – agar
4. Agua destilada
5. Alcohol
6. Almidón 1%
7. Bicarbonato de sodio
8. Cloroformo puro
9. Cloruro de calcio
10. CO<sub>2</sub> medicinal
11. Dicromato de potasio 1N
12. Difenil amina 1% p/v
13. Hexano
14. Ioduro de potasio 15%
15. Reactivo de Wijs
16. Sulfato ferroso 0.5N
17. Tiosulfato de sodio 0.1N

### Otros

1. Algodón
2. Asa de kohle
3. Cinta de pH
4. Crisoles
5. Embudo Buchner
6. Flask de 40ml Thermoscientific NUNC
7. Focos LED 220V
8. Fotobiorreactor tubular
9. Gasas
10. Mangueras y llaves de paso
11. Micropipeta 1000uL, 100uL
12. Papel filtro FISHERBRAND Q5

13. Propipeta
14. Recipientes de plástico de diferentes medidas
15. Soportes y pinzas
16. Termómetro

### 3.2.3 Medios de cultivo

1. Medio de cultivo hidropónico.
2. Medio “Te de compost”

### 3.2.4 Equipos de Laboratorio

1. Autoclave vertical GEMMY 49L
2. Balanza analítica KERN
3. Balanza OHAUS-SCUOT PRO
4. Balón de Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)
5. Bomba al vacío millipore
6. Cocina eléctrica
7. Cromatografo de gases GC/MS-QP2010
8. Equipo Soxhlet
9. Estufa de secado y esterilización SELECTA CONTERM
10. Flujometro casero
11. Fotobiorreactor tubular acrílico
12. Manómetro WESTERN MEDICA RU CLASS VI
13. Microscopio BOECCO
14. Motor ELITE 802 AIR PUMPS
15. Mufla
16. Refractómetro manual ATAGO N-1alpha
17. Termostato SOBO HS-100

## 3.3 MÉTODOS

### 3.3.1 Obtención de la fuente de *Chlorella sp.*

Se obtuvo la microalga *Chlorella sp.* de un estanque de la Joya- Arequipa por las técnicas de muestreo estandarizadas (Gonzales Benito et al. 2006). Se necesita una muestra homogénea y representativa, y que en la extracción no se modifiquen las

propiedades de la muestra, por lo que la muestra se recogió en un recipiente de vidrio (borosilicato) de 250ml previamente esterilizados, se lavó el recipiente con el medio en que se encuentra, de ahí se pasó a recoger a una profundidad de 20cm, con la boca del envase hacia arriba y ligeramente inclinada. Una vez recogida la muestra el recipiente fue cerrado, evitando así la contaminación con el exterior. (Zambrano, 2012).

### 3.3.2 Aislamiento de *Chlorella sp.*

Para lograr aislar la cepa de la microalga *Chlorella sp.* se realizó en dos fases:

Diluciones seriadas.

Se homogenizó la muestra de agua obtenida, se midió 1ml y se colocó en un tubo de ensayo agregándole 9ml de medio hidropónico al 100%, teniendo la relación de 1:10 siendo esta nuestra muestra inicial.

Se tomó 1ml de la anterior dilución y se colocó en un segundo tubo de ensayo agregándole también 9ml de medio hidropónico, obteniendo la relación 1:100. De ahí se pasó 1ml de la anterior dilución a un tercer tubo agregando 9ml de medio hidropónico, obteniendo una relación de 1:1 000. Después se pasó 1ml de anterior solución a un cuarto tubo agregando 9ml del medio hidropónico, obteniendo la relación de 1:10 000. Y finalmente en un quinto tubo, obteniendo una relación de 1:100 000 para que el cultivo sea limpio y no esté contaminado con bacterias y protozoos. (Ghandi et al, 2012).

Rayado en agar o sembrado.

Se prepararon placas Petri con agar al 2% y medio hidropónico, luego con un asa de kohle se sacó muestras del tubo de ensayo con dilución 1:10 000, donde se sembró por el método de la estría.

Se llevó a incubar de 5 - 7 días a temperatura ambiente y condiciones de luz artificial 2400 lux constante. Se llevó una colonia de muestra al microscopio para observar si el contenido microalgal era uniforme. Esta colonia observada se le llevó a un segundo sembrado para reducir la contaminación y asegurarnos que se obtuvo unidades microalgales de una sola especie.

### A) Obtención del stock primario

Del segundo sembrado en placas, se tomó una colonia de microalgas con el asa de Kohle y se llevó a un tubo falcón de 15ml con medio de cultivo hidropónico al 100%, el cual se dejó en las mismas condiciones que los anteriores, obteniendo así nuestro semillero o stock primario. (Gómez et al. 2012).

### 3.3.3 Obtención y caracterización fisicoquímica del estiércol de vaca

#### A. Obtención del estiércol de vaca

Se obtuvo la muestra de la granja ubicada en la urbanización Simón Bolívar en el Distrito de José Luis Bustamante y Rivero. Se recolectó 5kg de estiércol bovino, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

Tipo de raza de vacas lecheras

La clasificación del ganado del establo lechero:

Terneritas: vaquillas y vaquillonas, vacas en producción de lactación, vacas en seca.

La alimentación de las vacas:

Proteínas, vitaminas, forrajes, concentrados, raciones balanceadas (forraje y concentrado).

Sistema de alimentación:

Interno o “estabulado”: En el establo y las vacas no salen del establo para alimentarse de pastos, el alimento que se les brinda en este sistema es con materia seca (forraje y concentrado), evitando que exista variaciones diarias en su consumo.

Externo o “pastos cultivados”: las vacas salen fuera del establo y se alimentan de pastos cultivados, cada hectárea puede soportar 5 vacas Jersey o 3 Holstein o 3 Brown Swiss. Cuando se usa pastos cultivados de calidad el requerimiento de concentrados es menor, necesiándose también complementar la alimentación con sales minerales.

Manejo sanitario: manejo de la salud animal en control de las enfermedades como: aftosa, carbunco, brucelosis, parasitosis, dístoma hepático, ántrax, botulismo.

Tiempo de defecación

## B. Caracterización fisicoquímica del estiércol de vaca

Humedad

Primero se secó la cápsula hasta obtener un peso constante durante dos horas a 120 °C. Al cabo de ese tiempo se introdujo en un desecador, se enfrió, se pesó hasta un peso constante ( $P_0$ .g).

Se pesó 50 gr, de estiércol, el cual se introdujo en la cápsula previamente pesada sin comprimir el material y se pesó dicha cápsula ( $P_1$ , g), se introdujo la cápsula así preparada en una estufa a 70 a 75 °C. Durante 24 horas con el fin de eliminar toda la humedad de la muestra. Al cabo de ese tiempo se introdujo en un desecador, se enfrió y se pesó hasta un peso constante ( $P_2$ .g). (Zambrano, 2012).

Se calculó el porcentaje de humedad del estiércol.

Gramos de muestra humedad: ( $P_1 - P_0$ )

Gramos de muestra seca: ( $P_2 - P_0$ )

Gramos de agua: ( $P_1 - P_0$ ) - ( $P_2 - P_0$ ) = ( $P_1 - P_2$ )

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{gr.de agua}}{\text{gr.de muestra humedd}} * 100 \quad (1)$$

Ceniza

La cápsula que contenía la muestra secada a 120 °C se quemó con un mechero, se colocó la cápsula así tratada a la mufla durante 4 horas a 800 °C, al cabo de ese tiempo se introdujo en un desecador, se enfrió y se pesó hasta

peso constante ( $P_3$ , g). Se calculó el porcentaje de cenizas del estiércol de vaca. (Zambrano, 2012).

Gramos de ceniza: ( $P_3 - P_0$ )

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{gr.de ceniza}}{\text{gr.de muestra seca}} * 100 \quad (2)$$

Determinación de materia orgánica (Método de Walkley y Black)

Se pesó 0.01 g de muestra y se transfirió a un Erlenmeyer de 250 ml, se agregó 2.5 ml de bicromato de potasio 1.0N, se agregó 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitó enérgicamente durante un minuto y se dejó reposar por 30 minutos. Se agregó 25 ml de agua destilada y 2.5 ml de ácido fosfórico concentrado. Finalmente se añadió 0.5 ml de difenilamina 1.0% y se tituló con la solución de sulfato ferroso 0.5N, hasta que viro de violeta oscuro a verde ( $V_1$ ). Se realizó el mismo procedimiento en un ensayo blanco ( $V_2$ ). (Zambrano, 2012).

$$\% \text{ M. O.} = \frac{(\text{ml de } K_2Cr_2O_7 \cdot N) - (V_1 \cdot N \cdot F)}{\text{peso de muestra en gr.}} \quad (3)$$

Se calculó F (factor de corrección) mediante:

$$F = \frac{5 \cdot 1}{V_2 \cdot 0.5} \quad (4)$$

### 3.3.4 Construcción del biodigestor.

Se construyó un biodigestor aerobio de acuerdo a las necesidades requeridas. La construcción de este fue la siguiente:

Se tomó un recipiente de plástico de 30L de capacidad donde se colocó una llave de salida en la parte inferior. Dentro del recipiente de plástico, en la parte inferior se llenó con guijarros de diferentes tamaños hasta una altura de 7 cm, los grandes

fueron colocados en la parte inferior y los pequeños en la parte superior respectivamente del recipiente de plástico los cuales cumplen la función de un filtro. Se le agrego 20L de agua hervida.

En la tapa de este recipiente de plástico se abrieron dos orificios por los cuales se permitió la entrada de las mangueras que proporcionaron la aireación. Se abrió otros dos orificios para la salida del aire.

En otro recipiente de plástico transparente de 6L de capacidad se perforo su superficie, como una especie de colador, donde se introdujo los 5kg de estiércol de vacas. Este recipiente de plástico se introdujo en el recipiente de plástico de 30L siendo sujetado a la tapa del recipiente de plástico de 30L, evitando que este en contacto con la superficie de los guijarros, en los orificios hechos para la salida del aire. Las mangueras fueron sujetadas al recipiente de plástico perforado. Una vez sellado se pintó de negro para una mayor captación del calor y se conectó el motor para dar aireación.

El biodigestor se dejó funcionando durante 15 días, donde diariamente se fue monitoreando su temperatura a diferentes horas de día: 7:00 am, 11:00 am, 1:00pm, 3:00pm, 5:00pm y 7:00 pm. El pH también fue monitoreado diariamente.

### **3.3.5 Obtención y caracterización del Te de compost**

#### **A. Obtención del Te de compost**

El Te de compost se obtuvo mediante una serie de filtraciones; transcurridos los 15 días en el biodigestor, se procedió a realizar la primera filtración del contenido del biodigestor, con una gasa puesta en la llave de salida del biodigestor; el primer filtrado se pasó a una segunda filtración que se realizó con una bomba al vacío y papel filtro de 100 un. Este segundo filtrado obtenido del Te de compost se pasó a autoclavar en matraces de 2L a 121°C y 1.5 ATM por 15 minutos para su esterilización. (Guerra, 2011).

## B. Caracterización del Te de compost

El Te de compost ya esterilizado se mandó a analizar el NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> y PO<sub>3</sub> en Laboratorios Analíticos del Sur, los cuales evaluaron estos componentes por diferentes métodos como:

ASTM D 3867 - 09 Método de ensayo estándar para nitrato en agua.

ASTM D 3867 - 08 Método de ensayo estándar para nitrito en agua.

Método de ensayos para fosfatos por fotometría.

Método de ensayo de amonio por fotometría en agua.

### 3.3.6 Selección del medio de cultivo y determinación de la cinética de crecimiento de biomasa

La selección del medio se realizó mediante la comparación de la velocidad de crecimiento de las microalgas a diferentes concentraciones del medio de Te de compost y como referencia se usó el medio hidropónico. El Te de compost se llevó a concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 15% mientras que el medio hidropónico fue llevado a concentraciones de 100%, 50% y 15%. (Gómez, 2012).

Primeramente del semillero que se tenía, se extrajo 1 ml de *Chlorella sp.* con medio hidropónico, luego se llevó a 8 Flask, señalando que cinco Flask, tenían concentraciones de 100 %, 75 %, 50 %, 25%, y 15% y fueron enraizados a 10ml con Te de compost. Y tres Flask enraizados a 10ml con concentraciones de 100%, 50% y 15% de medio hidropónico, a todos los medios se le agrego 300 uL. de ampicilina a una concentración de 6.25mg/ml, cuando se inoculo se hizo el conteo para saber la concentración inicial que se tenía, se realizó conteos diarios para determinar la velocidad de crecimiento, los conteos se realizaron en la cámara de Neubauer, los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas:

Iluminación constante.

Al usarse iluminación artificial. Los lux fueron calculados a partir de la siguiente ecuación:

$$E_v(lx) = \frac{P(w) \times n(lm/w)}{A(m^2)} \quad (5)$$

Dónde:

$P$ : Potencia (watts)

$n$ : Eficacia luminosa (lumen/watts)

$A$ : Área iluminada ( $m^2$ )

Temperatura de 25-26°C que se le proporciono por convección con agua con un termostato que estuvo graduado a una temperatura de 28 °C y se agito periódicamente para evitar la sedimentación. (Uribe, citado Gómez, 2012)<sup>16</sup>.

Para calcular la concentración utilizando la cámara de Neubauer se utiliza la siguiente ecuación:

Cuando se utiliza 4 (16) cuadrantes:

$$\frac{cel}{ml} = \frac{C1+C2+C3+C4}{4} * 10000 \quad (6)$$

Cuando se utiliza 5 (25) cuadrantes:

$$\frac{cel}{ml} = \frac{C1+C2+C3+C4+C5}{5} * 25 * 10000 \quad (7)$$

La velocidad de crecimiento de la microalgas fue calculada median la siguiente ecuación:

$$\mu = \log_2 \left( \frac{C_f}{C_o} \right) \quad (8)$$

Dónde:

$\mu$ : Velocidad de crecimiento ( $hrs^{-1}$ )

$C_f$ : Concentración final de microalgas (cel. /ml)

$C_o$ : Concentración inicial (cel. /ml)

$T$ : Intervalo de tiempo que se cuenta (hrs)

Para calcular el tiempo de generación se utilizó la siguiente ecuación:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (9)$$

Dónde:

$g$ : Tiempo de generación (hrs)

$\mu$ : Velocidad de crecimiento ( $\text{hrs}^{-1}$ )

### 3.3.7 Masificación de la cepa *Chlorella sp.*

La masificación y adaptación se dio en una sola etapa; una vez obtenida la curva y velocidad de crecimiento se procedió a la masificación en los medios de Te de compost que dieron un alto rendimiento, de los tubos semilleros que se poseía se inoculó 10ml en frascos de vidrio de 300ml a un volumen de 250 ml de medio de Te de compost a concentraciones de 100%, 75% y 50%; a las cuales se les añadió 700 uL de ampicilina a una concentración de 6.25mg/ml. Se realizaron conteos diarios con la cámara de Neubauer, para calcular la velocidad de crecimiento durante 5 días. En esta primera etapa los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas:

La temperatura se mantuvo entre 25-26°C que se le proporcionó por convección en agua con un termostato que estuvo graduado a una temperatura de 28 °C.

La intensidad luminosa se mantuvo entre 5555,56 – 8695,65 lux mediante el uso de focos LED de 220V y 5 watts.

Se programaron fotoperiodos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

La agitación y la aireación se mantuvieron mediante el uso de un motor ELITE 802 AIR PUMPS, el cual movía los cultivos desde la parte inferior a través de mangueras que ingresaban por la parte superior de los frascos.

### 3.3.8 Diseño y construcción del fotobiorreactor

Se diseñó y se construyó un fotobiorreactor batch (discontinuo) a escala de laboratorio en el cual se determinó sus condiciones de funcionamiento. Debido a que estos sistemas son cerrados, el cultivo de microalgas no interactúa con los gases del medio ambiente evitando su contaminación. Además, se debe introducir en el sistema un medio de cultivo que proporcione todos los nutrientes esenciales para el

crecimiento de microalgas, con el fin de maximizar la producción de biomasa, además incorporan luz blanca y natural y donde las condiciones son más controladas que en los sistemas abiertos. Son sistemas de alto costo pero de un alto rendimiento (Chisti 2007).

**Tabla 3 Parámetros de Diseño del Fotobiorreactor**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Volumen total</b>	L	6,10
<b>Diámetro</b>	cm	11,4
<b>Altura</b>	cm	60
<b>Volumen de operación</b>	L	5,00
<b>Altura de operación</b>	cm	54,7

Fuente: Elaboración propia

Primeramente se seleccionó el material del fotobiorreactor, el material elegido fue el acrílico por su alta transparencia, flexibilidad, durabilidad y baja toxicidad. El cual tuvo una configuración de forma cilíndrica de diámetro pequeño para un mayor contacto del cultivo con la energía lumínica.

El fotobiorreactor fue diseñado para un volumen de operación de 5 litros de medio, en relación a la distribución y control del CO<sub>2</sub> y la aireación, se tuvo una entrada en la parte superior conectada a una manguera de vidrio hasta la parte inferior del fotobiorreactor, el aire entro constantemente mientras que para la inyección de CO<sub>2</sub> se instaló una válvula de cierre y/o apertura de gas junto a un manómetro y un flujo metro. Junto a esta entrada de CO<sub>2</sub> y aire en la parte superior, se tuvieron dos entradas extras de las cuales una funciona para el desfogue de aire y la otra para la toma de muestras. Para el mantenimiento adecuado de la temperatura del fotobiorreactor se puso alrededor de esta una chaqueta de vidrio que fue llenada con agua. La energía luminosa estuvo proporcionada por los focos LED que estuvieron ubicados alrededor de la chaqueta. El diseño realizado se llevó a condiciones óptimas para el cultivo de microalgas en el fotobiorreactor. Los cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4 Condiciones óptimas de Diseño**

<b>Condiciones óptimas de Diseño</b>	<b>Parámetros de Diseño</b>
<b>Ubicación Geográfica</b>	JLB y R – La joya
<b>Cepa</b>	<i>Chlorella sp</i>
<b>Medio de Cultivo</b>	Te de compost (75%)
<b>Volumen de Total</b>	6,00L
<b>Altura</b>	60cm
<b>Fotoperiodos</b>	16 horas de luz
<b>Tipo de Energía</b>	Artificial (Fluorescentes Leds)
<b>Iluminación</b>	2400 lux
<b>Mezcla de gases</b>	CO <sub>2</sub> – O <sub>2</sub>
<b>Temperatura</b>	25 – 26 °C
<b>Agitación</b>	Neumática (bomba de pecera)
<b>Materiales</b>	Acrílico, vidrio y plástico
<b>Control</b>	Termómetro, pH-metro.

Fuente: Elaboración propia

### 3.3.9 Cultivo en un Sistema cerrado – fotobiorreactor tubular

Una vez diseñado y construido el fotobiorreactor, se procedió al cultivo masivo de microalgas dentro del fotobiorreactor, en el cual se inoculo 250ml del cultivo anterior, y se le añadió 4,75L del medio Te de compost al 75%, el cual llevo a un volumen de trabajo de 5L. Al cultivo se le añadió 5ml de ampicilina con una concentración de 6.25mg/ml. Se realizó conteos diarios con la cámara de Neubauer durante 7 días. El fotobiorreactor se mantuvo bajo condiciones controladas de:

La temperatura se mantuvo entre 25-26°C que se le proporciono por convección mediante la chaqueta con un termostato que estuvo graduado a una temperatura de 30 °C. Esta temperatura fue monitoreada por medio de un termómetro

La intensidad luminosa se mantuvo a 2400 lux mediante el uso de focos LED de 220V y 5 watts.

Se programaron fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La agitación y la aireación se mantuvieron mediante la utilización de un motor ELITE 802 AIR PUMPS, el cual movía los cultivos desde la parte inferior.

El pH se mantuvo entre 7-8, el cual fue monitoreado con una cinta de pH.

La inyección de CO<sub>2</sub>, que se llevó a cabo diariamente durante 15 minutos, en el cual se mantuvo controlado la presión a 2 psi y el flujo a 0,6L/min, mediante el uso de un manómetro y un flujómetro.

### **3.3.10 Cosecha de las microalgas**

Transcurridos los 7 días del cultivo en el fotobiorreactor se procedió a la cosecha de microalgas por sedimentación durante 5 horas, en donde las microalgas sedimentaron por efecto de la gravedad. Al término del tiempo establecido se procedió a retirar el sobrenadante con mucho cuidado hasta llegar a la décima parte del volumen de trabajo del fotobiorreactor. El precipitado fue puesto en una pera de decantación de 250ml durante una hora. De donde extrajo la fase formada por las microalgas.

#### **B. Secado de las microalgas**

Se procedió a secar el precipitado de microalgas obtenido, en una estufa SELECTA CONTERM, durante 5 horas a 75°C, donde se obtuvo biomasa microalgal seca la cual se pesó. (Barajas et al, citado Gómez 2012).

### **3.3.11 Extracción de aceites**

#### **A. Extracción de aceites por solvente**

Para la extracción de aceites a partir de biomasa microalgal seca, se usó la extracción solido-liquido utilizando el equipo de Soxhlet, el solvente usado fue el hexano debido a su alta afinidad y baja toxicidad, esta metodología se basa en la acción de separar con un líquido, una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible, mayormente este método es usado en todas las obtenciones de principios activos de los tejidos vegetales. (Núñez, 2008).

La biomasa seca se envolvió en papel filtro y se colocó en el tubo extractor del soxhlet, en el balón del Soxhlet se colocó 150 ml de solvente, y se procedió a

calentar hasta una temperatura de 75°C en un termostato SOBO HS-100 durante 6 horas. (Salazar, 2012).

### C. Separación del solvente y aceite por destilación

Se procedió a separar el aceite del solvente mediante la destilación, la cual se realizó llevando el producto del Soxhlet (hexano + aceite), a una temperatura de 75°C, donde quedo como producto final el aceite y el solvente separados. (Salazar, 2012).

#### 3.3.12 Análisis de aceites

##### A. Determinación del índice de iodo

Para determinar el índice de iodo se puso 10mL de cloroformo dentro de un matraz iodométrico de 250 mL a la cual se les agrego 80uL del aceite obtenido y se agito, seguidamente se puso con una pipeta 10ml del reactivo de Wijs en el matraz que contiene la muestra y con movimientos circulares se aseguró la homogenización. Se preparó un blanco; se guardó ambos matraces sin presencia de luz durante 30 minutos a una temperatura de 20°C, una vez que transcurrió ese tiempo se adiciono 5ml de KI 15% , se mezcló y en seguida se añadió 100ml de agua destilada hervida lavando la tapa. Toda la solución obtenida se tituló con Tiosulfato de Sodio el cual se adiciono gradualmente con agitación contante y vigorosa, se continuo con la titulación hasta que el color amarillo casi desapareció, se adiciono 1 ml de solución indicadora de almidón 1% y se prosiguió la titulación hasta la desaparición del color.

Se calculó el índice de iodo mediante la siguiente ecuación:

$$I = \frac{(V_t - V_m) * N * 12,69}{G} \quad (10)$$

En donde:

$I$ : Índice de Iodo

$V_t$  : Volumen de solución de Tiosulfato de Sodio gastado en la titulación del blanco (ml)

$V_m$  : Volumen de solución de Tiosulfato de Sodio gastado en la titulación de la muestra (ml)

$N$ : Normalidad de la solución del Tiosulfato de Sodio

12,69: Equivalente del iodo

$G$ : Masa de la muestra en gramos

### B. Rendimiento de Aceites

Para la obtención del rendimiento de aceites, se usó los siguientes datos:

$m$ : Peso de la muestra seca (gr)

$m_1$ : Peso del picnómetro vacío (gr)

$m_2$ : Peso del picnómetro con el aceite extraído (gr)

Se calculó el porcentaje de los aceites en la muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Aceites} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (11)$$

#### 3.3.13 Caracterización de ácidos grasos

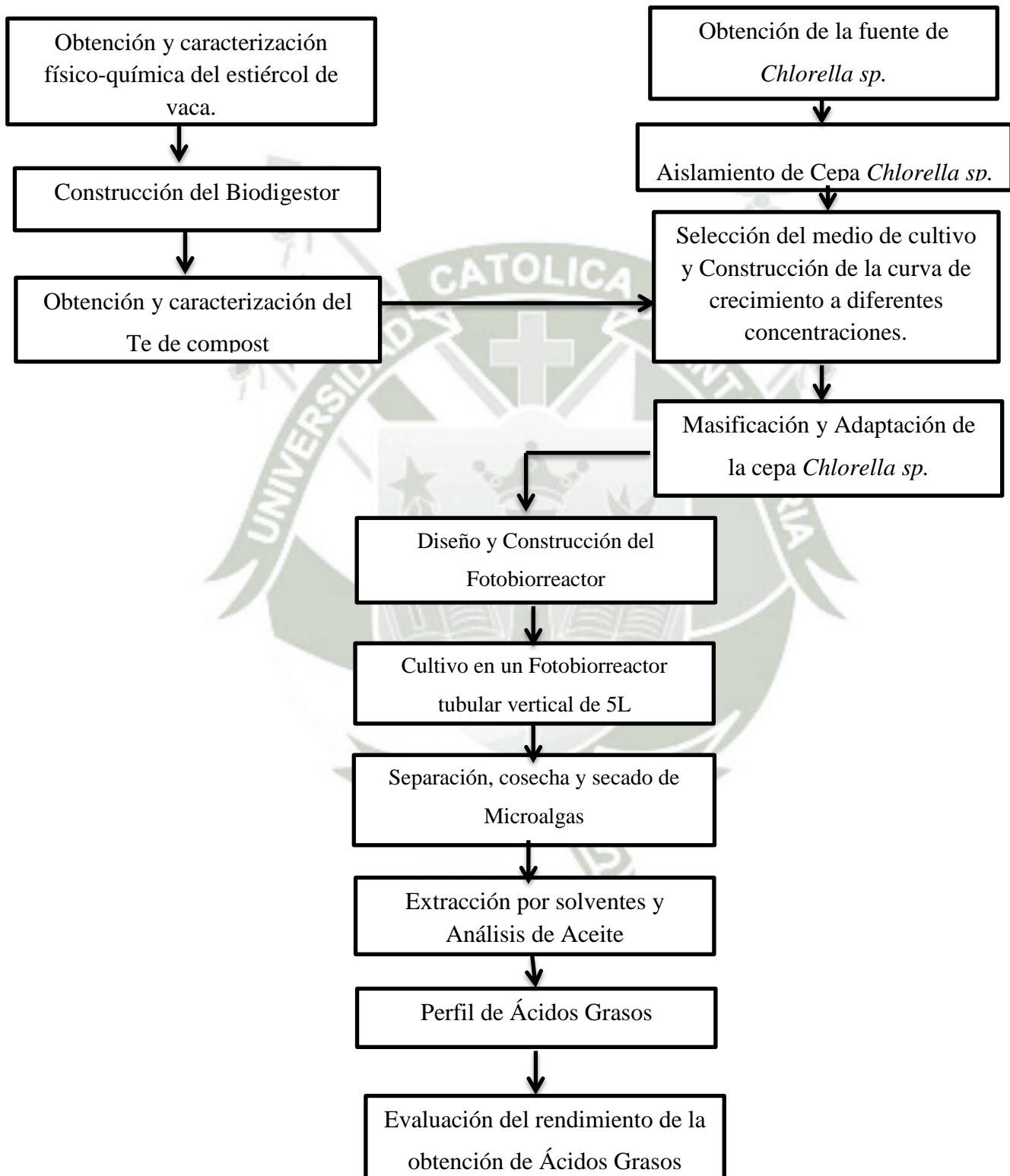
El aceite obtenido se mandó a analizar al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, realizándose un análisis cualitativo y cuantitativo del perfil de ácidos grasos; mediante el Método cromatográfico con detección FID.

#### 3.3.14 Análisis Estadístico

Se evaluaron los resultados obtenidos de la concentración celular y de la velocidad de crecimiento, mediante Estadística Descriptiva de Microsoft Excel 2010.

### 3.4 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES

**“OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS A PARTIR DE *Chlorella sp.* UTILIZANDO UN FOTOBIORREACTOR (FBR) CON SUSTRATO NO CONVENCIONAL BASE DE ESTIÉRCOL DE VACA”**



## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Obtención y aislamiento de *Chlorella sp.*

Se llegó a obtener la muestra en dos frascos cada uno de 200ml, de la laguna de oxidación ubicada en el distrito de La Joya, en el sector de Río Seco, debido a que la presencia de microalgas en la laguna de oxidación era escasa, se muestreo en dos partes diferentes de la laguna donde se vio la posible presencia de microalgas, lo cual dificultó el proceso de obtención de muestra.



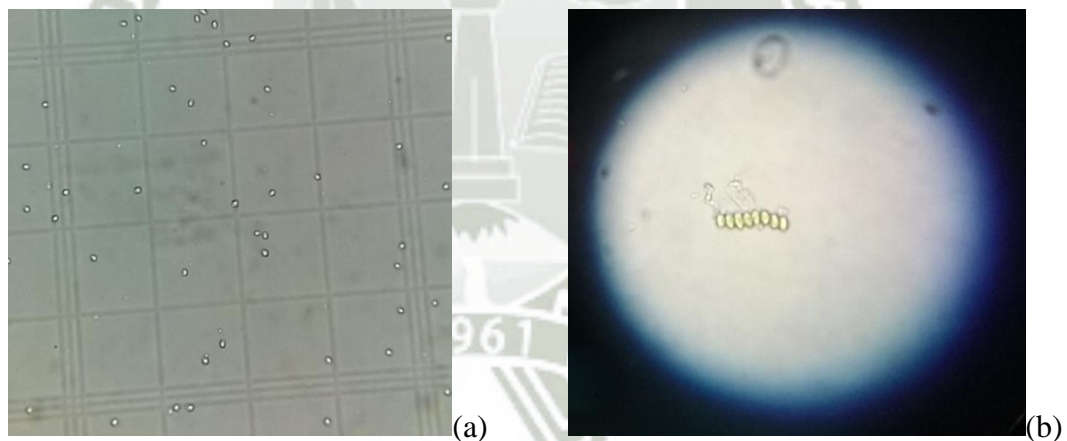
**Figura 7 Laguna de oxidación de La Joya – Sector Río Seco**

Dado que se obtuvo dos muestras de la laguna de oxidación se realizó dos baterías de tubos (A y B) de diluciones seriadas hasta 1/100000, las baterías (A y B) fueron dejadas a condiciones óptimas como luz (artificial) a 2400 lux y temperatura natural para su crecimiento; la batería “B” mostró crecimiento a los 14 días en una dilución de 1/10000 sin contaminación, mientras que la batería “A” mostró crecimiento escaso en la dilución de 1/1000 pero esta se encontró contaminada con protozoos y bacterias.



**Figura 8** Batería “B” de diluciones seriadas

De la primera placa que se obtuvo a partir de la dilución de 1/10000 de la batería “B” se obtuvieron colonias microalgales no puras, vistas al microscopio se encontró tanto *Chlorella sp* como *Scenedesmus sp.*, de donde se aisló la colonia de *Chlorella* para la segunda placa y se obtuvo un cultivo puro de *Chlorella sp*.



**Figura 9** Microalgas aisladas: (a) *Chlorella sp.* (b) *Scenedesmus sp.*

En esta primera etapa no se realizaron fotoperiodos debido a que la reproducción asexual (división) ocurre durante el periodo de luz y éste es acelerado bajo iluminación continua.

## 4.2 Caracterización del estiércol de vaca

### 4.2.1 Calidad del estiércol de vaca

Para evaluar la calidad del estiércol de vaca se toman en cuenta diferentes consideraciones que pueden afectar su calidad y así la calidad del Te de Compost. Estas consideraciones fueron:

Tipo de raza de vacas lecheras: Raza Holstein u holandesas, son una raza de vacas lecheras más difundidas en el mundo.

Terneritas: Vacas en producción de lactación, estas vacas tenían más de un parto, se encontraban de los 60 a 90 días posteriores al parto, donde tenían un alto rendimiento de leche de 10L a 12L por día.

La alimentación de las vacas: Las vacas de establo estaban alimentadas con forrajes de partes vegetativas de zanahoria y con plantas frescas como la alfalfa.

Sistema de alimentación:

Extensivo o “pastos cultivados”: las vacas son alimentadas en campos abiertos durante el día, desde las 7 de la mañana hasta las 4 de la tarde

Manejo sanitario: manejo de la salud animal en control de las enfermedades como: Las vacas lecheras estuvieron vacunadas contra la brucelosis, ya que anualmente estas pasan por un control contra esta enfermedad.

Tiempo de defecación: Se recogió el primer estiércol del día, pasada las 4 horas.

### 4.2.2 Caracterización fisicoquímica del estiércol de vaca

Las características fisicoquímicas fueron calculadas mediante el contenido de humedad, ceniza y determinación de materia orgánica que se muestra a continuación:

**Tabla 5** Valores en porcentaje de características fisicoquímicas del estiércol de vaca

Ensayo	Humedad (%)	Ceniza (%)	Materia Orgánica (%)
1	72,75	5,38	4,6
2	72,8	6,01	4,78
3	72,19	5,56	4,58
<b>PROMEDIO</b>	72,58	5.65	4.65

Fuente: Elaboración propia

De los resultados obtenidos, el bajo porcentaje de materia orgánica y el alto porcentaje de humedad, se debe principalmente a la pobre alimentación que reciben las vacas.

### 4.3 Construcción del biodigestor y análisis del Te de compost

#### 4.3.1 Construcción del biodigestor

Se realizó la construcción del biodigestor siguiendo el método descrito, los recipiente de plástico fueron ubicados en la zona de trabajo, el recipiente de plástico pequeño con estiércol se introdujo en el biodigestor, cuando este se encontraba con las piedras y los 20L de agua, una vez introducido, la tapa fue sellada, para dar inicio a su funcionamiento.



**Figura 10** Material utilizado para el biodigestor.



**Figura 11 Biodigester aeróbico construido, vista exterior.**

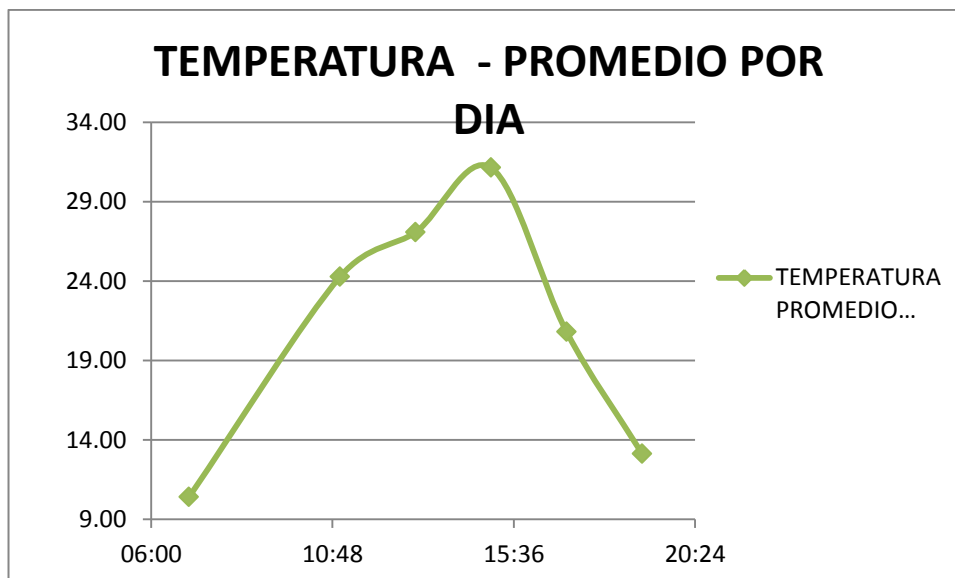
#### 4.3.2 Monitoreo de la temperatura del biodigester

Se monitoreo la temperatura del biodigester diariamente a diferentes horas del día, la cual se muestra a continuación:

**Tabla 6 Temperatura promedio diaria del biodigester**

<b>Hora</b>	<b>PROMEDIO POR DIA</b>
07:00	10.40
11:00	24.27
13:00	27.07
15:00	31.13
17:00	20.80
19:00	13.13

Fuente: Elaboración propia



**Figura 12** Temperatura promedio diaria del biodigester

La máxima temperatura alcanzada por el biodigester fue en un promedio de 31°C donde se puede decir que solo existió una descomposición mesofílica el cual produce una degradación de azúcares y aminoácidos por la acción de bacterias como *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrobacter*, mas no por la acción de hongos del grupo de actinomicetos.

#### 4.3.3 Análisis de sales de interés del Te de Compost

El volumen de Te de compost obtenido a partir del biodigester, fue de 14 litros, donde el Te de compost se filtró y se autoclavó (esterilizo), así se obtuvo un Te de compost de color café claro, libre de sólidos.



**Figura 13** Filtración del Te de Compost

El Te de compost fue analizado para nitratos, nitritos, fosfatos y amonio, por ser estas, sales de interés para el crecimiento de las microalgas. El cual fue analizado en los Laboratorios Analíticos del Sur, obteniendo los siguientes resultados

**Tabla 7 Concentración de sales del Te de Compost**

<b>Iones</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
<b>NO<sub>3</sub></b>	4.0
<b>NO<sub>2</sub></b>	0.356
<b>PO<sub>4</sub></b>	3.96
<b>NH<sub>4</sub></b>	20.5

Fuente: Elaboración propia

La descomposición del estiércol de vaca proporciona varias fuentes de nitrógeno como amonio, nitratos y nitritos y fósforo como fosfatos que son principales nutrientes en el crecimiento de microalgas, este proceso se lleva a cabo principalmente por la actividad de las bacterias nitrificantes quimioautótrofas. Algunas de éstas oxidan los iones de amonio en presencia de agua a nitritos y otras oxidan los nitritos y nitratos, obteniéndose un producto rico en sales asimilables para las microalgas (Granados et al, 1983).

Como cada proceso de degradación tiene una bacteria específica que oxida a un ión particular, el alto contenido de amonio presente en los análisis, probablemente se deba a la poca cantidad de bacterias nitrificantes (Spotte, citado Granados 1983) que oxidan este ión, repercutiendo al final del proceso en la concentración de nitratos. En los análisis de amonio del medio de cultivo experimentado, se encontró una concentración de 20.5 mg/L. Los estudios realizados por Treboux (1904); Prindsheim (1912); Schreiber (1927) y Brasurd y Foyne (1930), así como los de Allison (1931); Miller (1933); mencionados por Chu, (1943), demuestran que el amonio puede ser utilizado en forma similar al nitrato y que algunas veces las microalgas crecen mejor en su presencia. El amonio como fuente de nitrógeno de muchas algas, ha sido estudiado también por Guillard (1963); Eppley y Roger (1970), quienes indican que la utilización de este compuesto en su forma de amonio no es tan fácil de asimilarlo como es el caso de los nitratos.

La concentración de nitratos 4mg/L de nuestro de medio se mostró deficiente frente al medio control 180g/L, la concentración de fosfatos 3,96mg/L también fue deficiente en comparación con el medio control 36g/L. el cual puede ser debido a la alimentación de las vacas la cual cubren sus necesidades de fosforo con las proteínas de las plantas.

#### 4.4 Cultivos de microalgas

##### 4.4.1 Selección del medio de cultivo y cinética de crecimiento

Para la selección de la concentración adecuada del medio de cultivo y para observar la cinética de crecimiento de la cepa de *Chlorella sp.* se realizó la inoculación a diferentes concentraciones del nuevo medio a base de Te de compost (15%, 25%, 50%, 75%, 100%).

**Tabla 8 Concentración de la cepa *Chlorella sp.* en medio de cultivo a base de Te de Compost – 10ml**

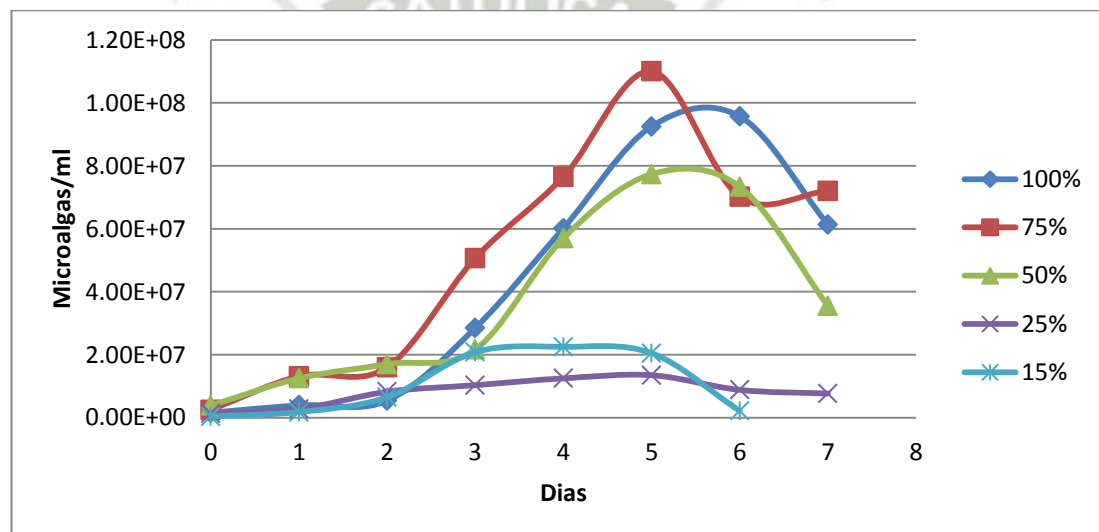
<i>Días</i>	<b>Concentración(Microalgas/ml)x10<sup>7</sup> – Te de Compost</b>				
	<b>100%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>15%</b>
<b>0</b>	0,16	0,25	0,39	0,14	0,04
<b>1</b>	0,40	1,32	1,25	0,28	0,18
<b>2</b>	0,54	1,60	1,70	0,83	0,65
<b>3</b>	2,85	5,07	2,17	1,03	2,08
<b>4</b>	6,02	7,65	5,70	1,25	2,25
<b>5</b>	9,25	11,00	7,73	1,35	2,05
<b>6</b>	9,57	7,02	7,33	0,88	0,21
<b>7</b>	6,13	7,20	3,55	0,77	
<b>Media</b>	4,36±3,91	5,14±3,77	3,73±2,85	0,82±0,42	1,07±1,01

Fuente: Elaboración propia

Como observamos en la Tabla N° 8 la concentración de la población de microalgas varia frente a las diferentes concentraciones del medio Te de Compost. Se puede ver que el medio de cultivo a una concentración de 75% fue el adecuado para el crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* (1,10 x 10<sup>8</sup> microalgas/ml) en comparación con las otras concentraciones de 100%, 50%, 25%, 15%. Esto es debido a que en

comparación con el medio al 100%, los nutrientes no se encuentran fácilmente digeribles para la microalga, donde al ver un exceso de nutrientes disminuye la concentración de la microalga. Sin embargo, para la concentración del medio al 50%, los nutrientes se encuentran escasos pero se da un crecimiento. A las concentraciones de 25% y 15% los nutrientes se encuentran en un déficit total, por lo que la concentración de las microalgas disminuye notoriamente.

Según los resultados de esta experimentación podemos darnos cuenta que el exceso y el déficit de nutrientes no favorecen a la concentración poblacional de las microalgas. La concentración tiene que ser la adecuada donde la microalga tenga los nutrientes en forma asimilable para que la población sea mayor.



**Figura 14** Curvas de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de medio Te de Compost – 10ml

En la figura 14, podemos observar las curvas de crecimiento de *Chlorella sp.* en Medio de Te de compost (TE) a concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 15%. Se puede observar el comportamiento de *Chlorella sp.* frente a estas concentraciones, donde el punto más alto de crecimiento lo tiene a una concentración de 75% en 5 días, mientras que las otras concentraciones de 100% y 50% su cinética de crecimiento es similar pero con una baja población microalgas. Por el contrario a concentraciones de 25% y 15% la cinética de crecimiento es distinta y con una baja población de microalgas.

Según la curva de crecimiento que se observa, los días que se encontrara en cultivo serán de 5 días. En trabajos anteriores realizados se observa que la curva de crecimiento demora alrededor de 29- 40 días para llegar a la fase de muerte, en medios convencionales. Entonces el medio utilizado en el presente trabajo acelera este proceso, donde se tiene una fase estacionara casi inexistente.

Como se puede observar en la figura 14 la cepa de *Chlorella sp.* se comporta de manera similar a concentraciones de 100%, 75% y 50%, por lo que tomaremos en cuenta a esas tres concentraciones para llevarlos a la etapa de masificación. Siendo desde ahora que, a una concentración de 75% de medio TE la cepa de *Chlorella sp.* Presenta mayor densidad poblacional.

**Tabla 9 Velocidad de Crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* en medio de cultivo a base de Te de Compost – 10ml**

<i>Días</i>	Velocidad de Crecimiento ( $\mu^{-1}$ ) x $10^{-2}$				
	100%	75%	50%	25%	15%
<b>1</b>	5,55	12,6	7,03	4,10	9,20
<b>2</b>	1,90	1,17	1,85	6,53	7,69
<b>3</b>	9,96	6,93	1,46	1,35	7,00
<b>4</b>	4,49	2,48	5,81	1,14	0,46
<b>5</b>	2,59	2,18	1,83	0,46	-0,56
<b>Media</b>	4,90±3,18	<b>5,07±4,75</b>	3,60±2,62	2,72±2,54	4,76±4,48

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N° 9 se puede observar la velocidad de crecimiento en las diferentes concentraciones. Donde a una concentración de 75% en medio Te de compost se tiene una mayor velocidad de crecimiento ( $0,051 \mu^{-1}$ ).

El medio al ser a base de Te de compost, se corría el riesgo de que el amonio presente origine un efecto limitante para el crecimiento de las microalgas, observando tanto la densidad poblacional y la velocidad de crecimiento, se pudo descartar este efecto contrario.

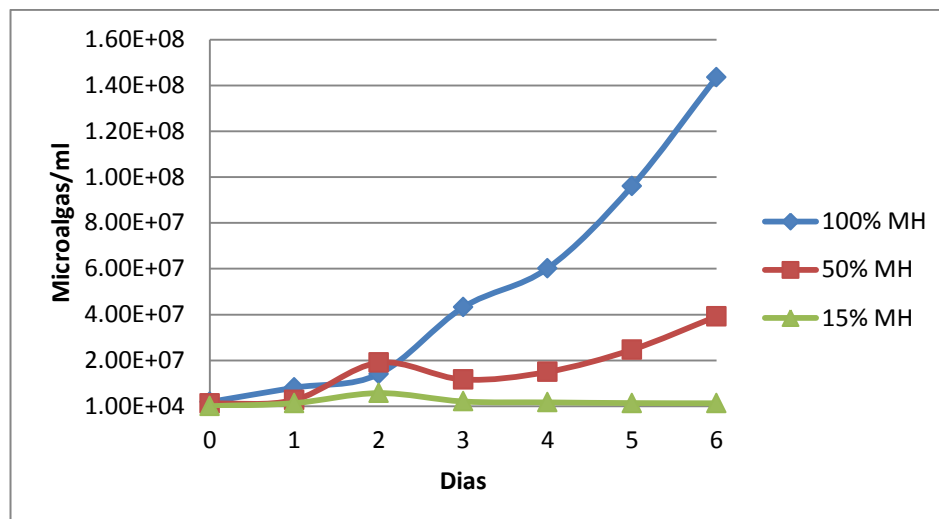
Por otro lado, se realizó también la curva de la cinética de crecimiento en Medio de cultivo Hidropónico a concentraciones de 100%, 50% y 15% para poder comparar con el nuevo medio de compost.

**Tabla 10 Concentración de la cepa *Chlorella sp.* en Medio de cultivo Hidropónico.**

<i>Días</i>	<b>Concentración (Microalgas/ml)</b>		
	<b>Medio Hidropónico x 10<sup>7</sup></b>		
	<b>100%</b>	<b>50%</b>	<b>15%</b>
<b>0</b>	0,19	0,11	0,004
<b>1</b>	0,81	0,27	0,14
<b>2</b>	1,40	1,90	0,57
<b>3</b>	4,32	1,17	0,21
<b>4</b>	6,02	1,50	0,17
<b>5</b>	9,60	2,47	0,14
<b>6</b>	14,4	3,92	0,13
<b>Media</b>	5,25±5,23	1,62±1,32	0,19±0,18

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la tabla N° 10, la mayor concentración de microalgas se da cuando el medio Hidropónico se encuentra al 100% ( $1,44 \times 10^8$  microalgas/ml). De acuerdo a este resultado podemos comparar con el resultado obtenido para el medio de cultivo TE, donde a una concentración de 75% se obtuvo  $1,10 \times 10^8$  microalgas/ml. Donde podríamos deducir que el medio de cultivo al 75% de TE y el medio de cultivo hidropónico al 100% son los adecuados para el óptimo crecimiento de la cepa de *Chlorella sp.*



**Figura 15** Curvas de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de medio Hidropónico

Como se puede observar en la figura 15 la cinética de crecimiento en el medio Hidropónico es diferente al del medio TE, y se toma más días en su crecimiento hasta llegar a su fase estacionaria. Tomamos este medio Hidropónico como referencia en trabajos anteriores, donde comprobamos que el nuevo medio a base de Te de Compost, es posible usarlo como una alternativa para el cultivo de microalgas.

**Tabla 11** Concentración y velocidad de crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* en Medio de cultivo Hidropónico

	100%	50%	15%
<b>Concentración inicial (cel./ml)</b>	0,19	0,11	0,004
<b>Concentración final (cel./ml)</b>	14,4	3,92	0,13
<b>Velocidad de Crecimiento (<math>\mu^{-1}</math>)</b>	0,04±0,03	0,35±0,04	0,15±0,09

Fuente: Elaboración propia

Si observamos la velocidad de crecimiento en el medio hidropónico (Tabla N°11) y la comparamos con la velocidad en el medio de Te de Compost (Tabla N° 9), es posible afirmar que el medio Te de compost se comporta de similar manera que un medio convencional para microalgas.

#### 4.4.2 Masificación de la cepa y cinética de crecimiento

Para la masificación se realizaron cultivos a un volumen de 240ml y con las concentraciones de 100%, 75% y 50% para poder observar su comportamiento y confirmar su cinética de crecimiento.



Figura 16 Adaptación y masificación en un volumen de 240ml a los 3 días.

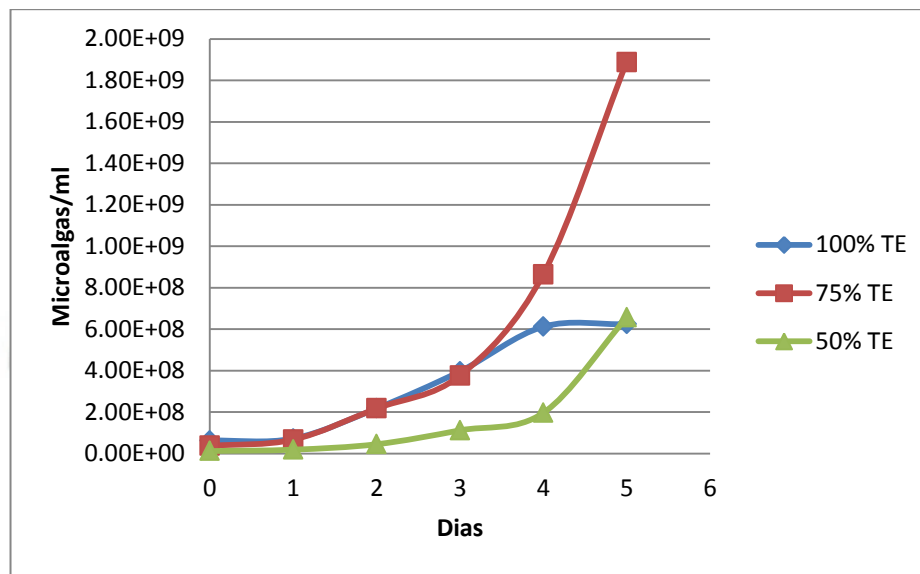
Tabla 12 Concentración de la cepa *Chlorella sp.* en Medio de cultivo a base de Te de Compost – 240ml

Días	Concentración (Microalgas/ml)		
	Te de Compost ( $\times 10^8$ )		
	100%	75%	50%
0	0,63	0,37	0,12
1	0,72	0,67	0,19
2	2,18	2,18	0,45
3	3,96	3,76	1,12
4	6,12	8,64	1,96
5	6,24	18,9	6,56
<b>Media</b>	<b>3,31±2,53</b>	<b>5,75±7,11</b>	<b>1,73±2,46</b>

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en la Tabla N°12 la población de microalgas a una concentración del 75% supera a las otras dos concentraciones, siendo esta la más adecuada para el crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* Se realizó este segundo ensayo para que la cepa pueda adaptarse al nuevo volumen y verificar que la concentración

al 75% de Te de compost es el adecuado para el crecimiento de las microalgas obteniéndose una concentración de  $1,89 \times 10^9$  microalgas/ml, también se pudo observar que a pesar de que la concentración inicial de microalgas a una concentración del 100% de Te de compost no es la adecuada, debido a que su concentración final fue menor.



**Figura 17** Curvas de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de medio Te de Compost – 240ml

En la figura 17, se puede observar la diferencia en los crecimientos a concentraciones distintas. La cinética de crecimiento es mucho mayor con respecto al medio al 75% de Te de compost. Las concentraciones de 100% y 50% presentaron una cinética de crecimiento menor, donde ya se observaba el inicio de su fase estacionaria.

En esta etapa se puede afirmar que el medio adecuado para la producción de microalgas es al 75% de Te de compost. Por lo que se utilizara esta concentración en fotobiorreactor para un buen crecimiento y una buena producción de aceites.

**Tabla 13 Velocidad de Crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* en Medio de cultivo a base de Te de Compost – 240ml**

<i>Días</i>	<b>Velocidad de Crecimiento(<math>\mu^{-1}</math>) x10<sup>-2</sup></b>		
	<b>100%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>
<b>1</b>	8,38	3,52	2,60
<b>2</b>	6,63	7,06	5,25
<b>3</b>	3,60	3,29	5,26
<b>4</b>	2,62	5,00	3,46
<b>5</b>	0,12	4,70	3,98
<b>Media</b>	4,27±3,27	<b>4,71±1,50</b>	4,11±1,16

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 13 se confirma que la velocidad de crecimiento a un medio de concentración al 75% Te de compost ( $0,047 \mu^{-1}$ ) velocidad aún resulta ser mayor que en las demás concentraciones.

La velocidad de crecimiento que experimenta la cepa de *Chlorella sp* del presente trabajo, es superior en comparación con otros trabajos realizados. Por ejemplo, en trabajos tales como el de Dragone, se realizan cultivos a concentraciones de CO<sub>2</sub> diferentes, se sabe que la concentración de CO<sub>2</sub> favorece el crecimiento celular. De acuerdo a sus datos se tiene que la cepa de *Chlorella vulgaris* presenta una velocidad de  $0,0293 \text{ h}^{-1}$  en comparación con nuestra cepa de *Chlorella sp.* que presenta  $0,0471 \text{ h}^{-1}$ , presentando casi el doble de la velocidad a un volumen superior y el número de días es similar. Se podría inferir que el medio usado en el presente trabajo favorece a la velocidad de crecimiento de las microalgas.

#### **4.4.5 Diseño y construcción del Fotobiorreactor**

La construcción del fotobiorreactor se realizó de acuerdo a los parámetros de diseño establecidos en la Tabla 3 para cumplir con las condiciones de la Tabla 4.



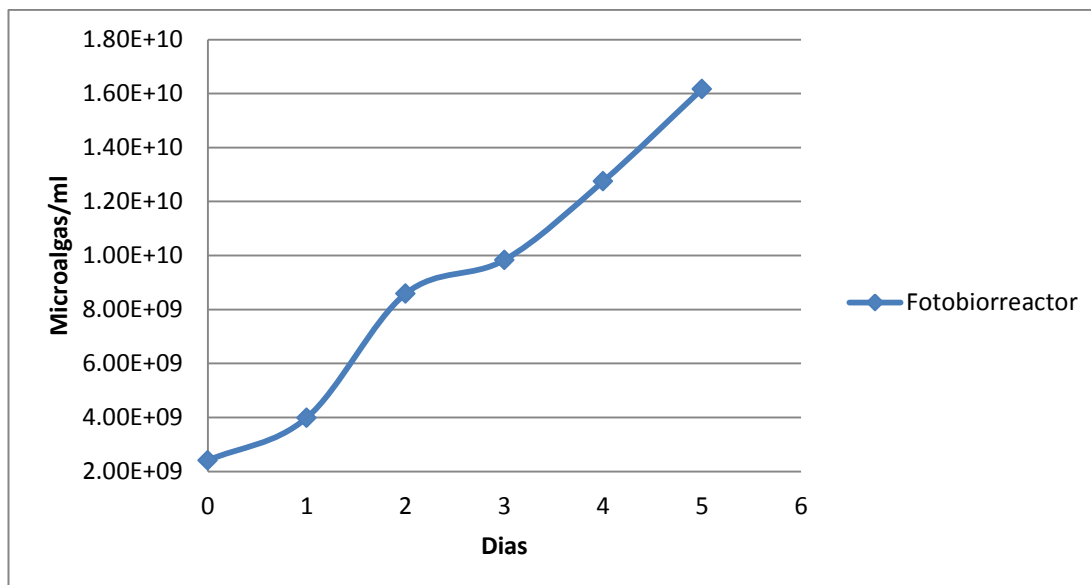
**Figura 18 Construcción del fotobiorreactor.**



**Figura 19 Sistema completo del fotobiorreactor**

#### **4.4.6 Cultivo en el fotobiorreactor**

En esta etapa las condiciones del medio de cultivo están totalmente monitoreadas. En el fotobiorreactor tenemos un volumen de 5L donde fue inoculado 500ml de la cepa a una concentración de 75% del medio Te de compost. En esta etapa se ha aumentado uno de los requisitos necesarios para el crecimiento microalgal, la presencia de CO<sub>2</sub>.



**Figura 20** Curva de crecimiento de *Chlorella sp.* en medio Te de Compost en un Fotobiorreactor.

Como se observa en la figura 20 vemos la curva de crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* que se encontró en el fotobiorreactor por solo 5 días, esto es debido a que como se estuvo observando en la masificación, la cinética de crecimiento en el medio Te de compost es mayor que con otros medios convencionales modificados para la producción de ácidos grasos. Estudios realizados con medios convencionales una cepa de *Chlorella sp.* demora en crecer alrededor de unos 40 días para tener un porcentaje de concentración de 23,7 % de ácidos grasos poliinsaturados, donde nuestra cepa de *Chlorella sp.* demora 5 días y presenta un porcentaje de concentración de 42%.

**Tabla 14** Densidad poblacional y velocidad de Crecimiento de la cepa *Chlorella sp.* en Medio de cultivo a base de Te de Compost en el Fotobiorreactor.

	Concentración del Medio TE- microalgas/ml
Concentración inicial (cel./ml) $\times 10^9$	2,41
Concentración final (cel./ml) $\times 10^9$	16,2
Velocidad de Crecimiento ( $\mu^{-1}$ )	0,023 $\pm$ 0,01

Fuente: Elaboración propia

Según la Tabla N°14 se ve la concentración inicial y final de las microalgas, como vemos la densidad microalgal aumenta, sin embargo la velocidad de crecimiento ha disminuido, esto es posible, debido a que al presentar un diámetro mayor, se presentan fases de oscuridad, disminuyendo así la velocidad de crecimiento. Esto no altera la producción del fotobiorreactor, ya que la concentración ha aumentado.

En el cultivo de microalgas se pudo observar que hay condiciones necesarias para su producción.

Primero, la temperatura a la que se debe encontrar el cultivo. Si la temperatura es menor a su temperatura ideal, la velocidad de crecimiento será mínima, demorando en su crecimiento. Por el contrario, si la temperatura es mayor, el cultivo morirá, debido al exceso de calor.

Segundo, la iluminación a la que se encuentra. Si no presenta iluminación, el cultivo difícilmente crecerá. Si la iluminación es natural, tenemos que tener en cuenta que la luz solar de acuerdo a la zona donde se está produciendo debe ser la correcta, si esta iluminación es mayor, se debe implementar herramientas para proteger el cultivo. Sin embargo, si la iluminación viene a ser artificial, como la utilizada en el presente trabajo, es mucho más fácil poder controlar la correcta iluminación para el cultivo.

Tercero, el pH al que se encuentra el medio de cultivo. El pH tiene que estar estable para evitar la muerte de la población y evitar la contaminación. Si el pH disminuía, el cultivo se contaminaba con otros microorganismos, protozoos y bacterias, que evitan el crecimiento de la población, ya que los protozoos se alimentan de las microalgas, y esto favorece a su reproducción. Las bacterias, se eliminan con el antibiótico de manera sencilla, sin embargo una contaminación por protozoos, difícilmente es recuperable.

#### **4.5 Aceite a partir de microalgas**

##### **4.5.1 Cosecha de microalgas**

La cosecha de microalgas se realizó por gravedad, en dos etapas la primera en beakers la segunda en una pera de decantación, por obteniendo 25ml de biomasa en un medio acuoso. El cual posteriormente se secó.



**Figura 21 Cosecha de microalgas por gravedad**



**Figura 22 Biomasa fresca de Chlorella sp.**

#### **4.5.2 Extracción de aceites**

La biomasa seca de microalgas obtenida fue de 1.776 gr. El cual se puso a un proceso de extracción sólido-líquido, en el que se obtuvo 0.391gr de aceite crudo, el porcentaje de rendimiento del aceite obtenido a partir de biomasa seca, calculada de acuerdo a la ecuación dada fue del 22,03%, este resultado nos muestra un rendimiento entre valores normales, los cuales son obtenidos con medios convencionales.

En la siguiente tabla podemos comparar el rendimiento lipídico de nuestra *Chlorella sp.* Con otra microalga como es la *Dunaliella salina* y también con otros aceites vegetales.

**Tabla 15 Cuadro de comparación de la *Chlorella sp.* con otras fuentes lipídicas**

Aceite	Contenido de Lípidos (%)
<i>Chlorella sp.</i> *	22,03
<i>Dunaliella salina</i>	23.48
<b>Algodón</b>	15 – 24
<b>Soya</b>	18 – 20
<b>Oliva</b>	15 - 40

Es posible comparar el contenido lipídico de nuestra *Chlorella sp.* con los aceites vegetales extraídos a partir del algodón, soya y oliva que son los más comerciales, donde el rendimiento es similar al nuestro.



**Figura 23 Aceite crudo obtenido a partir de microalgas**

#### 4.5.3 Análisis del aceite

##### A) Índice de Iodo

El índice de Iodo que nos muestra el índice de insaturaciones, fue medido por el método de Wijs, el cual fue calculado por la ecuación

$$I = \frac{(Vt - Vm) * N * 12.69}{G}$$

El volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación del blanco ( $V_t$ ) fue de 57,9ml. El volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra ( $V_m$ ) fue de 47,7ml. La normalidad del tiosulfato ( $N$ ) fue de 0.07N. Los gramos de muestra ( $G$ ) fue de 0,068gr. Siendo 12.69 el equivalente de yodo.

El índice de iodo obtenido fue de 133.245, lo cual nos reportó un índice de iodo alto que se debe al gran número de insaturaciones que posee el aceite. En trabajos anteriores tenemos que el índice de yodo de *Chlorella sp* registro 126.796; y otra cepa de *Dunaliella salina* 164, 35, indicando esta última; un mayor contenido de saturación que *Chlorella*. Encontrándonos en un rango aceptable. En comparación con otros vegetales tenemos que nuestro índice de yodo es similar al aceite de maíz que va de 105 a 135, al aceite de pepita de uva que va de 128 a 150.

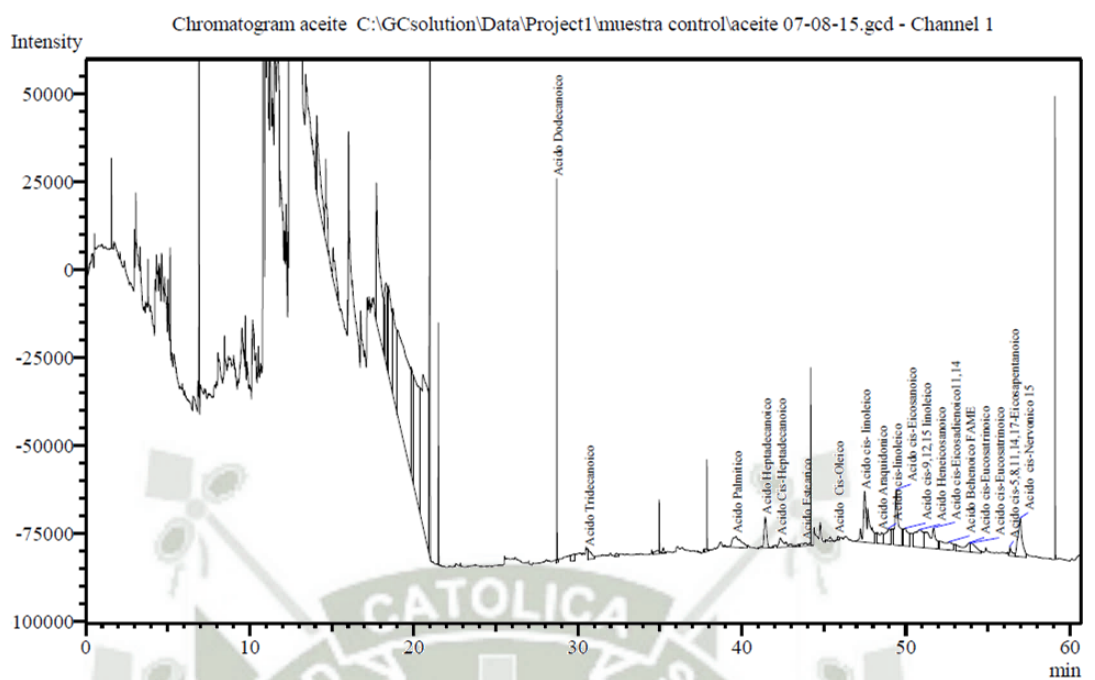
Según el índice de yodo es posible el uso de este tipo de aceite como materia prima para biodiesel. También podemos inferir que al tener mayor proporción de dobles enlaces es que se supone que haya una mayor tendencia a la oxidación, es por eso que este tipo de aceite ha de ser conservada a condiciones de almacenamiento óptimo.

Los análisis obtenidos de características fisicoquímicas del aceite nos mostraron, que el aceite a partir de microalgas obtenido si cumple con los parámetros normales de una aceite crudo ya reportados anteriormente.

#### **4.5.4. Perfil de ácidos grasos**

Las concentraciones de ácidos grasos en el aceite obtenido a partir de la biomasa de *Chlorella sp.*, cultivadas en un medio no convencional – Te de Compost, fueron analizadas por cromatografía de gases/ FID (detector de ionización de llama) en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

En la figura 24, Se muestra el cromatograma que es una gráfica de tiempos de retención con respecto a la señal del detector, el análisis del cromatograma nos suministró la identidad a partir de estándares conocidos de ácidos grasos y la cantidad a partir del área y altura de los picos.



**Figura 24 Cromatograma del Perfil de Ácidos Grasos**

Se puede observar diferentes picos, cada pico indica la presencia de un ácido graso y al unirse con la base estos forman un área que nos indica la concentración del ácido graso en la muestra, podemos observar que los picos del ácido cis 9, 12,15 linoleico el ácido araquidónico no se encuentran bien definidos lo cual puede haber llevado a un error de medición, pero también cabe resaltar el detector de ionización posee una elevada sensibilidad (de orden de  $10^{-13}$  g/s).

En la Tabla 17 se muestra la relación de los ácidos grasos saturados que se caracterizaron, el cual presenta altos niveles de ácido araquidico. Estos ácidos son de menor importancia debido a que sus fuentes de obtención son extensas, como los aceites de origen animal y vegetal, los cuales presentan una concentración mayor a las encontradas en el presente trabajo, la mayoría de estos ácidos grasos como el ácido araquidico, ácido margárico, palmítico, esteárico y behénico son perjudiciales para la salud debido a que estos suben el colesterol por la formación de triglicéridos.

**Tabla 16 Perfil de Ácidos grasos saturados presentes en aceite de microalgas**

Nombre común Ácido graso	Carbonos	Nombre en nomenclatura química	Concentración en aceite de <i>Chlorella</i> <i>sp</i> (%)
Ácido behénico	22	Ácido docosanoico	4.66
Ácido araquídico	20	Ácido eicosanoico	11.13
Ácido esteárico	18	Ácido octadecanoico	3.21
Ácido margárico	17	Ácido heptadecanoico	4.47
Ácido palmítico	16	Ácido hexadecanoico	5.32
Ácido tridecílico	13	Ácido tridecanoico	2.04
Ácido laúrico	12	Ácido dodecanoico	5.34
Ácido heptadecano Ácido	17	Ácido heptadecano	3.42
heneicosanoico	21	Ácido heneicosanoico	7.38

Fuente: Elaboración propia

Dentro de los ácidos grasos insaturados se encuentran los ácidos grasos monoinsaturados y los de mayor interés los ácidos grasos poliinsaturados. Como se mencionó en el capítulo II, la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados radica en que estos forman parte de los ácidos grasos esenciales como el omega-3( $\omega$ 3) y el omega ( $\omega$ 6). Los ácidos grasos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar, por lo que tiene que ser obtenido través de la dieta.

En la siguiente tabla N° 18, se puede observar los ácidos grasos monoinsaturados encontrados, el ácido nervónico y el ácido oleico.

**Tabla 17 Perfil Ácidos grasos monoinsaturados presentes  
en aceite de *Chlorella sp.***

Nombre común	Nombre en nomenclatura química	Fórmula	Omega	Concentración en aceite de <i>Chlorella sp</i> (%)
Ácido nervónico	Ácido tetracosenoico	24:1 (15)	ω9	9.56
Ácido oleico	Ácido octadecenoico	18:1 (9)	ω9	0.95

Fuente: Elaboración propia

El ácido nervónico presenta una concentración de 9.56% que es relativamente alta en comparación con otras fuentes que presentan concentraciones mínimas. El aceite extraído a partir de *Chlorella sp.* presenta una buena fuente de ácido nervónico. La importancia del ácido nervónico radica en que pertenece a los cerebrosidos que son ácidos grasos del grupo glucosfingolípidos, importantes componentes de los músculos y de la membrana celular nerviosa, moléculas del sistema nervioso central y periféricos, que forman parte de la envoltura de mielina de los nervios. [8]

**Tabla 18 Concentración de ácido nervónico de diferentes fuentes.**

Fuente	Concentración (%)
Salmon Rey	0.14
Semilla de mostaza amarilla	0.083
Linaza	0.064
Salmon rojo	0.04
Semilla de sésamo	0.035
Nueces	0.018
Harina cocida de raíz de maca	1.37

En la tabla N° 19, Se muestran los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mostrando una mayor concentración el ácido linoleico que pertenece al grupo de

ácidos grasos omega 6 y este es esencial, porque a partir de este se pueden sintetizar otros ácidos como el ácido araquidónico y el ácido gamma linolénico, los ácidos grasos poliinsaturados tienen un efecto beneficioso en general, disminuyendo el colesterol total, aunque estudios recientes han demostrado que niveles excesivos de omega 6, comparado con omega 3, incrementan el riesgo de contraer diferentes enfermedades como ataques al corazón, artritis, osteoporosis, inflamaciones, obesidad, cáncer e incluso depresiones, debido a esto la relación sugerida de omega 6 y omega 3 es de 4:1 respectivamente en aceites. (Simopoulos et al, 2002). La relación obtenida en nuestro aceite es de 6:1, esta relación nos indica que la concentración de omega 6 es alta sobre la concentración omega 3.

El aceite de *Chlorella sp.* Obtenido muestra presencia de Ácido eicosapentaenoico, normalmente los aceites producidos a partir de microalgas de agua salada contienen un alta proporción de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), además estos muestran más estabilidad a la degradación oxidativa que aquellos obtenidos de otras fuentes. (Hinzpeter et al, 2006). Pero vemos que en el aceite extraído la existencia de DHA es nula.

**Tabla 19 Perfil de Ácidos grasos poliinsaturados en aceite de *Chlorella sp.***

Nombre común	Nombre en nomenclatura química	Fórmula	Omega	Concentración en aceite de <i>Chlorella sp</i> (%)
Ácido araquidónico	Ácido eicosatetraenoico	20:4(5,8,11,14)	$\omega$ 6	3.30
Ácido linoleico	Ácido Octadecadienóico	18:2(9,12)	$\omega$ 6	18.87
Ácido eicosadienoico	Ácido eicosadienoico	20:2 (11,14)	$\omega$ 6	8.62
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	Ácido eicosapentaenoico	20:5 (5,8,11,14,17)	$\omega$ 3	0.54
Ácido $\alpha$ linolénico(ALA)	Ácido octadeca-trienoico	18:3 (9,12,15)	$\omega$ 3	4.57
Ácido eicosatrienoico	Ácido eicosatrienoico	20:3 (5,8,11)	$\omega$ 9	6.62

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue superior al de ácidos grasos monoinsaturados, pero menor al de ácidos grasos saturados. La presencia de ácidos grasos insaturados en el aceite es mayor que los ácidos grasos saturados. Esta característica es importante porque afecta directamente el aceite, y por lo tanto el biodiesel producido a partir de su transesterificación. Las insaturaciones mejoran la operatividad del biodiésel a bajas temperaturas, pero disminuyen su estabilidad a la oxidación, lo cual está relacionado con el índice de yodo elevado encontrado. (Tejeda et al, 2015)

**Tabla 20 Porcentaje de ácido graso obtenido del aceite de *Chlorella sp.***

Tipo de ácido graso	Aceite de <i>Chlorella sp</i> (%)
Poliinsaturados (PUFAs)	42,52
Monoinsaturados (MUFAs)	10.51
Saturados (Sfas)	46.97

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 22, se compara los ácidos grasos del aceite obtenido a partir de *Chlorella sp.* con otros aceites.

**Tabla 21 Porcentaje de ácidos grasos en aceites**

Fuentes	Acidos grasos		
	PUFAs	MUFAs	Sfas
Aceite de colza	29.6	58.9	7.1
Aceite de algodón	51.9	17.8	25.9
Aceite de oliva	8.4	73.7	13.5
Aceite de soya	37.6	43	14.9
Aceite de Sacha Inchi	85.41	8.4	6.19
Semillas de nueces	63.25	22.9	9.04
Aceite de <i>Chlorella sp.</i>	42.52	10.51	46.97

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 23, Se muestra una comparación del perfil de ácidos grasos poliinsaturados resultado de este estudio con el de otras investigaciones realizadas con *Chlorella sp.* y *D. salina*, y otros aceites que son buenas fuentes ácidos grasos poliinsaturados.

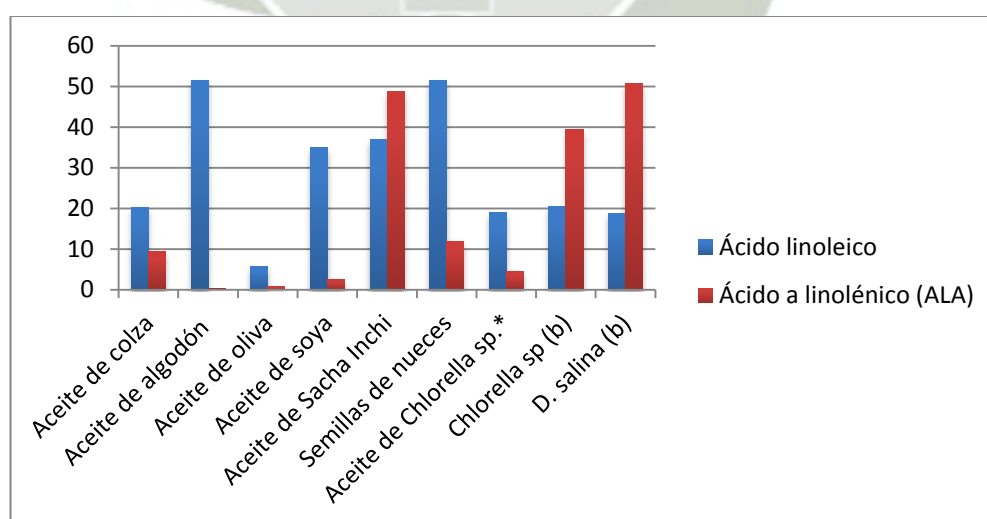
**Tabla 22 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados – ácido linoleico y ácido  $\alpha$  linolénico (ALA) en diferentes tipos de aceites.**

Aceite	Ácidos grasos poliinsaturados (%)	
	Ácido linoleico	Ácido $\alpha$ linolénico (ALA)
Aceite de colza	20.3	9.3
Aceite de algodón	51.5	0.2
Aceite de oliva	5.6	0.7
Aceite de soya	34.9	2.6
Aceite de Sacha Inchi	36.8	48.61
Semilla de nueces	51.34	11.91
Aceite de <i>Chlorella sp.*</i>	18.87	4.57
<i>Chlorella sp (b)</i>	20.56	39.33
<i>D. salina (b)</i>	18.77	50.65

\*Este trabajo

Fuente: Elaboración propia

En la figura 25, Se muestra la comparación de ácidos grasos poliinsaturados principales obtenidos a partir de *Chlorella sp.* aislada en este trabajo frente a otros aceites con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.



**Figura 25 Perfil de ácidos grasos poliinsaturados.**

Podemos observar que la concentración de ácido  $\alpha$  linolénico de la cepa aislada es baja, la concentración de ácido linoleico es similar a los aceites de colza y los aceites de *Chlorella sp (b)* y *D. salina (b)*, pero se resalta la presencia de del ácido eicosapentaenoico (EPA) 0.54% en el aceite obtenido de la cepa *Chlorella sp.* aislada en el presente trabajo, puesto que ningún aceite que fue comparado contiene ácido eicosapentaenoico.

La concentración de ácidos grasos poliinsaturados, a nivel de microalgas es similar a la concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los aceites de algodón y de soja, que son aceites comerciales para la producción de margarina.

La composición de ácidos grasos de microalgas, del genero *Chlorella*, ha sido estudiada principalmente con respecto a las condiciones de cultivo, se estableció que hay perfil definido para ciertas condiciones como el fotoperiodo y el medio de cultivo. (Rubio et al, 2013)

El éxito de producción de ácidos grasos a partir de microalgas de agua dulce depende de factores que aparentemente son poco similares, como la fisiología de los cultivos a la tecnología aplicada. Por esta razón, aunque muchos de los factores que pueden afectar el cultivo de las microalgas se relacionan, como por ejemplo, la temperatura, el tipo de iluminación, la agitación, los medios; el análisis individual permite establecer de manera más directa, los valores específicos que permiten la optimización de la fisiología del cultivo, lo cual se puede traducir como el aumento de la eficiencia del proceso.

Aun es imperativo el entendimiento de como las variables relacionadas con este proceso afectan las producción de biocompuestos, al analizar factores conjuntos, se hace difícil establecer cuáles son los factores que benefician o perjudican un proceso relacionado con la producción de bienes a través de técnicas biotecnológicas.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo ácidos grasos poliinsaturados en un 42.52% respecto al aceite extraído de *Chlorella sp.* en un fotobiorreactor en sustrato no convencional – Te de compost en base de estiércol de vaca biodigerido aeróbicamente.
2. Se aisló la cepa *Chlorella sp.* Nativa de la región Arequipa, utilizando la técnica de diluciones seriadas y el sembrado en placas para su identificación. Se obtuvo y caracterizo fisicoquímicamente el estiércol de vaca con un contenido de 72.58 % de humedad, 5.65 % de ceniza y 4.65% de materia orgánica
3. Se construyó un biodigestor aeróbico en base estiércol de deshecho de granjas lecheras y se analizó el Te de Compost para ser utilizado como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas, presentado una concentración de 4.0mg/L de NO<sub>3</sub>, 0.356mg/L de NO<sub>2</sub>, 3.96Pmg/L de PO<sub>4</sub> y 20.5mg/L de NH<sub>4</sub>
4. Se evaluó la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones de Te de Compost y se seleccionó el medio de 75% con una velocidad de  $5.07 \cdot 10^{-2} \text{ hrs}^{-1}$  siendo esta la más eficiente en cuanto a la velocidad de crecimiento para la *Chlorella sp.*
5. Se masifico y adapto la cepa al medio cultivo seleccionado, presentando condiciones de adaptación en su temperatura como es de 28°, con un pH constante de 8, a una iluminación de 2400 lux y fotoperiodo de 16/8 horas.
6. Se diseñó y construyó un fotobiorreactor tubular horizontal de 5L para la producción de aceites y se obtuvo un 22.03% de lípidos con respecto a la biomasa seca.
7. Se caracterizaron 17 ácidos grasos presentes en el aceite, siendo el más representativo el ácido linoleico a una concentración de 18.87 %

## RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda hacer una identificación molecular de las cepas de microalgas, debido a que la identificación morfológica solo nos indica el género más no las especies.
- ✓ Se recomienda hacer análisis más exhaustivos al Te de Compost como factores de crecimiento, su efecto catalizador con otros componentes, y reacciones al calor extremo y humedad contenida
- ✓ Se recomienda que al repetir este trabajo en condiciones etéreas que cumpla con las condiciones físicas y químicas en parámetros estándar para generar nuevas investigaciones, orientándolas a sub procesos con resultados contrastables de campo es decir nuevo usos.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] **Albarracin, I. 2007.** Microalgas; Potenciales productoras de biodiesel. XV Simposio electrónico internacional.
- [2] **Alfaro, R. 2012.** Mecanismos de la producción de Biogas.
- [3] **Alvarez J. 2006.** Consejería de agricultura y pesca: Manual de compostaje para agricultura ecológica.
- [4] **Alvear, M. et. al. 2011.** Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias.
- [5] **Becker, E. W. 1994.** Microalgae Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press.
- [6] **Chisti, Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. Institute of Technology and Engineering, Massey University. Biotechnology Advances.
- [7] **Contreras, C. et al. 2003.** Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. CINVESTAV-IPN, Interciencia. Vol. 28 N°8
- [8] **Contreras, R. et al. 2013.** Biodigestores tubulares unifamiliares: Cartilla practica para instalación, operación y mantenimiento, Lima: soluciones prácticas.
- [9] **Dragone, G. et al. 2010.** Third generation biofuels from microalgae. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.
- [10] **Dragone, G.** Influencia de la concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento de microalgas *Chlorella vulgaris*. Portugal: XIV Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería.
- [11] Evaluación de las variedades más promisorias para la producción de aceite vegetal y su potencial implementación en Colombia. Corporación para el desarrollo industrial de la biotecnología y producción limpia CORPODIB. Bogotá. Colombia.

- [12] **Faife – Perez, E. et al. 2012.** Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable (Parte II: Microalgas). Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- [13] **Fernández, L. et al. 2012.** Producción de Biocombustibles a partir de microalgas. Ra Ximhai vol. 8, Núm. 3. Diciembre.
- [14] **Francescageli, O. 2013.** Te de Compost como control de Mildiu Lanoso (*Peronospora beldharii*) y suplemento nutricional en Albahaca Dulce (*Ocimum basilicum* –var. Genovese-), Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.
- [15] **Gandhi, R. et al. 2012.** Assessment for the higher production of biodiesel from *Scenedesmus Dimorphus* algal species. India.
- [16] **García. Molina, G. et al. 1993.** Cuantificación de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal. Universidad de Almeria. España.
- [17] **Garibay, et al. 2009.** Biodiesel a partir de microalgas. Biotecnología. Vol. 13 N° 3.
- [18] **Gómez, C. et al. 2012.** Efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo Raceway (AWL) de las microalgas *Chorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la obtención de aceite. Arequipa.
- [19] **Gonzales, L. M. 2010.** Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fosforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- [20] **Gonzales. Bashan, L. Yoav. 2000.** Increased growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microbiol.
- [21] **Granados, C. et al. 1983.** Cultivo de la microalgas *monochrysis lutheri* y *skeletonema costatum* con nutrientes producidos por los estiércoles digeridos. Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

- [22] **Guerra, M. 2011.** Humus de Lombriz Eisenia Foetida para cultivar dos microalgas marinas, como alimento de larvas de camaron. Cuba.
- [23] **Hinzpeter, I.** Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Chile, Santiago de Chile.
- [24] INKANATURA IMPORT EXPORT SL 2013
- [25] INTD. Recomendaciones de ingesta de aceites y grasas para una alimentación saludable. Sexta Edición. 2007
- [26] **López, F. et al. 2010.** Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. Universidad Industrial de Santander.
- [27] **Lozano, J. et al. 2006.** Composición del aceite de oliva.
- [28] **Makareviciene V. 2011.** Cultivation of microalgae Chlorella sp. and Scenedesmus sp. as a potential biofuel feedstock. Kaunas, Lithuania.
- [29] **Maldonado, E. 2014.** Evaluación de la capacidad Mixotrofica de la microalgas Grasiella emersoni (Chlorella emersoni) con sustrato amiláceos. Universidad de las Fuerzas armadas, Colombia.
- [30] **Márquez, M. et al. 2012.** Diseño y construcción de un biodigestor para la obtención de Te de Compost, a partir de residuos sólidos domésticos, Abancay.
- [31] **Martínez, D. 2015.** Composición del aceite de algodón.
- [32] **Molina, G. et al. 2003.** Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances 20, 491 – 515.
- [33] Norma del CODEX para aceites vegetales especificados. CODEX STAN 210 – 1999
- [34] **Nuñez, E. 2007.** Extracciones con equipo Soxhlet.
- [35] **Palomino, A. et al. 2010.** Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. IV Congreso Brasileiro e I Simposio Internacional de Oleaginosas Energéticas.
- [36] **Peredo, et. al. 2009.** Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos; 24 -32.

- [37] **Piedrahita, J. 2012.** Diseño del Sistema de Alimentación y Control de Temperatura en un fotobiorreactor para la producción de biomasa y ácidos grasos a partir del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*. Universidad Autónoma de Occidente.
- [38] **Ramírez, L. et al. 2013.** Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias. Artículo de Revisión en Ciencia y Tecnología, Ecuador.
- [39] **Richmond, A. 2004.** Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science.
- [40] **Riegel, M. 2008.** Te de compost: Una nueva herramienta para revitalizar el potencial biológico del suelo.
- [41] **Romo, A. 2002.** Manual para el cultivo de microalgas. Universidad Autónoma de California. Diciembre.
- [42] **Rubio, D. 2013.** Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. Colombia: Universidad de América.
- [43] **Salazar, L. E. 2012.** Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Universidad de Piura, Piura.
- [44] **Simopoulos, A. 2002.** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids.
- [45] **Smith, J. S. 2003.** Evaluation of analytical data. Cap, 4 de *Food Analysis*, 3th ed. S.S. Nielsen (Ed.), Kluwer Academic, Nueva York.
- [46] **Tejeda, L. 2015.** Caracterización y perfil lipídico de aceite de microalgas. Cartagena: Universidad de Cartagena.
- [47] **Tejeda, L. 2011.** Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite Universidad de Cartagena.
- [48] **Toledo, A. 2010.** Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano. Universidad Autónoma Metropolitana.
- [49] **Valenzuela, G. 1993.** El Cultivo de microalgas a nivel laboratorio y masivo. Universidad de Sonora .División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

- [50] *Zambrano, J. M. 2012.* Biotecnología Ambiental: Guía de prácticas de Biotecnología Ambiental, Arequipa.



# ANEXO 1: PANEL DE FOTOGRAFÍAS

**A. Fuente de extracción del material biológico**



**Figura 26 Obtención de la fuente para Chlorella sp.**



**Figura 27 Obtención del Estiércol de vaca**

**B. Análisis Físicoquímico del estiércol de vaca**



**Figura 28 Determinación de humedad del estiércol de vaca**



**Figura 29** Determinación de ceniza de estiércol de vaca



**Figura 30** Determinación del contenido de materia orgánica, titulación de la muestra



**Figura 31** Determinación del contenido de materia orgánica, muestra y blanco

### C. Biodigestor



**Figura 32 Filtración del Te de Compost en el biodigestor**

### D. Masificación del cultivo



**Figura 33 Adaptación y masificación en un volumen de 240 ml.**

**E. Cultivo fotobiorreactor**



**Figura 34 Fotobiorreactor (FBR) tubular de 5L a los 2 días, en periodo de oscuridad**



**Figura 35 Fotobiorreactor (FBR) tubular de 5L a los 4 días, en periodo de luz**

**F. Cosechas de las microalgas**



**Figura 36 Biomasa seca de Chlorella sp.**



**Figura 37 Peso de Biomasa seca de Chlorella sp.**

**G. Extracción de Acetias**



**Figura 38 Extracción de aceite por soxhlet**



**Figura 39 Aceite de Chlorella sp. contenido en Hexano**

## H. Analisis de Aceites



**Figura 40** Soluciones de titulación para el Índice de Yodo



**Figura 41** Muestra de la Titulación

## I. Perfil de Acidos Grasos



**Figura 42** Cromatografo de gases FID

# ANEXO 2

## CALCULOS MATEMATICOS

**Ecuación 1**

$$\% Humedad = \frac{\text{gr. de agua}}{\text{gr. de muestra humedad}} * 100$$

$$\% Humedad = \frac{36.37 \text{ gr}}{50\text{gr}} * 100$$

$$\% Humedad = 72.74$$

**Ecuación 2**

$$\% Cenizas = \frac{\text{gr. de ceniza}}{\text{gr. de muestra seca}} * 100$$

$$\% Cenizas = \frac{0.73\text{gr}}{13,63\text{gr}} * 100$$

$$\% Cenizas = 5.36$$

**Ecuación 3**

$$\% M.O. = \frac{(\text{ml de } K_2Cr_2O_7 * N) - (V_1 * N * F)}{\text{peso de muestra en gr.}}$$

$$\% M.O. = \frac{(5\text{ml de } K_2Cr_2O_7 * 1N) - (1.85\text{ml} * 0.5N * 1.43)}{0.55 \text{ gr.}}$$

$$\% M.O. = 4.6$$

**Ecuación 4**

$$F = \frac{5 * 1}{V_2 * 0.5}$$

$$F = \frac{5 * 1}{7 * 0.5}$$

$$F = 1.43$$

**Ecuación 5**

$$E_v(lx) = \frac{P(w) \times n(lm/w)}{A(m^2)}$$

$$E_v(lx) = \frac{5(w) \times 60(lm/w)}{0,125(m^2)}$$

$$E_v(lx) = 2400 \text{ lux}$$

**Ecuación 6**

$$\frac{cel}{ml} = \frac{C1 + C2 + C3 + C4}{4} * 10000$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{18 + 22 + 19 + 30}{4} * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 222500$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{15 + 6 + 11 + 7}{4} * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 97500$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{22 + 16 + 7 + 16}{4} * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 152500$$

$$\frac{cel}{ml} = 222500 + 97500 + 152500 = 1,58 * 10^5$$

**Ecuación 7**

$$\frac{cel}{ml} = \frac{C1 + C2 + C3 + C4 + C5}{5} * 25 * 10000$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{12 + 9 + 14 + 16 + 8}{5} * 25 * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 2950000$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{8 + 14 + 11 + 19 + 11}{5} * 25 * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 2700000$$

$$\frac{cel}{ml} = \frac{11 + 12 + 12 + 13 + 10}{5} * 25 * 10000 \quad \frac{cel}{ml} = 2900000$$

$$\frac{cel}{ml} = 2950000 + 2700000 + 2900000 = 2,85 * 10^6$$

**Ecuación 8**

$$\mu = \log_2 \left( \frac{Cf}{Co} \right)$$

$$\mu = \log_2 \left( \frac{7,22 * 10^7}{6,28 * 10^7} \right) = 0,066$$

**Ecuación 9**

$$\phi = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\phi = \frac{\ln 2}{0,066} = 10,5$$

**Ecuación 11**

$$I = \frac{(Vt - Vm) * N * 12.69}{G}$$

$$I = \frac{(57.9 - 47.7) * 0.07 * 12.69}{0.068}$$

$$I = 133.245$$

**Ecuación 12**

$$\%Aceites = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100$$

$$\%Aceites = \frac{20.06 - 19.67}{1.77} * 100$$

$$\%Aceites = 22.03$$

# ANEXO 3: TABLAS DE CRECIMIENTO



Chlorella sp. Primera adaptación - Te de compost (100%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen (mL)	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )
0	1	18	22	19	30		22,25	1,58E+01	1	1,58E+05	10	1,58E+06	
	2	15	6	11	7		9,75						
	3	22	16	7	16		15,25						
1	1	46	50	55	29		45	3,97E+01	1	3,97E+05		3,97E+06	5,55E-02
	2	46	40	32	30		37						
	3	37	34	39	38		37						
2	1	50	58	47	90		61,25	5,44E+01	1	5,44E+05		5,44E+06	1,90E-02
	2	49	41	52	48		47,5						
3	1	12	9	14	16	8	11,8	1,14E+01	1	2,85E+06		2,85E+07	9,96E-02
	2	8	14	11	10	11	10,8						
	3	11	12	12	13	10	11,6						
4	1	22	20	29	32	26	25,8	2,41E+01	1	6,02E+06		6,02E+07	4,49E-02
	2	21	32	25	24	25	25,4						
	3	23	25	15	19	23	21						
5	1	31	39	47	57	41	43	3,70E+01	1	9,25E+06	9,25E+07	2,59E-02	
	2	34	45	42	33	35	37,8						
	3	37	29	24	28	33	30,2						
6	1	60	25	24	37	39	37	3,83E+01	1	9,57E+06	9,57E+07	2,02E-03	
	2	41	40	24	48	40	38,6						
	3	51	38	42	38	27	39,2						
7	1	28	26	26	22	23	25	2,45E+01	1	6,13E+06	6,13E+07	-2,67E-02	
	2	26	28	25	28	36	28,6						
	3	17	16	15	20	32	20						

<i>Chlorella sp.</i> Primera adaptación - Te de compost (75%)																	
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )				
0	1	8	11	13	11		10,75	1,61E+01	1	1,61E+05	10	1,61E+06					
	2	15	20	30	15		20										
	3	20	22	12	16		17,5										
1	1	2	3	4	5	6	4	5,27E+00	1	1,32E+06		10	1,32E+07	1,26E-01			
	2	3	2	4	6	5	4										
	3	6	8	7	9	9	7,8										
2	1	4	5	15	7	8	7,8	6,40E+00	1	1,60E+06			10	1,60E+07	1,17E-02		
	2	6	3	3	6	7	5										
3	1	17	24	23	20	24	21,6	2,03E+01	1	5,07E+06				10	5,07E+07	6,93E-02	
	2	22	19	19	16	26	20,4										
	3	22	19	16	20	17	18,8										
4	1	23	39	28	23	36	29,8	3,06E+01	1	7,65E+06					10	7,65E+07	2,48E-02
	2	35	30	33	29	27	30,8										
	3	29	32	38	27	30	31,2										
5	1	36	46	42	37	54	43	4,40E+01	1	1,10E+07	10					1,10E+08	2,18E-02
	2	48	47	44	40	35	42,8										
	3	43	49	49	40	50	46,2										
6	1	17	27	24	26	23	23,4	2,81E+01	1	7,02E+06		10				7,02E+07	-2,70E-02
	2	28	32	26	45	39	34										
	3	28	28	30	24	24	26,8										
7	1	32	32	19	21	33	27,4	2,88E+01	1	7,20E+06			10			7,20E+07	1,55E-03
	2	24	37	31	42	24	31,6										
	3	32	31	25	25	24	27,4										

<i>Chlorella sp.</i>													
Primera adaptación - Te de compost (50%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )
0	1	65	70	67	48		62,5	3,88E+01	1	3,88E+05	10	3,88E+06	
	2	35	20	23	27		26,25						
	3	30	14	48	19		27,75						
1	1	4	7	4	10	6	6,2	5,00E+00	1	1,25E+06		1,25E+07	7,03E-02
	2	5	4	6	6	5	5,2						
	3	4	3	4	3	4	3,6						
2	1	8	2	4	6	9	5,8	6,80E+00	1	1,70E+06		1,70E+07	1,85E-02
	2	7	11	7	5	9	7,8						
3	1	9	10	12	8	6	9	8,67E+00	1	2,17E+06		2,17E+07	1,46E-02
	2	10	11	12	8	10	10,2						
	3	8	7	7	4	8	6,8						
4	1	21	15	25	27	23	22,2	2,28E+01	1	5,70E+06		5,70E+07	5,81E-02
	2	27	26	25	19	15	22,4						
	3	17	22	19	22	39	23,8						
5	1	33	27	40	28	23	30,2	3,09E+01	1	7,73E+06	7,73E+07	1,83E-02	
	2	37	34	30	33	26	32						
	3	27	35	26	35	30	30,6						
6	1	30	32	38	27	26	30,6	2,93E+01	1	7,33E+06	7,33E+07	-3,19E-03	
	2	27	28	32	28	29	28,8						
	3	28	27	35	25	28	28,6						
7	1	15	16	15	12	11	13,8	1,42E+01	1	3,55E+06	3,55E+07	-4,36E-02	
	2	8	15	17	11	9	12						
	3	17	12	16	18	21	16,8						

<i>Chlorella sp.</i>													
Primera adaptación - Te de compost (25%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )
0	1	13	18	16	13		15	1,41E+01	1	1,41E+05	10	1,41E+06	
	2	12	12	14	7		11,25						
	3	10	25	18	11		16						
1	1	30	31	49	49		39,75	2,78E+01	1	2,78E+05		2,78E+06	4,10E-02
	2	14	29	28	18		22,25						
	3	23	19	24	20		21,5						
2	1	4	4	3	2	6	3,8	3,30E+00	1	8,25E+05		8,25E+06	6,53E-02
	2	1	2	4	2	5	2,8						
3	1	3	3	4	5	4	3,8	4,13E+00	1	1,03E+06		1,03E+07	1,35E-02
	2	6	4	3	5	5	4,6						
	3	3	3	3	5	6	4						
4	1	5	4	6	2		4,25	5,00E+00	1	1,25E+06		1,25E+07	1,14E-02
	2	2	7	6	4		4,75						
	3	5	4	8	7		6						
5	1	8	5	5	4	8	6	5,40E+00	1	1,35E+06	1,35E+07	4,63E-03	
	2	5	5	6	4	6	5,2						
	3	4	6	5	4	6	5						
6	1	9	9	2	5	3	5,6	3,53E+00	1	8,83E+05	8,83E+06	-2,55E-02	
	2	2	1	3	2	9	3,4						
	3	3	3	0	1	1	1,6						
7	1	1	5	1	3	3	2,6	3,07E+00	1	7,67E+05	7,67E+06	-8,51E-03	
	2	3	4	2	2	2	2,6						
	3	8	2	1	2	7	4						

<i>Chlorella sp.</i> Primera adaptación - Te de compost (15%)																	
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )				
0	1	3	1	11	0		3,75	3,92E+00	1	3,92E+04	10	3,92E+05					
	2	2	8	3	3		4										
	3	2	9	4	1		4										
1	1	17	31	24	19		22,75	1,81E+01	1	1,81E+05		10	1,81E+06	9,20E-02			
	2	12	12	18	12		13,5										
	3	18	15	16	23		18										
2	1	76	59	49	67		62,75	6,50E+01	1	6,50E+05			10	6,50E+06	7,69E-02		
	2	54	71	62	82		67,25										
3	1	11	12	8	11	14	11,2	8,33E+00	1	2,08E+06				10	2,08E+07	7,00E-02	
	2	8	7	6	6	7	6,8										
	3	9	8	7	5	6	7										
4	1	12	9	8	4	12	9	9,00E+00	1	2,25E+06					10	2,25E+07	4,63E-03
	2	10	11	4	11	15	10,2										
	3	7	5	8	9	10	7,8										
5	1	13	6	8	6	10	8,6	8,20E+00	1	2,05E+06	10					2,05E+07	-5,60E-03
	2	9	5	9	10	6	7,8										
	3	6	11	6	10	8	8,2										
6	1	12	21	14	17		16	2,13E+01	1	2,13E+05		10				2,13E+06	-1,36E-01
	2	20	26	17	15		19,5										
	3	21	29	26	38		28,5										

<i>Chlorella sp.</i> Primera adaptación - Medio Hidropónico (100%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento(u)
0	1	15	14	25	10		16	1,88E+01	1	1,88E+05	10	1,88E+06	
	2	24	13	26	17		20						
	3	25	16	18	22		20,25						
1	1	69	67	76	67		69,75	8,10E+01	1	8,10E+05		8,10E+06	2,11E+00
	2	79	81	94	82		84						
	3	86	87	87	97		89,25						
2	1	2	7	9	8	5	6,2	5,60E+00	1	1,40E+06		1,40E+07	7,89E-01
	2	2	5	4	8	6	5						
3	1	22	23	18	19	21	20,6	1,73E+01	1	4,32E+06		4,32E+07	1,62E+00
	2	12	16	15	16	16	15						
	3	17	18	16	13	17	16,2						
4	1	26	24	19	23	45	27,4	2,41E+01	1	6,02E+06		6,02E+07	4,79E-01
	2	23	22	23	25	32	25						
	3	27	20	8	23	21	19,8						
5	1	29	33	35	37	42	35,2	3,84E+01	1	9,60E+06	9,60E+07	6,74E-01	
	2	39	49	39	38	50	43						
	3	37	30	46	34	38	37						
6	1	58	63	58	59	56	58,8	5,74E+01	1	1,44E+07	1,44E+08	5,80E-01	
	2	64	67	61	62	55	61,8						
	3	46	46	61	55	50	51,6						

<i>Chlorella sp.</i> Primera adaptación - Medio Hidropónico (50%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )
0	1	7	17	10	11		11,25	1,14E+01	1	1,14E+05	10	1,14E+06	
	2	5	16	8	11		10						
	3	15	10	16	11		13						
1	1	40	50	106	98		73,5	2,74E+01	1	2,74E+05	10	2,74E+06	1,26E+00
	2	7	4	3	4		5						
	3	3	2	5	4		3,8						
2	1	8	5	8	14		9,2	7,60E+00	1	1,90E+06	10	1,90E+07	2,79E+00
	2	3	4	9	5		6						
3	1	4	5	4	2		3,6	4,67E+00	1	1,17E+06	10	1,17E+07	-7,04E-01
	2	4	6	5	3		4,4						
	3	4	3	5	12		6						
4	1	5	8	6	6		6,4	6,00E+00	1	1,50E+06	10	1,50E+07	3,63E-01
	2	5	5	6	3		5,4						
	3	5	4	7	10		6,2						
5	1	7	12	9	10		9,8	9,87E+00	1	2,47E+06	10	2,47E+07	7,18E-01
	2	6	8	7	4		7,4						
	3	10	12	15	12		12,4						
6	1	13	13	15	15		14,4	1,57E+01	1	3,92E+06	10	3,92E+07	6,67E-01
	2	12	16	20	21		18,2						
	3	19	12	12	14		14,4						

<i>Chlorella sp.</i> Primera adaptación - Medio hidropónico (15%)													
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )
0	1	1	0	1	0		0,5	4,17E-01	1	4,17E+03	10	4,17E+04	
	2	0	1	0	0		0,25						
	3	0	2	0	0		0,5						
1	1	9	14	14	12		12,25	1,37E+01	1	1,37E+05		1,37E+06	5,04E+00
	2	20	18	14	17		17,25						
	3	8	13	16	9		11,5						
2	1	59	49	52	71		57,75	5,74E+01	1	5,74E+05		5,74E+06	2,07E+00
	2	44	59	70	55		57						
3	1	18	5	22	32		19,25	2,09E+01	1	2,09E+05		2,09E+06	-1,46E+00
	2	23	35	20	37		28,75						
	3	10	28	14	7		14,75						
4	1	16	13	19	21		17,25	1,69E+01	1	1,69E+05		1,69E+06	-3,06E-01
	2	17	24	21	26		22						
	3	8	15	15	8		11,5						
5	1	14	20	17	11		15,5	1,38E+01	1	1,38E+05	1,38E+06	-2,90E-01	
	2	10	13	23	14		15						
	3	7	12	15	10		11						
6	1	5	17	18	15		13,75	1,31E+01	1	1,31E+05	1,31E+06	-8,04E-02	
	2	10	19	11	16		14						
	3	6	9	19	12		11,5						

<i>Chlorella sp.</i>														
Segunda adaptación - Te de compost (100%)														
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )	Tiempo de Generación (hrs)
0	1	27	28	27	31		28,25	2,62E+01	1	2,62E+05	240	6,28E+07		
	2	32	35	25	23		28,75							
	3	18	18	18	32		21,5							
1	1	35	25	30	33		30,75	3,01E+01	1	3,01E+05	240	7,22E+07	8,38E-03	8,27E+01
	2	28	36	38	29		32,75							
	3	29	38	9	31		26,75							
2	1	4	8	3	4	9	4,75	3,63E+00	1	9,06E+05	240	2,18E+08	6,63E-02	1,05E+01
	2	5	9	5	7	6	6,5							
	3	1	4	1	4	3	2,5							
3	1	10	6	4	5	7	6,4	6,60E+00	1	1,65E+06	240	3,96E+08	3,60E-02	1,92E+01
	2	8	5	9	8	6	7,2							
	3	10	6	5	6	4	6,2							
4	1	7	13	9	10	14	10,6	1,02E+01	1	2,55E+06	240	6,12E+08	2,62E-02	2,65E+01
	2	18	13	13	10	9	12,6							
	3	9	4	9	5	10	7,4							
5	1	9	9	8	10	15	10,2	1,04E+01	1	2,60E+06	240	6,24E+08	1,17E-03	5,94E+02
	2	8	10	12	7	15	10,4							
	3	9	8	16	11	9	10,6							

<i>Chlorella sp.</i>														
Segunda adaptación - Te de compost (75%)														
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )	Tiempo de Generación (hrs)
0	1	25	15	8	13		15,25	1,56E+01	1	1,56E+05	240	3,74E+07		
	2	25	26	11	18		20							
	3	21	11	8	6		11,5							
1	1	38	37	32	27		33,5	2,80E+01	1	2,80E+05		6,72E+07	3,52E-02	1,97E+01
	2	25	24	31	24		26							
	3	25	25	19	29		24,5							
2	1	2	3	7	1	2	3,25	3,63E+00	1	9,06E+05		2,18E+08	7,06E-02	9,82E+00
	2	6	2	1	10	11	4,75							
	3	2	1	7	6	2	4							
3	1	8	6	8	6	7	7	6,27E+00	1	1,57E+06		3,76E+08	3,29E-02	2,11E+01
	2	6	8	6	6	5	6,2							
	3	6	4	6	4	8	5,6							
4	1	16	18	16	16	13	15,8	1,44E+01	1	3,60E+06		8,64E+08	5,00E-02	1,39E+01
	2	11	14	13	15	11	12,8							
	3	12	16	14	18	13	14,6							
5	1	29	19	39	30	34	30,2	3,15E+01	1	7,87E+06	1,89E+09	4,70E-02	1,48E+01	
	2	30	29	36	35	31	32,2							
	3	24	28	37	30	41	32							

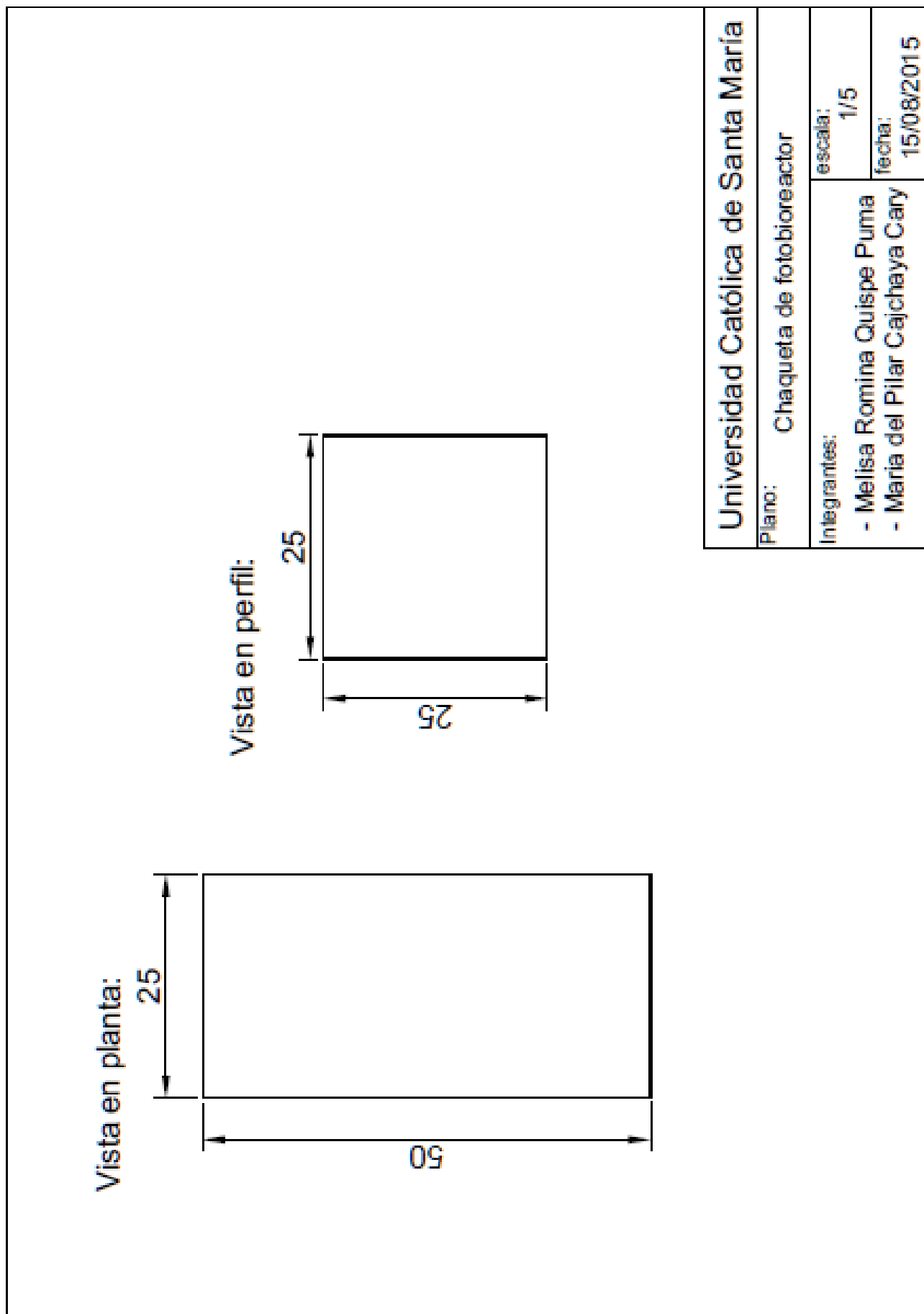
Chlorella sp. Segunda adaptación - Te de compost (50%)																		
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )	Tiempo de Generación (hrs)				
0	1	4	7	3	5		4,75	5,08E+00	1	5,08E+04	240	1,22E+07						
	2	5	4	10	3		5,5											
	3	7	5	5	3		5											
1	1	5	10	7	5		6,75	7,83E+00	1	7,83E+04		240	1,88E+07	2,60E-02	2,67E+01			
	2	8	6	9	7		7,5											
	3	11	8	8	10		9,25											
2	1	1	1	1	0	0	0,75	7,50E-01	1	1,88E+05			240	4,50E+07	5,25E-02	1,32E+01		
	2	1	1	0	0	0	0,5											
	0	1	1	0	1	0	0,75											
3	1	1	2	1	2	2	1,6	1,80E+00	1	4,50E+05				240	1,08E+08	5,26E-02	1,32E+01	
	2	3	2	3	2	1	2,2											
	3	1	1	3	2	1	1,6											
4	1	4	5	5	3	4	4,2	3,20E+00	1	8,00E+05					240	1,92E+08	3,46E-02	2,00E+01
	2	4	1	4	2	3	2,8											
	3	3	5	1	3	1	2,6											
5	1	5	7	6	5	7	6	6,20E+00	1	1,55E+06	240					3,72E+08	3,98E-02	1,74E+01
	2	5	5	8	8	9	7											
	3	4	6	6	7	5	5,6											

<i>Chlorella sp.</i>														
Fotobiorreactor - 5L														
Días	Ensayo	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Promedio	Promedio valido	Dilución	Concentración (microalgas/mL)	Volumen (mL)	Concentración total	Velocidad de crecimiento (u <sup>-1</sup> )	Tiempo de Generación (hrs)
0	1	47	47	45	58		49,25	4,82E+01	1	4,82E+05	5000	2,41E+09		
	2	52	55	52	58		54,25							
	3	44	44	42	34		41							
1	1	81	66	96	80		80,75	7,98E+01	1	7,98E+05	5000	3,99E+09	3,03E-02	2,29E+01
	2	84	80	82	97		85,75							
	3	67	76	76	72		72,75							
2	1	7	4	8	11	9	7,8	6,87E+00	1	1,72E+06	5000	8,58E+09	4,61E-02	1,50E+01
	2	5	6	6	3	5	5							
	3	7	5	12	8	7	7,8							
3	1	6	6	5	6	7	6	7,87E+00	1	1,97E+06	5000	9,83E+09	8,17E-03	8,48E+01
	2	8	5	8	9	10	8							
	3	7	8	14	10	9	9,6							
4	1	10	9	9	11	14	10,6	1,02E+01	1	2,55E+06	5000	1,28E+10	1,56E-02	4,44E+01
	2	9	8	17	11	20	13							
	3	12	8	13	7	9	9,8							
5	1	16	9	10	15	20	14	1,29E+01	1	3,23E+06	5000	1,62E+10	3,43E-01	2,02E+00
	2	14	11	13	14	12	12,8							
	3	16	10	13	9	12	12							

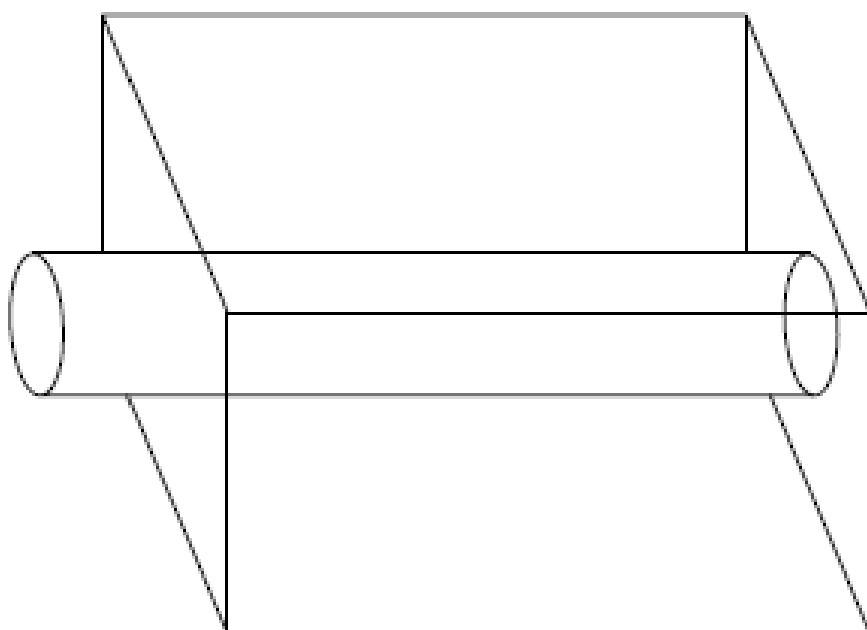


# ANEXO 4:

## PLANOS DEL FOTOBIORREACTOR



<b>Universidad Católica de Santa María</b>	
<b>Plano:</b>	Chaqueta de fotobioreactor
<b>Integrantes:</b>	escala: 1/5
	fecha: 15/08/2015
- Melisa Romina Quispe Puma	
- Maria del Pilar Cajchaya Cary	



Universidad Católica de Santa María

Plano:

Diseño del fotobiorreactor (FBR) Tubular vertical

Integrantes:

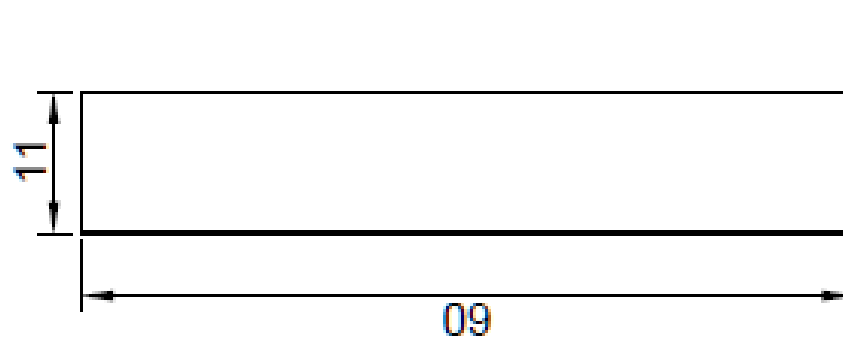
escala: 1/5

- Melisa Romina Quispe Puma

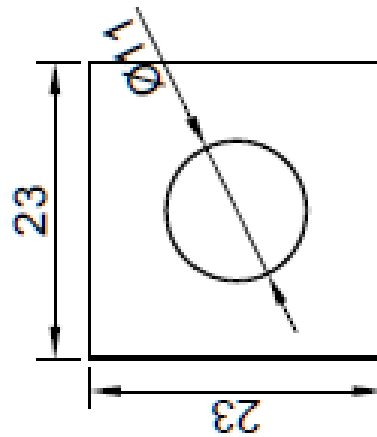
- Maria del Pilar Cajchaya Cary

fecha: 15/08/2015

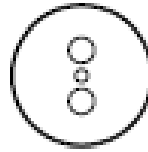
Vista en planta:



Vista en perfil:



Detalle de tapa  
de fotobioreactor:



Universidad Católica de Santa María

Plano:

Tapa de fotobioreactor

Integrantes:

- Melisa Romina Quispe Puma
- Maria del Pilar Cajchaya Cary

Escala:

1/5

Fecha:

15/08/2015



# **ANEXO 5: PREPARACION DE MEDIO HIDROPONICO**

### **Preparación del medio hidropónico**

El medio hidropónico fue adquirido de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNAM). El medio hidropónico adquirido en Presentación Juego de Sales se debió de preparar la Solución Concentrada “A”: nitrato de potasio, nitrato de amonio y superfosfato triple; y la Solución “B”: sulfato de magnesio, quelato de hierro y micronutrientes.

La Solución “A” se preparó disolviendo el nitrato de potasio en tres litros de agua, luego se agregó el nitrato de amonio se agito hasta disolver. Por otro lado se remojó el superfosfato tripe en medio litro de agua y se agito continuamente y se dejó reposar por 30 min., de este se vertió el sobrenadante sobre la solución de nitrato de potasio y nitrato de amonio y se agregó agua hasta completar los cinco litros de volumen. La Solución “B” se tuvo que disolver el sulfato de magnesio en un litro de agua, en otro recipiente se disolvió los micronutrientes en medio litro de agua destilada, este se vertió sobre la solución de sulfato de magnesio, el quelato de hierro se echó sobre la solución de contenía sulfato de magnesio y micronutrientes, se agito hasta disolverlo totalmente y se agregó agua hasta completar el volumen final de dos litros.

Para preparar una solución de medio hidropónico al 100% se debió tomar 5ml de la Solución “A” y 2ml de la Solución “B” y llevarlo hasta un volumen final de 1L.



# ANEXO 6: RESULTADOS DE LABORATORIOS



# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

## INFORME DE ENSAYO LAS-15-03017

Pág: 1/2


### Hoja de datos

Señores: MARIA DEL PILAR CAJCHAYA CARY  
Dirección: URB LA COLINA II A-18 HUNTER -AREQUIPA  
Atención: MARIA DEL PILAR CAJCHAYA CARY  
Proyecto: OBTENCION DE ACIDOS GRASOS A PARTIR DE MICROALGAS EN UN MEDIO NO CONVENCIONAL  
Nro de muestras: 1  
Toma de muestra realizado por: Cliente: MARIA DEL PILAR CAJCHAYA CARY  
Registro de muestreo: 106-15  
Fecha de recepción: 09/06/2015  
Fecha de ensayo: 09/06/2015  
Fecha de emisión: 12/06/2015  
Condiciones de recepción de la muestra: Muestras debidamente conservadas  
Observaciones: Datos proporcionados por el cliente

### Método de ensayo aplicado

- \*812 Método de Ensayo de amonio por fotometría en agua
- \*839 ASTM D 3867 - 09 Método de ensayo estándar para nitrato en agua
- \*840 ASTM D 3867 - 09 Método de ensayo estándar para nitrito en agua
- \*866 Método de ensayo para fosfatos por fotometría

Cod Int. #	Nombre de muestra	Matriz de la muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de inicio de muestreo	Hora de inicio de muestreo
AG15000239	BIODIGERIDO LIQUIDO	Agua Residual - Agua Residual Industrial	URB. SIMON BOLIVAR /JOSE LUIS BUSTAMANTE Y RIVERO /AREQUIPA /AREQUIPA	SALIDA INFERIOR DEL BIODIGESTOR AEROBIO	25/05/15	09:30 a.m.

  
Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico> = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



# Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

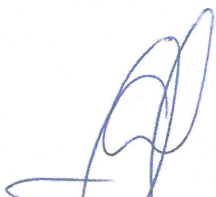
## INFORME DE ENSAYO LAS-15-03017

Hoja de resultados

12/06/2015

Pág.: 2/2

Código Interno #	Nombre de Muestra	*812 NH4 mg/L	*839 NO3- mg/L	*840 NO2- mg/L	*866 PO4-3 mg/L
AG15000239	BIODIGERIDO LIQUIDO	20,5	4,00	0,356	3,96

  
Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Omar A. Juárez Soto  
Gerente de Operaciones  
M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

<sup>a</sup><Valor numérico" = Límite de detección del método, <sup>b</sup><Valor Numérico" = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.