

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Cultivo de la microalga *Scenedesmus Obliquus var. Dimorphus* (TURPIN)  
para la obtención de biomasa y lípidos.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN ECOLOGÍA Y  
GESTIÓN AMBIENTAL

AUTORA: BACH. Mercado Tupiño Estefanía

ASESOR: Dr. Quiñones Aguilar Mauro

LIMA, PERÚ

2016

*Este trabajo está dedicado con mucho amor a mi esposo, padres porque son el motor de mi vida, y profesores que me están apoyando a mantener dentro de los lazos de la educación.*

## AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Mauro Quiñones Aguilar, quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos del tema que corresponde a mi profesión. Además, él ha sabido encaminarme por la ruta correcta, porque me apoyo en la orientación y corrección en mi labor científica con mucho interés y entrega que ha sobrepasado mis expectativas que, como alumna, deposita en su persona.

## RESUMEN

Las microalgas han demostrado ser la fuente de energía más económica. Además, reduce el dióxido de carbono, también tienen una mayor producción en un corto tiempo y menor espacio a diferencia de otros cultivos. Entre las más de 100 especies de microalgas, el *Scenedesmus dimorphus* es el que tiene mayor potencial.

El objetivo de este trabajo de tesis fue determinar de qué manera con un medio de cultivo para *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) se obtiene cantidad de biomasa y contenido de aceite.

Inicialmente, el trabajo experimental consistió en la obtención de la cepa pura de *Scenedesmus dimorphus* (14 mL). Seguidamente, se realizó el escalamiento de cultivo desarrollándose de la siguiente manera: 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1L, 2L y 5L, con el fin de determinar las curvas de crecimiento mediante el conteo celular de *S. dimorphus* con el uso de la cámara de Neubauer, obteniendo los siguientes resultados: 3' 451,500 unidades celulares en 120 horas (Bayfolan Forte), 2' 472,500 unidades celulares en 192 horas (BG-11) y 327,500 unidades celulares en 96 horas (Guillard). Concluyendo que el Bayfolan Forte se obtuvo un mejor resultado.

A continuación, se realizó 5 cosechas, luego se usó el método de floculación mediante la utilización del sulfato de aluminio  $Al_2(SO_4)_3$  y posteriormente, para la extracción de aceites, se molió la biomasa seca (36.5 g) seguido por la extracción con disolvente en hexano/isopropanol, y se obtuvo un total de 30 mL de lípidos.

Finalmente, en la parte estadística se comprobó la validez de las hipótesis utilizando diferentes métodos, tales como: Anova, Tukey y T. Student.

Palabras clave: microalgas, *Scenedesmus dimorphus*, Bayfolan Forte, Guillard, BG-11, hexano, isopropanol, agar Nutritivo, sulfato de aluminio.

# ABSTRACT

Microalgae have proved to be the Source of Energy More Economic for Production of biodiesel. In addition to reducing Carbon Dioxide, also they have a high growth rate in a short time and need less space compared to other crops.

The aim of this thesis was to determine how a culture medium for *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) is obtained a high amount of biomass and a high oil content.

Initially, the experimental work consisted in obtaining pure strain *Scenedesmus dimorphus* (14 mL). Then, scaling up culture developed as follows is performed: 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1L, 2L y 5L, to determine the growth curves by S. dimorphus cell count using the Neubauer chamber, obtaining the following results: 3 '451,500 cells in 120 hours (Bayfolan Forte), 2'472,500 cells 192 hours (BG-11) and 327,500 cells in 96 hours (Guillard). Being Forte Bayfolan that had the highest peak in increasing the population density of S. dimorphus, and in the last two culture media (BG-11 and Guillard) and in the last two culture media (BG11 and Gillard) had a high pollution what couldn't continue grow in scale. Concluding that Bayfolan forte had better result.

After that, 5 harvest was performed, so I chose the flocculation method with aluminum sulfate  $Al_2(SO_4)_3$  and subsequently, for the extraction of oils, the dry biomass (36.5 g) then with solvent extraction in hexane/isopropanol, and was obtained a totally of 30 mL of lipid.

Finally, statistical part was tested using different methods, such as: Anova, Tukey and T. Student for the validity of the hypothesis.

Keywords: microalgae, *Scenedesmus dimorphus*, Bayfolan Forte, Guillard, BG-11, hexane, isopropanol, nutritive Agar, aluminum sulfate.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO</b> .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	2
1.2.1 Formulación del problema .....	2
1.2.2 Justificación del estudio .....	3
1.3 Antecedentes relacionados con el tema .....	4
1.5 OBJETIVOS .....	19
1.6 LIMITACIONES .....	19
<b>CAPITULO II : MARCO TEÓRICO</b> .....	20
2.1 BASES TEÓRICAS.....	20
2.1.1 Teoría sobre Biotecnología ambiental (Eloy Becares, 2014) .....	20
2.1.2 Teoría Bioestadística (Carrasco de la Peña, 1982) .....	21
2.1.3 Teoría Ficológica (Jesús Izco, 1997) .....	21
2.1.4 Teoría Bioquímica (Nelson, 1994) .....	23
2.1.5 Teoría Termoquímica (Pérez Cruz, 2005) .....	24
2.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS USADOS .....	24
2.3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS .....	25
2.4 VARIABLES .....	26
2.4.1 Variables y puntos de referencia.....	26
2.4.2 Relación entre variables .....	26
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	27
3.1 DISEÑO METODOLÓGICO.....	27
3.1.1 Cultivo de Microalgas .....	28
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	33
3.2.1 Método de Cultivo .....	33
3.2.2 Sistema de Cultivo .....	35
3.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS .....	36
3.3.1 Medio de Guillard .....	36
3.3.2 Preparación de medio BG-11 .....	38
3.3.3 Preparación del medio de cultivo Bayfolan .....	39
3.4 PRUEBA DE PUREZA DE AGAR NUTRITIVO .....	39
3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	39

3.6 RECOLECCIÓN DE DATOS .....	41
3.6.1 Conteo celular manual por cámara de Neubauer .....	41
3.6.2 Cosecha de Microalga.....	42
3.6.3 Secado de la Biomasa alga.....	42
3.6.4 Extracción de aceite .....	44
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1 RESULTADOS.....	46
4.1.1 Comparación de crecimiento poblacional con diferentes medios de cultivo.....	46
4.1.2 Comparación de biomasa seca a 100 mL con dos diferentes floculantes .....	54
4.1.3 Resultado de la prueba de pureza por Agar Nutritivo.....	54
4.1.4. Determinación de la cantidad de biomasa y lípidos (con medio Bayfolan) .....	55
4.1.5 Prueba de hipótesis .....	56
4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	65
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
5.1 CONCLUSIONES .....	69
5.2 RECOMENDACIONES.....	71
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
ANEXO 1: PREPARACIÓN DEL MEDIO GUILLARD E INOCULACIÓN .....	80
ANEXO 2: PREPARACIÓN DEL MEDIO BG-11 E INOCULACIÓN.....	83
ANEXO 3: PROCEDIMIENTO DE RECUPERACIÓN DE ALGAS EN MUESTRAS CONTAMINADAS.....	84
ANEXO 4: CRECIMIENTO DE BIOMASA DE <i>SCENEDESMUS DIMORPHUS</i> EN MEDIO DE CULTIVO BAYFOLAN FORTE POR MÉTODO DE ESCALA INTERMEDIA.....	87
ANEXO 5: PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA SECA A 100 ML.....	88
ANEXO 6: PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS .....	89
ANEXO 7: CONTEO DE ALGAS VERDES <i>S. DIMORPHUS</i> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS: GUILLARD F/2, BG-11 Y BAYFOLAN FORTE.....	91
ANEXO 7.1.....	92
ANEXO 7.2.....	98
ANEXO 7.3.....	115

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto por los diferentes métodos de extracción en el contenido de lípidos de <i>C. protothecoides</i> y <i>S.dimorphus</i>	16
Figura 2: Efectos por los diferentes métodos en el contenido de lípidos en las tres diferentes especies de microalgas	17
Figura 3. Los efectos del nitrógeno en el peso de la biomasa seca(DW)	18
Figure 4: <i>Scenedesmus dimorphus</i> imagen	22
Figura 5: Composición química de alga expresa en material seco (%)	23
Figura 6: <i>Scenedesmus obliquus var. dimorphus</i> (Turpin) de 12 mL de muestra, donados por el Instituto del mar del Perú	27
Figura 7: Instalación de luces Fluorescentes para el crecimiento de las algas verdes en los fotobiorreactores	28
Figura 8: Instalación de sistema de aire para los fotobiorreactores	29
Figura 9: Medio de cultivo Bayfolan	30
Figura 10: Preparación de medio Bayfolan Forte en Erlenmeyers de 5 L	31
Figura 11: Solución de <i>S. dimorphus</i> dentro de matraces y en constante agitación por un Multi-shaker	32
Figura 12: Típica curva de crecimiento	34
Figura 13: Sistema de cultivo semi-continuo a escala en laboratorio	34
Figura 14: Inoculación de <i>Scenedesmus dimorphus</i> a Erlenmeyer de dos litros dentro de una cámara flujo laminar	35
Figura 15. Compuestos químicos para Guillard f/2	36
Figura 16. Metales pesados para el medio de cultivo Guillard f/2	36
Figura 17. Metales pesados y vitaminas	37

Figura 18. Compuestos químicos para el medio de cultivo BG-11	38
Figura 19: Materiales	40
Figura 20: Equipos	41
Figura 21: Formula de Neubauer	41
Figura 22: Efecto de coagulación y precipitación por las dos sales	42
Figura 23: Filtración para la extracción de la biomasa coagulada	43
Figura 24: Raspado de la biomasa seca con Bisturí	43
Figura 25: Emolienda de la Biomasa seca	44
Figura 26: Biomasa pulverizada y depositadas en placas Petri	44
Figura 27: Crecimiento poblacional de la biomasa de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo Guillard	47
Figura 28: Curva de Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo Guillard	48
Figura 29: Curva de Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo BG-11 en muestra A	49
Figura 30: Curva de Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo BG-11 en muestra B	50
Figura 31: Curva de Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo Bayfolan en muestra A	52
Figura 32: Curva de Crecimiento poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> (Turpin) en medio de cultivo Bayfolan en muestra B	53
Figura 33: Crecimiento de poblacional de <i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>dimorphus</i> en los 3 diferentes medios de cultivos	53
Figura 34: Prueba de Agar nutritivo inoculadas con Cepa de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	55
Figura 35. Comparación de las fases estacionarias de los tres diferentes medios de cultivo, con un 95% de confiabilidad	58

Figura 36. Grafica ilustrativa de intervalos de confianza al 95%	59
Figura 37. Grafica ilustrativa de intervalos de confianza al 95%	60
Figura 38. Prueba T de student-biomasa	62
Figura 39. Prueba T de student-lípidos	63
Figura 40. Correlación de las dos variables en la prueba de T de student, donde el eje X = biomasa y, el eje Y = Lípidos	64
Figura 41: Compuestos químicos para la preparación de medio Guillard y balanza analítica	79
Figura 42: Mezcla todos los compuestos de Metales pesados y vitaminas en un agitador magnético	79
Figura 43: Inoculación de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en medio de cultivo Guillard F/2 dentro de la cámara flujo laminar	80
Figura 44: Se mantuvo la inoculación de <i>Scenedesmus dimorphus</i> a condiciones de laboratorio	80
Figura 45: Conteo celular de <i>S. dimorphus</i> en la cámara Neubauer	81
Figura 46: Cambio de color de la inoculación del medio de cultivo Guillard de verde intenso a blanquecino	81
Figura 47: Compuestos químicos que conforman el medio de cultivo BG-11	82
Figura 48: Inoculación de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en medio de cultivo BG-11 dentro de la cámara flujo laminar.	82
Figura 49: Cambio de color de la inoculación del medio de cultivo BG-11 de verde a verde amarillento.	82
Figura 50: Medios de cultivo BG-11 contaminados por bacterias.	84
Figura 51: Tubos Eppendorf (6) con muestras de cultivo BG-11 contaminados en centrifugadora.	84
Figura 52: Centrifugación de muestra de cultivo BG-11 en donde (a) Sobrenadante con bacterias y (b) Algas sedimentadas.	84

Figura 53: Inoculación en 4 tubos de ensayo de las algas sedimentadas extraídas de la muestra de cultivo BG-11 que fueron centrifugadas.	85
Figura 54: Siembra en placa petri en medio de cultivo Guillard con <i>S. dimorphus</i> .	85
Figura 55: Cepas puras de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (a) por plaqueo.	85
Figura 56: Crecimiento de biomasa de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en medio de cultivo Bayfolan Forte por método de escala Intermedia.	86
Figura 57: Coagulación de dos muestras de cepas puras de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en Erlenmeyer de 100 mL.	87
Figura 58: Filtración de la biomasa de <i>Scenedesmus dimorphus</i> coagulada por floculantes.	87
Figura 59: Raspado de la biomasa seca de <i>Scenedesmus dimorphus</i> después de 24h de reposo a T° de ambiente.	87
Figura 60: Se pesó 0.5 g de la biomasa seca de <i>S. dimorphus</i> por balanza analítica.	88
Figura 61: Se agregó 9 mL de hexano- isopropanol 3:2 (v/v) por cada 0.5 g de biomasa.	88
Figura 62: Se colocó en el vórtex cada tubo de ensayo durante un min y luego se puso 6 tubos de ensayo a la centrifuga por 20 min.	88
Figura 63: El 12 tubo de ensayo con extracto se dejó reposar por 24 horas a T° de ambiente.	89
Figura 64: Se evapora la solución de hexano- isopropanol 3:2 (v/v) en baño maría a 95 °C, bajo campana extractora de seguridad.	89
Figura 65: Obtención de 30 mL de lípidos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en Erlenmeyer de 50 mL.	89
Figura 66: Muestra de <i>S. dimorphus</i> en cámara de Neubauer.	90
Figura 67: Muestra de <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos.	46
Tabla 2. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos.	47
Tabla 3. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos.	49
Tabla 4. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos.	50
Tabla 5. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos.	51
Tabla 6. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos.	52
Tabla 7. Biomasa seca a 100 mL.	54
Tabla 8. Tiempo total de maduración por escala.	54
Tabla 9. Determinación de la cantidad de biomasa y lípidos.	55
Tabla 10. Base de datos de T student.	56
Tabla 11. Determinación de los días de la fase estacionaria en el incremento de la biomasa de <i>S. dimorphus</i> .	56
Tabla 12. Análisis de un Factor para prueba estadística de Anova.	57
Tabla 13. Prueba de estimación de Tukey.	57
Tabla 14. Base de datos para la construcción de límite de confianza al 95%.	59
Tabla 15. Fórmulas para la construcción de límite de confianza.	60
Tabla 16. Resultados de Intervalos de confianza.	60
Tabla 17. Base de datos para la construcción de límite de confianza al 95%.	61

Tabla 18. Fórmulas para la construcción de límite de confianza.	61
Tabla 19. Resultados de Intervalos de confianza.	61
Tabla 20. Prueba de estimación t de student de la biomasa.	62
Tabla 21. Prueba T de student-lípidos.	63
Tabla 22. Prueba de correlación de la prueba estadística t de student entre lípidos y biomasa.	64

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

## 1.1 INTRODUCCIÓN

*Scenedesmus dimorphus* representa una de las materias primas con mejores propiedades para la extracción de aceite, tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional. Por ejemplo, tiene 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soya. Por otra parte, el autor de Chisti *et al.*, este bioenergético tiene una verdadera pequeña huella ecológica, dado que requiere de 1.5 a 3.2 millones de hectáreas (M has) para satisfacer el 50% de las demandas energéticas en U.S.A. En contraste, la soya es la principal fuente de biodiesel en U.S.A requiere de 330 a 450 millones de hectáreas (M has) para un propósito similar. Dicho por los autores Garibay *et al.*, 2009, en México, se ha estimado que sólo se requiere el 1% de la superficie total del país, para cubrir el 100% de la demanda actual de diésel de petróleo.

El *Scenedesmus dimorphus* es una microalga verde, en forma de frijol de aproximadamente 10 um de tamaño. categorizado como una bacteria pesada. *Scenedesmus dimorphus* tiene un contenido de lípidos de 16 - 40%, siendo una de las especies más utilizadas para la obtención de aceite en la producción de biodiesel. Uno de los problemas con esta microalga es que es muy pesada debido al grosor de sus paredes, y forma sedimentos gruesos si no se mantiene en constante agitación.

Ramos *et al.*, 2010 mencionó que la temperatura óptima para el crecimiento de la cepa está entre 30-35 grados centígrados.

En el presente trabajo se tiene como propósito obtener biomasa para la obtención de lípidos a partir del cultivo de microalgas verdes (*Scenedesmus dimorphus*)

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

### 1.2.1 Formulación del problema

El *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* es una chlorofita que tienen un amplio rango de hábitat respecto a las condiciones ambientales y se encuentran en el agua dulce. Sin embargo, uno de los problemas, es que requiere de una agitación constante para poder oxigenar los cultivos y de esta forma obtener menor cantidad de sedimentos.

Además, tampoco se conoce con exactitud el rendimiento sobre la cantidad del aceite en comparación con los cultivos convencionales tales como las oleaginosas y que entre ellas se encuentra la *Brassica carinata* “mostaza”.

El cultivo de microalgas de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) necesita de un control automatizado en sus cultivos en fotobiorreactores para evitar su contaminación, debido a que esta especie requiere de un alto mantenimiento y tienden a contaminarse fácilmente por otras especies.

Los Fotobiorreactores son sistemas cerrados, muy complejos y costosos, por esta razón se requiere el establecimiento de un diseño de bajo costo y que al mismo tiempo brinde condiciones adecuadas para la producción de biomasa a partir de este tipo de microalgas.

Si no se establece un diseño adecuado para los fotobiorreactores, entonces habrá mayor contaminación por especies de algas no deseadas. Además, se logra controlar los parámetros ambientales como la temperatura, luz (blanca y natural) y pH, entonces no se podrá obtener la biomasa para la producción de biodiesel. Esto es debido a que el periodo de cultivo es mayor y también por la disminución de la tasa de crecimiento de las algas.

### Problema general

¿Con cuál de los tres medios, Bayfolan, Guillard o BG-11, se obtiene mayor cantidad de biomasa y porcentaje de lípido, en el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus var dimorphus* (Turpin)?

### Problemas específicos

¿Con cuál de los tres medios de cultivo Bayfolan, Guillard o BG-11, se obtiene mayor efecto sobre el crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var dimorphus* (Turpin)?

¿Con cuál de los tres medios, Bayfolan, Guillard o BG-11, se obtiene mayor cantidad de biomasa, en el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus var dimorphus* (Turpin)?

¿Con cuál de los tres medios, Bayfolan, Guillard o BG-11, se obtiene mayor porcentaje de lípido, en el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus var dimorphus* (Turpin)?

### **1.2.2 Justificación del estudio**

El cultivo y la obtención de aceite a partir de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* presentan muchas ventajas con respecto a los cultivos de oleaginosas. Puesto que tienen una tasa de crecimiento mayor y la producción del aceite es estimada entre 4.6 y 1.8 L/m<sup>2</sup>, lo cual es de 7 a 30 veces mayor que cultivos de oleaginosas. Además, requieren de espacios pequeños para su producción.

El fitoplancton tiene gran rendimiento en la producción de aceite y también las siguientes razones tales como:

“Mayor producción de ácidos grasos poli-insaturados.”

“Superan mayor producción de aceites en comparación de otras plantas.”

“Alcanza niveles de producción elevados en condiciones controladas.”

“Rápida reproducción (se duplica la producción cada 8 horas).”

“Requieren menor espacio, (Rendimiento por hectárea es treinta veces superior a la de las oleaginosas).”

“Fuente principal alternativo para la producción de proteínas.”

“No compite con otros cultivos de oleaginosas.”

“No requieren agroquímicos.”

“Bajo riesgo de contaminación.”

“Es una actividad de una baja demanda de energía; no requiere suelo fértil ni agua de calidad.”

### **1.3 Antecedentes relacionados con el tema**

De acuerdo a los estudios realizados por Donohue y Codgell, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, mencionan que el año 2009 han afrontado una grave problemática debido al aumento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de invernadero tales como la contaminación local del aire y el calentamiento global. Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO<sub>2</sub>. Una alternativa energética promisoría que ha resultado muy

atractiva en años recientes es el biodiesel. Otro resultado de la investigación es acerca del biodiesel que es 100% biodegradable, ya que en menos de 21 días se degrada por acción de los microorganismos.

Los estudios realizados por Aguilar *et al.*, en el 2001 reportan acerca de la obtención de la biomasa de algas que se llevó a cabo bajo determinadas condiciones ambientales y estructurales. Además, Las Microalgas se sometieron bajo procesos físico y químicos (transesterificación), para poder extraer los lípidos debido a que las biomásas de las microalgas son potencialmente acumuladoras de lípidos para la obtención de biocombustible.

Los científicos Shen *et al.*, 2009, realizan un trabajo sobre los métodos de extracción de lípidos para *Scenedesmus dimorphus* (autótrofos) y *Chlorolela protothecoides* (heterótrofos), determinaron tres niveles de concentraciones en nitrato, urea y extracto de levadura que fueron fuentes de nitrógeno. Sus resultados fueron que el mayor rendimiento de los lípidos de *S. dimorphus* en el cultivo autotrófico durante 17 días fue de 0,40 g / L en medio de urea (1,8 g / L) y el rendimiento máximo para *Chlorolela protothecoides* en un medio heterotrófico durante nueve días fue de 5,89 g / L a partir del medio nitrato (2,4 g / L). De esta manera determinaron la eficacia en la extracción de biomasa de algas para *S. dimorphus* y *C. Protothecoides*. En conclusión, la humedad seguida de extracción con hexano fue el más efectivo para la extracción de lípidos *S. dimorphus*, mientras que el batidor seguida de extracción con hexano fue mejor para *C. protothecoides*.

De acuerdo a los reportes realizados por Estrada *et al.*, 2010, exponen sobre crear, montar, validar y ajustar la tecnología necesaria para llevar a cabo el proceso para obtener biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, y se estableció y diseño para un proceso productivo. La nueva tecnología tiene cuatro componentes básicos: la producción de biomasa (crecimiento de microalgas en sistemas cerrados), la extracción del aceite, la refinación y la transesterificación. La investigación muestra las diferentes microalgas existentes, donde se realizan los respectivos análisis del efecto de la temperatura, luminosidad y cantidad de nutrientes sobre las microalgas seleccionadas, en sistemas cerrados.

Los autores Maribel *et al.*, 2010, desarrollan un trabajo experimental que es acerca de la producción de biodiesel a partir de microalgas con respecto entorno ambiental que ha generado la necesidad de este tipo de producto, haciendo énfasis en el cambio climático, los gases efecto invernadero y la producción de Bioenergéticos. Concluyendo, que existen diversas oportunidades en cada uno de los retos a vencer y que se deben combinar el conocimiento científico más avanzado con las actividades y capacidades empresariales que están emergiendo en busca de procesos competitivos. Las ventajas de este bioenergético de segunda generación y el escenario actual del alza de precio sobre el petróleo, sugieren proyecciones optimistas para lograr avances en el corto y mediano plazo que permitan producirlo a un costo competitivo.

De acuerdo a los estudios realizados por Shovon *et al.*, 2010, mencionan que el biodiesel a partir de microalgas parece ser la única fuente renovable de biodiesel que tiene el potencial de reemplazar por completo los combustibles de transporte derivados de petróleo. Su metodología consistió en la acumulación de lípidos en *Scenedesmus obliquus dimorphus* que se estudió en diferentes condiciones de cultivo. Obteniendo como resultado, el aumento significativo en los lípidos que alcanzó el 43% de peso seco de células, que d bajo el N-deficiencia (contra 12,7% en condición de control). Bajo la suplementación de P-deficiencia y tiosulfato el contenido de lípidos también se incrementó hasta 30%. La aplicación de la metodología de superficie en respuesta por la combinación del diseño central compuesto rotatorio (CCRD) resultó en una producción de lípidos de 61,3% (frente al 58,3% según el experimento) a 0,04, 0,03 y 1,0 GT de nitrato, fosfato, y el tiosulfato de sodio, respectivamente, por el tiempo la cultura de 8 días.

Las células crecidas de *Scenedesmus* en glucosa (1,5%) - N suplementado medio 11 cuando se somete a la condición optimizado anteriormente, la acumulación de lípidos es hasta 2,16 g/L, el pliegue valor-40 superior con respecto a la condición de control. la presencia de palmitato y oleato de los principales componentes de la biomasa que *S. oblicuo* una materia prima adecuada de la producción de biodiesel.

En el 2009 los expositores Garibay *et al.*, reportan acerca de la situación actual debida al agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y dificultades ambientales, demanda urgentemente fuentes alternas de energía siendo una opción promisoría el biodiesel; biocombustible producido primordialmente a partir de aceites provenientes de plantas oleaginosas, cuya disponibilidad desafortunadamente, es incapaz de sustituir el mercado de petrodiesel en México y el mundo. El uso de microalgas para la producción de biodiesel es una alternativa ventajosa debido al elevado contenido de lípidos y perfil idóneo para la obtención del biocombustible que éstas ofrecen. Aunado a lo anterior, otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta. No obstante, los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa de microalgas, entre otros. Ante estos inconvenientes, la optimización de los sistemas de cultivo de microalgas es imprescindible. El propósito de esta revisión es el de proporcionar un panorama general y crítico de esta alternativa bioenergética, mediante el análisis de los fundamentos de la misma.

Los autores Xu *et al.*, 2006, realizaron un estudio con el objetivo de obtener una alta producción biodiesel de calidad de un Protothecoides microalga Chlorella a través de la tecnología de transesterificación. La técnica de control metabólico a través del  $^{14}\text{C}$  crecimiento de los heterótrofos *C. protothecoides* se aplicó, y la heterótrofa *C. protothecoides* figura el contenido de lípidos en bruto de 55,2%. Para aumentar la biomasa y reducir el coste de alga, polvo de maíz hidrolizado en lugar de glucosa se utilizó como fuente de carbono orgánico en medio de cultivo heterotrófico en fermentadores. El resultado mostró que la densidad celular aumentó significativamente con la condición de heterótrofo, y la mayor concentración celular alcanzó 15,5 g de L. Gran cantidad de aceite de microalgas se extrajo de manera eficiente de las células heterótrofas utilizando n-hexano y, a continuación, transmutado en biodiesel por transesterificación ácida. El biodiesel se caracteriza por un alto valor calorífico de 41 MJ kg<sup>-1</sup>, una densidad de 0.864 kg de L<sup>-1</sup>, y una viscosidad de 5,2 x 10<sup>-4</sup> Pas (a 40 °C). El método tiene un gran potencial en la producción industrial de combustible líquido a partir de microalgas.

En el año 2013, los autores Feng Yang *et al.*, obtuvieron 7 especies de algas verdes y realizaron experimentos para la producción de biodiesel, dichos experimentos consistían determinar cuál de estas algas tuvo mejor crecimiento y rendimiento en la acumulación de lípidos en cultivos semi-continuos al aire libre. Finalmente determinaron que el *S. dimorphus* tuvo mejores resultados alcanzando su mayor peso seco (4.36 g/L), el contenido de lípido (49.6%) y la productividad (183 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) por 61 días, obteniendo alta productividad en biomasa 450-55p mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y el máximo (1.05-1.44 día<sup>-1</sup>).

Los autores Ling Xia *et al.*, en el año 2013, hicieron una investigación que consistía en seleccionar una cepa de microalga dentro de siete cepas de microalgas (Chlorophyta, Scenedesmusmaceae) cual fue *Scenedesmus obtusus* XJ-15 en dos etapas fototróficas al aire libre y tuvo mejores resultados, la primera etapa consiste en el crecimiento celular y en la segunda etapa es la inducción de lípidos en frascos de 5 L en aire libre. En la primera etapa, la productividad de biomasa fue aumentada desde 139.4 a 212 mg. L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. En la Segunda etapa, el contenido de lípido fue incrementado desde 26.1 % a 47.7% por la adición de NaCl dentro del medio de cultivo. Además, en la etapa II también se realizó en un fotobiorreactor de 140 L al aire libre. En la primera etapa, tuvo una productividad de biomasa de 86.5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y una fijación de CO<sub>2</sub> de 170 mg L<sup>-1</sup> D<sup>-1</sup> y un alto contenido de lípido de 42.1% en la segunda etapa. Por lo cual se obtuvo una mejor calidad de biodiesel debido al lípido que se extrajo. Estos resultados sugieren que el sistema fototrófica de dos etapas no fue solo factible sino también efectivo.

De acuerdo a los estudios realizados por Mandotra *et al.*, en el año 2013, el alga de agua dulce *Scenedesmus abundans* fue materia *prima* para la producción de biodiesel. Dicha alga creció en diferentes medios de cultivo en BBM, CHU-13 modificado y medio BG-11. Entre la prueba de concentraciones de nitrógeno usando CHU-13 modificado y medio BG-11, la mayor cosecha de biomasa y lípidos fue de 1.113 +- 0.05 g/L y 489 +- 23 mg/L respectivamente y en los medios de cultivo se encontró 0.32 g/L de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>). La escala se hizo en fotobiorreactor y se mostró abundancia de ácidos grasos con cadenas de carbonos de 16 y 18 carbonos. Se analizaron propiedades de biodiesel tales como el número de cetona, índice de iodo y valor de Saponificación fueron analizados y comparados por

estándares de biodiesel europeo EN14214. Finalmente, concluyeron que *S. abundans* es una materia prima potencial para la producción de biodiesel.

La presente investigación fue realizada por Ritu Tripathi *et al.*, en el año 2014 se aisló un alga de una mina de mármol, esta microalga aislada creció en un medio de BG-11 suplementado con bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) como fuente de carbono. El comportamiento del crecimiento de los aislamientos y las tasas de captación  $\text{NaHCO}_3$  se consideraron como parámetros de selección para determinar la cepa de microalgas más capaz. El más eficiente microalga fue identificada como *Scenedesmus sp.* ISTGA1 por 18S método de secuenciación rDNA. El crecimiento fue estudiado bajo diferentes concentraciones de gaseoso  $\text{CO}_2$  (5-15 % v/v) y  $\text{NaHCO}_3$  (10-200 mM). Los resultados revelan que el alga aislada alcanza su máximo crecimiento a 100 mM  $\text{NaHCO}_3$ , contiene clorofila, producción de biomasa y contenido de lípido fue 9 mg/L, 1508 mg/L y 301 mg/L respectivamente. A 15% de  $\text{CO}_2$ , las características fueron 12.1 mg/L, 1490 mg/L y 268 mg/L respectivamente. Los Lípidos fueron transferidos y FAMES fue analizado vía GC-MS.

El FAMES de saturación (33-35.8%) y ácidos grasos insaturados (54-55%) en ambos casos de suplementación de carbono inorgánico, dominado por C16 O C18 de ácidos grasos (>80%), que son apropiados para la producción de biodiesel.

Los trabajos realizados por Chengche Wu *et al.*, en el año 2013, consistieron en los efectos de las concentraciones de etanol en lípidos y acumulación de ácidos grasos con variedades de tiempos en cultivos y se estudió la composición de *Scenedesmus sp.* El máximo incremento de la densidad de alga, productividad de lípido, contenido de lípido y contenido de ácido graso fue 6.61, 11.75, 1.34 y 3.14 veces mayor que el grupo control bajo 12 h de fotoperiodo. Privación de luz en Algas con etanol inhibe los efectos positivos en el crecimiento del alga y lípidos. La cantidad acumulada de C16: 0 y C18: 0 se redujo correspondientemente con el aumento de las concentraciones de etanol y el tiempo de cultivo. Además, los ácidos grasos insaturados aparecieron en los estadios tempranos de las algas y el máximo aumento fue 57,02%. Sin embargo, sólo 2,27% 14C se transfirió a partir de etanol a

los ácidos grasos. Los resultados indican que la adición de la cantidad apropiada de etanol en medio de cultivo de algas era beneficiosa para la producción de materia prima en biodiésel.

En el año 2013, los autores Saurabh Jyotu Sarma *et al.*, realizaron una investigación donde utilizaron el CG (glicerol crudo) que es el principal residuo en el proceso de producción de biodiesel como sustrato para la producción de lípidos de algas, primero diluyen el CG con agua destilada. Sin embargo, CG contiene sólo una pequeña cantidad de Mg ( $57,41 \pm 18$  ppm) y su concentración se reduce aún más a cerca de 0,57 ppm durante el proceso de dilución. Aparte de tener un número de funciones en la fisiología de las algas, Mg es el átomo central de la clorofila. Por lo tanto, se evaluó  $MgSO_4$  como un suplemento en el medio de cultivo basado en CG y usado para la producción de lípidos por *Chlorella vulgaris*. Al complementar el proceso con 1 g / L de  $MgSO_4$ , casi  $185,29 \pm 4,53\%$  en la producción de ácidos grasos. Así la aplicación de las nanoparticulas de  $MgSO_4$  fue una potencial estrategia para mejorar la fuente de lípidos.

El 2013, los autores Xu Ping Zhou *et al.*, realizaron un estudio con respecto a la viabilidad en la producción de biodiesel por microalgas *Chorella sp.* (FACHB-1748) Bajo condiciones al aire libre. La alga verde de agua dulce fue cultivada al aire libre bajo la luz solar natural para evaluar su potencial en la producción de biocombustibles. Utilizaron urea como fuente de nitrógeno, y la concentración fue optimizada. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía, se llevó a cabo una prueba de la acumulación de lípidos utilizando diferentes concentraciones de cloruro de sodio y acetato. Se llevó a cabo el experimento en escala en un fotobiorreactor de 70 L. La mayor productividad de biomasa ( $222.42, 154.48$  mg / L / d) y la productividad de lípidos ( $64.30, 33.69$  mg / L / d) se obtuvieron con 0,1 g / L de urea en fotobiorreactores de 5 L y 70 L, respectivamente. El más alto contenido de lípidos (43,25%) y la producción de lípidos ( $1243.98$  mg / L) fueron adquiridos con la combinación de 10 g / L cloruro de sodio y acetato. Por otra parte, las cualidades de biodiesel, el número de cetano, índice de saponificación, índice de yodo, y el punto de obstrucción del filtro en frío cumplido con las normas establecidas por la National Petroleum Agencia (ANP255), Standard ASTM D6751, y la norma europea (EN 14214).

De acuerdo a los autores Yinli Jiang *et al.*, en el año 2012, investigaron los efectos de los gases de combustión en el crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*, dos métodos se llevaron a cabo para eliminar los efectos inhibitorios de los gases de combustión en microalgas. *S. dimorphus* y podría tolerar concentraciones de CO<sub>2</sub> de 10 a 20% y concentraciones de NO de 100 a 500 ppm, mientras que la máxima tolerancia en concentración de SO para *S. dimorphus* fue 100 ppm. Se adiciono CaCO<sub>3</sub> durante el burbujeo con una simulación de combustión de gas (15% de CO<sub>2</sub>, 400 ppm SO<sub>2</sub>, 300 ppm de NO, N<sub>2</sub> equilibrado) mantenido un el pH aproximado de 7,0 y crecieron las células de alga (3,20 g L<sup>-1</sup>). Por un intermitente burbujeo con un controlador de combustión de gas por un pH retroalimentado, la máxima concentración de biomasa y la más alta eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> fueron 3,63 g L<sup>-1</sup> y 75,61%, respectivamente. Estos resultados indicaron que *S. dimorphus* podían tolerar altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y NO, y los métodos de adición de CaCO<sub>3</sub> y burbujeo intermitente tienen un gran potencial para superar la inhibición de los gases de combustión en microalgas.

Los Autores Ling Wang *et al.*, en el año 2012, realizaron una investigación en la que Seleccionaron y evaluaron CO<sub>2</sub> en microalga autóctonas tolerantes, cultivaron cinco cepas de algas *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Coelastrum*, and *Ankistrodesmus*, aislándola de agua fresca de India. Luego estudiaron la tolerancia para dióxido de carbono y su efecto en el crecimiento, lípidos y ácidos grasos. La cepa *Scenedesmus dimorphus* mostró el máximo crecimiento (1.5g/L) y contenidos de lípidos (17.83% w/w) bajo suplementación de CO<sub>2</sub>, por lo tanto, fue seleccionada para una evaluación detallada. La cepa tuvo adaptación alcalina pero tolerante, un rango amplio de pH (5-11), salinidad elevada (hasta 100mM, NaCl) con bajos rendimientos de biomasa y aumento de carotenoides (19,34 mg / g de biomasa), elevados niveles de CO<sub>2</sub> hasta 15% v/v con mejora en la tasa de crecimiento, rendimiento de biomasa (1.57g/L), contenido de lípidos (19.6% w/w) y la tasa de biofijación (0.174g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). El contenido de ácidos grasos insaturados (ácido alfa linolénico) incrementó con suplemento de CO<sub>2</sub> en la cepa.

En el año 2014, los autores Michael Agbakpe *et al.*, se utilizó dos especies de bacterias (*Escherichia coli* y *Rhodococcus sp*) fueron utilizados como biocoagulantes para cosechar la *Chlorella* y *Scenedesmus dimorphus* zofingiensis. La influencia de la radiación UV y

polietilenimina en la eficiencia de recolección de algas fueron investigados. Los resultados mostraron que la irradiación UV podría mejorar ligeramente la biocoagulación del alga por la bacteria y la eficiencia de la obtención de algas. En contraste el recubrimiento de polietilenimina de las *E. Coli*, se notó el incremento de las eficiencias de recolección de 23% a 83% para *S. dimorphus* cuando se compara con *E. Coli* sin recubrimiento. Basada en la teoría Derjaguin – Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), una barrera de energía existe entre la *E Coli* recubierta y las células de las algas, donde las células de *E coli* recubiertas eliminan la barrera de energía, con lo que la biocoagulación fue mejorada significativamente. En conclusión, este trabajo presentó bases hacia el uso potencial de biomasa bacteriana para la obtención de algas de agua.

Los trabajos realizados por Alex T. McCurdy *et al.*, en el año 2014 consistió en un eficiente y simple dos procesos para la generación de mezclas de biodiesel a partir de biomasa microbiana, cual elimina la necesidad de extracciones de solventes, destilaciones, o purificaciones adicionales. El combustible se utilizó para extraer biodiesel producido a partir de la transesterificación directa de la levadura, *Cryptococcus curvatus*, y microalgas, *Scenedesmus dimorphus*, generando así una mezcla de biodiesel microbiana y combustible diesel. Hasta 93% y 83% del biodiesel producido es extraído de ambas levaduras y microalgas, respectivamente, mientras que la mayoría de los pigmentos están excluidos. Una mezcla B20 producida a partir de la levadura cumple con los requisitos clave de combustible ASTM incluyendo punto de inflamación, la viscosidad, azufre, estabilidad a la oxidación, y el índice de acidez. La integración de los datos experimentales en sistemas de modelos revela una reducción del 25% en la relación de energía neta (NER) con el proceso que aquí se presenta en comparación con la extracción con disolvente tradicional.

Los autores Yenjung Sean Lai *et al.*, en el año 2014, su estudio consistió en los efectos en el tratamiento con campo eléctrico pulsado para mejorar la recuperación de lípidos de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, debido a que el Cloroformo y metanol son disolventes superiores para la extracción de lípidos, ya que pueden superar la resistencia por las paredes celulares y las membranas, pero son demasiado tóxicos y caro para el uso de producción de combustible a gran escala. La biomasa de la microalga *Scenedesmus*, sometido a una

tecnología de pre-tratamiento disponible comercialmente denominado Enfoque Pulsado (FP), cede 3,1 veces más lípidos crudos y ácido graso de éster metílico (FAME) después de la extracción con una gama de disolventes. Tratamiento FP aumentó la proporción de FAME y lípido crudo por todos los disolventes, lo que significa que la extracción de materiales no lipídicos se redujo al mínimo, mientras que el perfil FAME no tuvo cambios en comparación con el control. Tratamiento FP también hizo posible el uso de sólo una pequeña proporción de cloroformo y metanol, junto con isopropanol, para obtener rendimientos equivalentes de lípidos y FAME como con 100% de cloroformo más metanol.

En el año 2004, Los autores Domenico Voltolina *et al.*, hicieron un estudio de la extracción de Nitrógeno y reciclado para *Scenedesmus obliquus* en cultivos semicontinuos en las aguas residuales artificial, se mantuvieron con 30% y 40% diluciones diarias y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 14:10 h, con temperaturas de 25.5 y 17 °C durante la luz y horas de oscuridad. Bajo este régimen, la producción de la biomasa orgánica fue de 39.3 y 25.2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para los 30% y 40% diluciones, y 24.9 y 16.7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de las proteínas de una sola célula. La mayor parte de la eliminación de nitrógeno tuvo lugar durante las horas de luz, con un total diario de 9.27 y 8.45 mg L<sup>-1</sup> para el 30% y el 40% diluciones. Primero, 43,7% de nitrógeno eliminado se recicló por las microalgas dentro de las proteínas y otro contenido celular con nitrógeno orgánico, pero esta eficacia se redujo hasta el 26,4% cuando las diluciones se elevaron a 40%.

El 2014, los autores Hong-Yu Ren *et al.*, realizaron una investigación que se basó en los efectos de Fe<sup>3+</sup> + (0 a 0,12 g / L), Mg<sup>2+</sup> + (0 a 0,73 g / L) y Ca<sup>2+</sup> + (0 a 0,98 g / L) en la acumulación de biomasa y de los lípidos de microalga *Scenedesmus dimorphus* en ambiente oscuro. La producción de biomasa y de lípidos tuvo una tendencia creciente con el aumento de las concentraciones de iones metálicos. En los cultivos con 1.2 x 10<sup>-3</sup> g / L Fe<sup>+3</sup>, 7.3 x 10<sup>-3</sup> g / L Mg<sup>+2</sup> y 9.8 x 10<sup>-4</sup> g / L de Ca<sup>+2</sup>, la biomasa máxima, contenido total de lípidos y la productividad de lípidos alcanzó 3.49 g / L, 47.4% y 275.7 mg / L / d, respectivamente. Lo más importante, es la adición del EDTA (1.0 x10.3 g / L) mejorando la solubilidad de los iones metálicos (hierro y calcio) y aumento la viabilidad de las microalgas promoviendo la acumulación de lípidos. En comparación con el control, el contenido de lípidos y los lípidos

de la productividad total aumentó 28.2% y 29.7%, respectivamente. En conclusión, las concentraciones adecuadas de iones metálicos y EDTA en el medio de cultivo fueron beneficiosas en acumulación de lípido en las células *Scenedesmus sp.*

De acuerdo al estudio que realizó Jaramillo en el año 2011, fue estudiar la producción de biodiesel y Bioetanol a partir de microalgas ricas en aceite y almidón a bajo costo. Todo esto respetando la tierra cultivable para alimentos siendo amigable con el ambiente. Para esto se evalúa el proceso de producción y su impacto económico, ambiental y social. Todo lo anterior fue analizado desde la óptica de procesos multiproducto aproximados a biorefinerías. Además de examinar a nivel experimental el cultivo de biomasa de microalga en sistemas heterotróficos adecuados a las necesidades de monitoreo y en sistemas cerrados tipo fotorreactor.

Los autores M. Scarsella *et al.*, 2011, realizaron un estudio en donde el objetivo de su trabajo fue cuantificar el estrés generado por la tensión mecánica de algunos equipos utilizados en plantas de cultivos masivo de microalgas (centrífugas y bombas de aire, e inyector) y sus efectos sobre la población de microalgas. Se probaron dos especies de microalgas: *Chlorella vulgaris* (unicelulares) y *Scenedesmus dimorphus* 1237 (colonial). La evaluación del efecto de cizallamiento en el crecimiento de algas se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia, la actividad fotosintética (evolución del oxígeno) y la fluorescencia de la clorofila variable. El desarrollo global de la célula se efectúa por inspección visual y dispersión de la luz. El uso de bombas centrífugas para el cultivo fue fuertemente afectado en el crecimiento de *C. vulgaris*, mientras que los efectos de los inyectores se limitaron a la rotura total de *S. dimorphus*. Los análisis de los datos experimentales se apoyaron en el cálculo considerado del estrés hidrodinámico, cuales son: velocidad de cizallamiento, esfuerzo cortante, los volúmenes de estrés / tiempo, las tasas de disipación de energía, y el tamaño de turbulencia en microescala.

De acuerdo a los estudios realizados por Beatrice G. Terigar *et al.*, 2013, Su investigación se basa en el cultivo de tres especies de algas para la producción de biodiesel, cuales fueron

*Nannochloris sp.*, *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus dimorphus*, estas especies fueron cultivadas en un sistema de flujo continuo al aire libre, se tomaron en cuenta los parámetros que afectan en la productividad de los lípidos, tales como: contenido de lípidos, tasa de flujo en cultivo o tiempo de retención hidráulica, y la concentración de biomasa. Sin embargo, estos parámetros están interrelacionados y no puede ser alterado de forma independiente. Su objetivo fue sondear la interdependencia entre estas variables y la maximización de los lípidos en cultivos de algas al aire libre. Estas tres especies de algas fueron cultivadas en cuatro diferentes tiempos de retención hidráulica (TRH) de 6, 12, 18 y 24 h. La concentración más alta de células de la biomasa (250 mg / L) se produjo en la TRH más largo (24 h) y disminuyó progresivamente con un TRH más cortos. Sin embargo, los números de Tasa de productividad de biomasa área no sigue un patrón específico. La más alta tasa de productividad aérea fue de 43,4 g / m<sup>2</sup> / día se logró con la especie *Nannochloris sp.* en 6 h TRH, en comparación con 32,1 g / m<sup>2</sup> / día a 24 h TRH con la especie *S. Capricornutum*. La productividad de lípidos se encontró en una alta tasa en 24 h HRT, el logro de 7.9; 9.6 y 10.4 g / m<sup>2</sup> / día para *Nannochloris sp.*, *S. capricornutum*, y *S. dimorphus* respectivamente. Cuando el flujo en medio de cultivo fue reducido, las concentraciones de lípidos aumentaron a expensas de proteínas, carbohidratos y contenido celular.

Un estudio realizado por Ying Shen *et al.*, 2009 se dio en *Scenedesmus dimorphus* y *C. protothecoides*. Al final del cultivo, los lípidos de las biomásas de algas se fueron extraídos por cinco diferentes métodos: (1) extracción directa con un extractor Soxhlet; (2) tratamiento con ultrasonidos; (3) Prensa francesa; (4) batidor de bolas; y (5) la molienda en húmedo. Un extractor Soxhlet es un equipo de laboratorio para extraer lípidos a partir de un material sólido. La prensa francesa rompe las células al pasar a través de un tubo estrecho bajo alta presión. El batidor de bolas utiliza bolas para romper la pared celular para hacer que el lípido salga. La sonicación se realizó dos veces y cada vez por 2 minutos. de prensa francés aplicó a 1500 psi durante 5 corridas y batidor de bolas corrió con perlas de vidrio de 1 mm por 2 minutos de corrida y molienda húmeda fueron 3 veces. Después de extraer los lípidos de la biomasa bajo diferentes métodos de permeabilización, etanol / hexano (1: 1, v / v) y hexano se añadieron a cada muestra por separado.

Para todos los cinco métodos, también se utilizó la misma solución de disolvente. A continuación, la biomasa en tubos con disolvente se dejó durante la noche en un multi-shaker. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separó y después se secó en un horno a 95 °C durante 1,5 horas. El contenido de lípidos de ambas cepas de microalgas, *S. dimorphus* y *C. protothecoides*, que se recuperaron usando estos cinco diferentes métodos con permeabilización etanol / hexano (1: 1, v / v), se muestra en la figura 1. La base en los resultados de la molienda húmeda seguido de la extracción con hexano tenía el más alto contenido de lípidos para *S. dimorphus* y grano batidor tenía el más alto contenido de lípidos para *C. protothecoides*. Las diferencias significativas entre estas dos especies en tamaño y forma pueden dar cuenta de la diferencia en su respuesta a las técnicas de permeabilización. El uso de la molienda húmeda como un método de permeabilización tiene algunas ventajas como la recuperación del aumento de lípidos, de fácil operación y de bajo costo en el proceso de mantenimiento. Otro método tales como soxhlet, sonicación, prensa francesa y grano batidor, que fueron utilizados en este estudio, son caros con bajo contenido de lípidos.

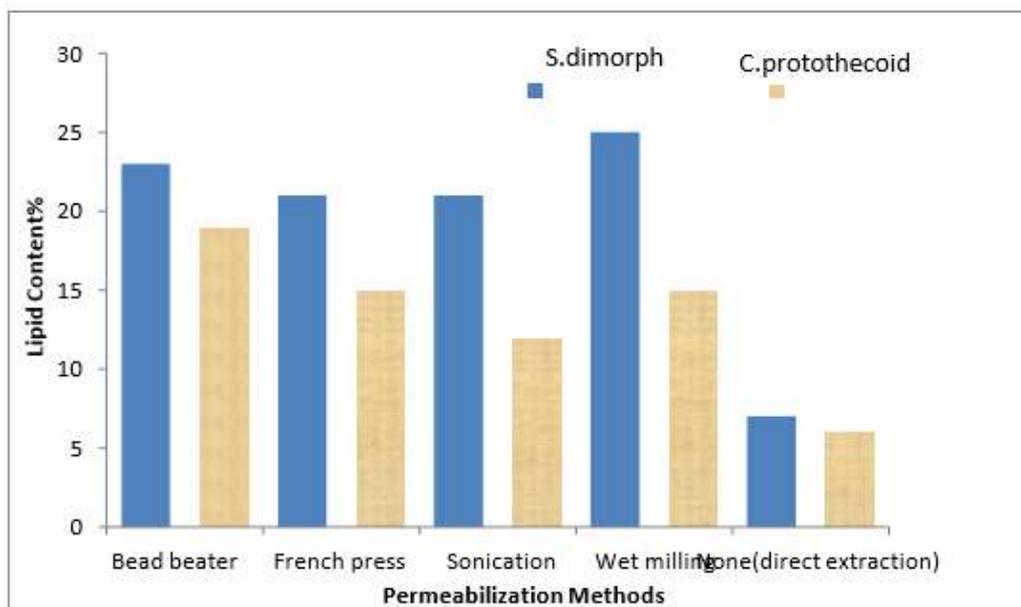


Figura 1. Efecto por los diferentes métodos de extracción en el contenido de lípidos de *C. protothecoides* y *S. dimorphus* (fuente: Ying Shen et al., 2009).

Lee *et al.*, 2010, llevaron a cabo varios experimentos de permeabilización en tres diferentes especies de microalgas; *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*, Para identificar el método más efectivo. En su trabajo, se llevaron a cabo cinco métodos diferentes, incluyendo autoclave a 1250 °C y 1,5 mPa, centrifuga de 0,1 mm de diámetro a una alta velocidad de 2800 rpm, horno microondas a 1000 °C y 2450 MHz, y sonicación a 10 KHz. Todos los procesos experimentales se realizaron en 5 minutos, y el sistema de disolvente fue cloroformo / metanol (1: v / v 1). Como se muestra en la figura 2, Sus resultados mostraron que más alto contenido en lípidos se obtuvo en cada una de las tres especies cuando se utiliza el método de microondas. La sonicación produjo más baja cantidad de lípidos, mientras que los resultados con la autoclave se mezclaron.

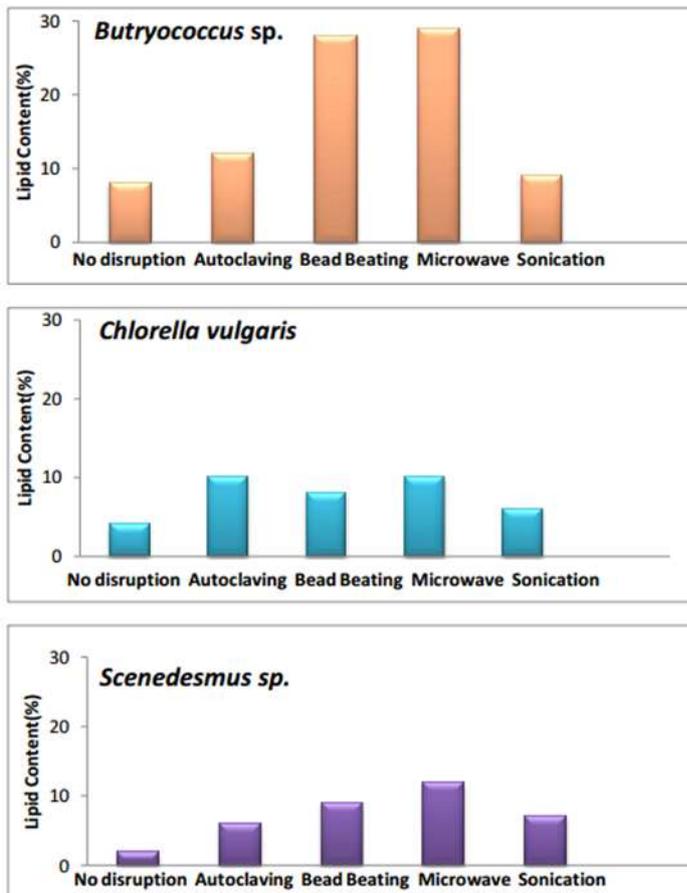


Figura 2. Efectos en los contenidos de lípidos de las tres diferentes especies de microalgas (fuente: Lee et al., 2010).

Ying Shen *et al.*, 2009 también estudiaron el efecto del nitrógeno sobre el contenido de lípidos de *S. dimorphus* y *C. protothecoides* microalgas. Se eligieron estas dos cepas debido a sus características bien estudiados y los identificaron como buenos candidatos como Renaud en el año 1994 y Xiong en el año 2008. Las algas se inocularon en medio MB esterilizada; KNO<sub>3</sub> fue reemplazado por urea, nitrato y glicina como diferentes fuentes de nitrógeno. El sistema usado en este experimento era un sistema de alimentación por escala. Los efectos de la fuente de nitrógeno en estas microalgas se muestran en la figura 3. El contenido máximo de biomasa y de los lípidos alcanzado por *S. dimorphus* en 17 días se encontraban en niveles altos de nitrato y de urea, y baja en glicina. Los rendimientos de lípidos en la urea eran por lo menos 38% mayor que en medio de nitrato y un 48% mayor que la media de glicina. Los efectos de las fuentes de nitrógeno en *C. protothecoides* se muestran en la. Esto demuestra que, en contradicción con la cepa de *S. dimorphus*, *C. protothecoides* produce más lípidos en baja concentración de nitrógeno y se concluye también que el nitrato era la mejor fuente de nitrógeno para la producción de lípidos. Contenido máximo de lípidos en medios de nitrato era 103% más alto que los medios de urea y 38% más alto que los medios de extracto de levadura.

Nitrogen source	Nitrogen concentration	Biomass (DW) (g/L)	Lipid yield*(g/L)
Nitrate	Low (A-1)	0.9 ±0.1	0.21 ±0.01
	Medium (A-2)	1.0 ±0.1	0.22 ±0.01
	High (A-3)	1.2 ±0.1	0.29 ±0.01
Urea	Low (A-4)	1.0 ±0.1	0.32 ±0.01
	Medium (A-5)	1.1 ±0.1	0.31 ±0.01
	High (A-6)	1.3 ±0.1	0.40 ±0.01
Glycine	Low (A-7)	1.2 ±0.1	0.27 ±0.01
	Medium (A-8)	NS	NS
	High (A-9)	NS	NS

*Nota: \* Los Lípidos fueron obtenidos por una centrifuga seguido por una extracción de hexano.*

Figura 3. Los efectos del nitrógeno en el peso de la biomasa seca (DW) y LY de *S. dimorphus* (Fuente: Ying Shen., 2009)

## 1.5 OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la cantidad de biomasa y porcentaje de lípido que se obtiene con un medio de cultivo Bayfolan para *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin).

### Objetivos específicos

Determinar cuál de los tres medios de cultivo (Bayfolan, Guillard y BG-11) se obtiene un mayor efecto sobre el crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin).

Determinar la cantidad de biomasa que se obtiene con el medio de cultivo Bayfolan para, *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin).

Determinar el porcentaje de lípido que se obtiene con el medio de cultivo Bayfolan para, *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin).

## 1.6 LIMITACIONES

Debido a limitaciones de tiempo no se pudo culminar con la extracción de biodiesel, tampoco se pudo implementar el sistema con otras especies de microalgas para comprobar cual cepa tiene mejor rendimiento en la producción del biocombustible. Además, no se pudo evaluar la calidad de aceite que se extrajo de la biomasa de *S. dimorphus*.

# CAPITULO II : MARCO TEÓRICO

## 2.1 BASES TEÓRICAS

### 2.1.1 Teoría sobre Biotecnología ambiental (Eloy Becares, 2014)

La biotecnología ambiental suele entenderse como la aplicación de las herramientas y métodos biotecnológicos a la solución de los problemas ambientales, sin embargo, para muchos biotecnólogos también debe incluir aquellas biotecnologías que utilizan la naturaleza como origen o destino de sus productos (vegetal, acuicultura, etc.). En su primera definición la biotecnología ambiental puede considerarse la unión de dos grandes disciplinas, la biotecnología, con sus procesos y herramientas (ingeniería genética, metagenómica, metabólica, biocinética, etc.) y de la ecología (autoecología, competencia, depredación, ciclos biogeoquímicos, etc). La combinación de ambas disciplinas tiene un prometedor futuro debido, desgraciadamente, al rápido incremento de los problemas medioambientales.

La biotecnología ambiental ha tenido un crecimiento extraordinariamente debido a que durante los últimos diez años ha surgido la necesidad de desarrollar fuentes de suministros y materiales relacionados con la producción de biodiesel. Los consumidores son cada vez más conscientes del entorno ambiental y ecológico a consecuencia del cambio climático. Se muestra mayor selectividad en el consumo de productos. Tanto las empresas medianas como las grandes de base tecnológica. Por estas razones, Biotecnología ambiental es una base para la creación y producción de diferentes sistemas para la producción de biodiesel a partir de *S. Scenedesmus obliquus var. Dimorphus*.

Para la extracción del biodiesel mediante el proceso químico de transesterificación que mediante reactivos tales como el alcohol (metanol) en presencia de un catalizador llamado metóxido de Potasio (KOH), se rompe químicamente la molécula del triglicérido, reemplazando los glicéridos del aceite por el alcohol, formando un éster graso y obteniendo glicerol como

subproducto luego se separa la glicerina por un proceso de decantación y se purifica el aceite con agua destilada obteniendo el biodiesel.

Las moléculas lineales del éster resultante reciben el nombre de biodiésel y están formadas por el éster del ácido graso y el alcohol. Estas moléculas tienen menor viscosidad, menor masa molecular, menor intervalo de ebullición y menor punto de inflamación que el triglicérido original.

### **2.1.2 Teoría Bioestadística (Carrasco de la Peña, 1982)**

La Bioestadística nos enseña y ayuda a investigar en todas las áreas de las Ciencias de la Vida donde la variabilidad no es la excepción sino la regla”. Estadística me ayudara con el análisis e interpretación de datos y resultados que tenga en la parte experimental y también en la muestra poblacional (algas), ya sea para ayudar en la toma de decisiones o para explicar condiciones regulares o irregulares de algún fenómeno o estudio aplicado, de ocurrencia en forma aleatoria o condicional. Además, la estadística me permite llevar a cabo el proceso relacionado con la investigación científica.

### **2.1.3 Teoría Ficológica (Jesús Izco, 1997)**

Es una disciplina de la Botánica que me brinda conocimientos científicos acerca de *S. obliquus var. dimorphus*, tales como su taxonomía, fisiología, morfología y hábitat. De esta manera, puedo conocer con mayor profundidad la materia prima para así poder manipular las condiciones ambientales y adecuarla en un sistema cerrado (Fotobiorreactores) para su adaptabilidad.

Uno de los problemas que se mencionan para *S. obliquus var. dimorphus* es considerada un alga verde pesada, debido a que forma sedimentos gruesos si no se mantiene en agitación constante. La agitación no sólo es necesaria para evitar la sedimentación de las algas, además se asegura de que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y

nutrientes, y también mejora el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. Este último es de importancia primordial en cuanto el aire contiene la fuente de carbono para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono.

Los nutrientes en el cultivo de *S. obliquus var. Dimorphus* proporciona los materiales necesarios para el crecimiento de algas. El nitrógeno y fósforo, especialmente el nitrógeno, son los factores más importantes que regulan su crecimiento y esto influye en gran medida en el rendimiento de lípidos. En situaciones limitadas de nitrógeno, el contenido de lípidos algas generalmente aumenta como mecanismo de supervivencia, lo que hace que las células dejen de sus divisiones y empiezan a almacenar energía en forma de lípidos. Para nuestro esfuerzo, *S. obliquus var. dimorphus*, se ha demostrado con datos experimentales que la mejor fuente para su crecimiento es urea. La urea es un compuesto orgánico con la fórmula química  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . El experimento llevado a cabo por la Universidad del Estado de Kansas ha demostrado su eficacia el uso de medio basal ligeramente modificada, reemplazando la fuente de nitrógeno  $\text{KNO}_3$  por urea ( $\text{KNO}_3$ ) a 1,8 gm  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . En la siguiente figura 5, se observa la morfología del *Scenedesmus dimorphus*

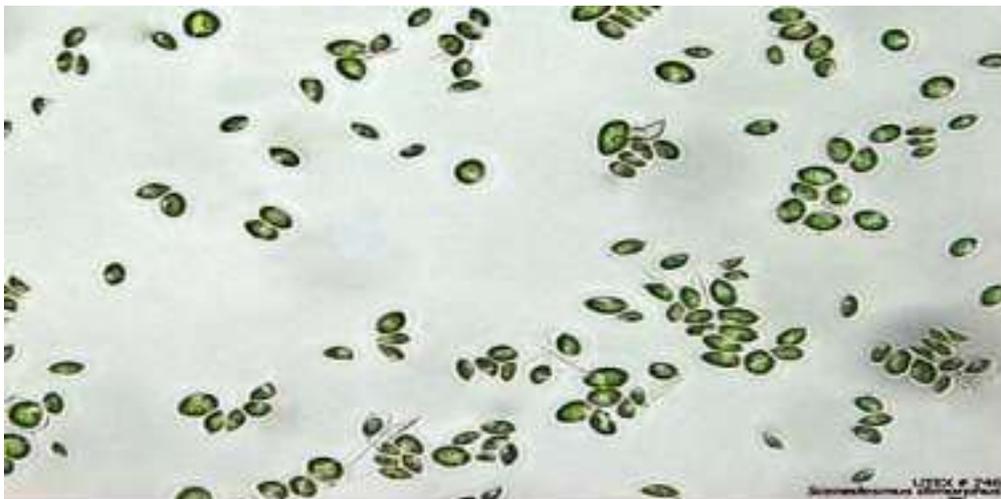


Figure 4: *Scenedesmus dimorphus* image (Fuente: Hegewald., 1982).

### 2.1.4 Teoría Bioquímica (Nelson, 1994)

“Es una ciencia que estudia la composición química de los seres vivos, también las reacciones químicas que sufren los compuestos (metabolismo) que les permiten obtener energía (catabolismo) y generar biomoléculas propias (anabolismo)”. Por tal razón, nos ayuda a entender los procesos químicos que ocurren en la producción de biodiesel (la transesterificación).

La composición bioquímica de *Scenedesmus obliquus var. Dimorphus* tiene un contenido de lípidos de 16 - 40%.

En la siguiente figura 5. Muestra las diferentes composiciones químicas para cada especie de algas en material seco.

Strain	Protein	Carbohydrate	Lipid Content (%dw)	Nucleic Acid
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Figura 5. Composición química de alga expresa en material seco (%) (Fuente: Becker., 1994)

### **2.1.5 Teoría Termoquímica (Pérez Cruz, 2005)**

Es el estudio de las transformaciones que sufre la energía calorífica de las reacciones químicas, surgiendo como una aplicación de la termodinámica a la química. Estos métodos se basan en la utilización del calor como fuente de transformación de la biomasa.

## **2.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS USADOS**

Fotobiorreactores

Es un sistema capaz de generar la fotosíntesis de las clorofilas existentes en los ecosistemas marinos con el fin de producir microalgas, tanto para propósitos de investigación multidisciplinar, como para la obtención de biocombustibles alternativos.

*Scenedesmus obliquus var. dimorphus*

Es una microalga verde, en forma de frijol de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de tamaño. Categorizado como un alga pesada por poseer paredes celulares muy gruesas.

Biomasa

La biomasa es el conjunto de recursos forestales, plantas terrestres y acuáticas, y de residuos y subproductos agrícolas, ganaderos, urbanos e industriales. Esta fuente energética puede ser aprovechada mediante su combustión directa a través de su transformación en biocombustible.

Lípidos

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas (la mayoría biomoléculas), que están constituidas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida por oxígeno.

También pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos cumplen funciones diversas en los organismos vivos, entre ellas la de reserva energética (como los triglicéridos), estructural (como los fosfolípidos de las bicapas) y reguladora (como las hormonas esteroideas).

## 2.3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

### Hipótesis General

Con el medio Bayfolan se obtiene la mayor cantidad de biomasa y porcentaje de lípido, en el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus var dimorphus* (Turpin), con respecto a los resultados obtenidos con Guillard o con el BG-11.

### Hipótesis Específicas

Con el medio de cultivo Bayfolan se obtiene mayor efecto en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus*, con respecto a los resultados obtenidos con Guillard o con el BG-11.

Con el medio de cultivo Bayfolan para *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) se obtiene la mayor cantidad de biomasa, con respecto a los resultados obtenidos con Guillard o con el BG-11.

Con el medio de cultivo Bayfolan para *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) se obtiene el mayor porcentaje de lípido, con respecto a los resultados obtenidos con Guillard o con el BG-11.

## 2.4 VARIABLES

### 2.4.1 Variables y puntos de referencia

Las variables dependientes son:

VARIABLES	UNIDADES	PTO. DE REFERENCIA
Biomasa	mg. L <sup>-1</sup> /d	86.5 ( <i>Ling Xia., et al 2013</i> )
Lípidos totales	%	42.1 ( <i>Ling Xia., et al 2013</i> )

Biomasa 86.5 (mg. L<sup>-1</sup>/d) que se extraerá de la cantidad de algas verdes (*S. obliquus var. dimorphus*)

Lípidos totales 42.1 (%) que se extraerá de la biomasa obtenida.

Escala espacial: Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Ricardo Palma.

Escala temporal: 1 año y 6 meses

Frecuencia de muestreo: 5 veces por semana por 15 semanas.

Tamaño de muestra 7317 mg. L<sup>-1</sup> de peso seco de células de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* en 30 días.

### 2.4.2 Relación entre variables

Se relacionará la cantidad de biomasa y lípidos con los puntos de referencia.

# CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

## 3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

El desarrollo de este trabajo involucra una estrategia de ejecución: experimentación que describe los materiales y métodos que se llevaron a cabo para evaluar el crecimiento de las microalga *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) y su desempeño en un sistema controlado como fotobiorreactor. Además, se evaluó el crecimiento de las microalga *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) que fueron adquiridas gracias a la donación del Instituto del mar del Perú (IMARPE).



Figura 6. *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) de 12 mL de muestra, donados por el Instituto del mar del Perú (fuente: elaboración propia).

### 3.1.1 Cultivo de Microalgas

En el cultivo de microalgas se adquiere un producto de interés que es la biomasa, pero también provoca un flujo de entradas y salidas. Se evaluó tres tipos de medios de cultivo, cuales fueron: Guillard, BG-11 y Bayfolan. Finalmente, Bayfolan fue seleccionado debido a su bajo costo y poseer los nutrientes necesarios para incrementar la biomasa de la microalga a diferencia de los otros (se puede observar en los resultados).

#### 3.1.1.1 Parametros de cultivo

##### 3.1.1.1.1 Luz

La luz que se suministro fue mediante tubos fluorescentes que emiten, ya sea el espectro luminoso azul o rojo, que son las partes más activas del espectro de luz para la fotosíntesis. Por la noche, o en la oscuridad, no se realiza la fotosíntesis, por lo que las algas consumen energía almacenada para la respiración y, dependiendo de la temperatura y otras condiciones, hasta el 25% de la biomasa producida durante el día se puede perder de nuevo en la noche *dicho por Chist et al., 2007*, por lo tanto, se utilizó un ciclo luz/ oscuridad (14:10) horas y fue programado por un timer.

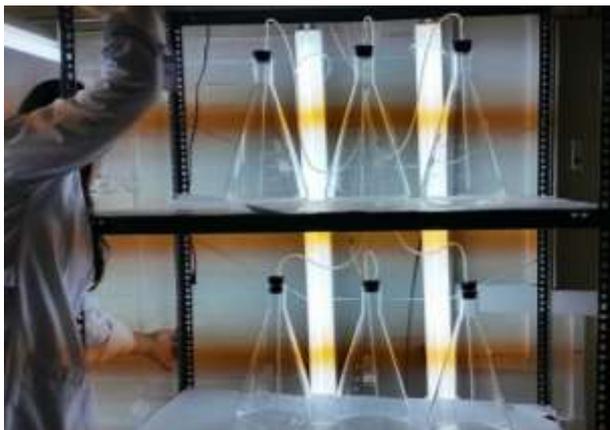


Figura 7. Instalación de luces Fluorescentes para el crecimiento de las algas verdes en los fotobiorreactores. (fuente: elaboración propia).

### 3.1.1.1.2 Dióxido de carbono

Se utilizó una compresora de aire mediante un sistema aireación que está constituida por mangueras, filtros estériles, llaves de aireación cuyo objetivo es suministrar el CO<sub>2</sub> hacia las seis fotobiorreactores de 5L. El suministro de aire fue visualizado por el burbujeo en el sistema de cultivo, pudiendo ser significativo dependiendo de la distancia y la profundidad del agua. Sin embargo, autores como

Ho *et al.*, 2010, han demostrado que la tasa de crecimiento en *S. obliquus dimorphus* puede aumentar con el aumento de nivel de CO<sub>2</sub> hasta un 20%. Pero hay contradicción de estudios que han demostrado la tasa de crecimiento en *S. dimorphus* se maximiza el nivel de CO<sub>2</sub> al 6% dicho por el autor Morais en el año 2007, a continuación, el nivel de CO<sub>2</sub> se debe supervisar de cerca dado que las algas son sensibles a los cambios de pH, el exceso de CO<sub>2</sub> puede formar ácido carbónico con agua y acidificar los niveles de pH de los medios de cultivo. Por ejemplo, el autor Nalewajko *et al.*, 1997, la tasa de crecimiento de *S. acutus* se redujo 50% a pH 5 e incluso crecimiento se detuvo a pH 4,8.

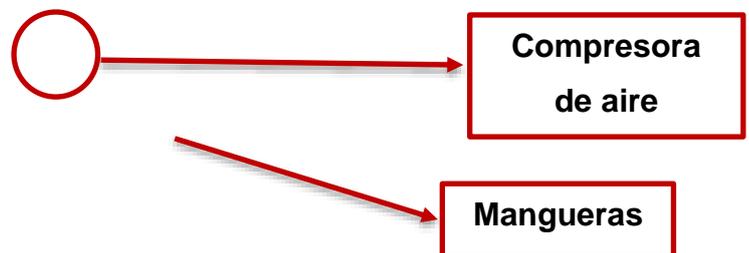


Figura 8. Instalación de sistema de aire para los fotobiorreactores (fuente: elaboración propia).

### 3.1.1.1.3 Nutrientes

Las algas necesitan nutrientes para crecer, siendo los más importantes nitrógenos (N) y fósforo (P) estos dos elementos fueron suministrados por una fórmula llamada concentración de nutrimentos llamada Bayfolan Forte, que contiene vitaminas y fitohormonas, estimula los procesos metabólicos. Generalmente es utilizado para cultivos estén en etapa de desarrollo vegetativo o en producción intensiva. Ver en la figura 9.

<b>ANÁLISIS GARANTIZADO:</b>	<b>Porcentaje en peso/peso</b>
Nitrógeno total (N) .....	11.470%
Clorhidrato de tiamina .....	0.004%
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) .....	8.000%
Azufre (S) .....	0.230%
Potasio como (K <sub>2</sub> O) .....	6.000%
Calcio (CaO) .....	0.025%
Boro (B) .....	0.036%
Cobalto (Co) .....	0.002%
Cobre (Cu) .....	0.040%
Manganeso (Mn) .....	0.036%
Fierro (Fe) .....	0.050%
Magnesio (MgO) .....	0.025%
Molibdeno (Mo) .....	0.005%
Ácido Indol Acético .....	0.003%
Zinc (Zn) .....	0.080%

Figura 9. Medio de cultivo Bayfolan (Fuente: BAYER de México., 2010)



→ **Bayfolan**

Figura 10. Preparación de medio Bayfolan Forte en Erlenmeyers de 5 L. (fuente: elaboración propia).

#### 3.1.1.1.5 Temperatura

La temperatura es el factor limitante más importante, después de la luz, para los cultivos de algas en sistemas abiertos y cerrados al aire libre. La temperatura ideal a mantener en los cultivos debe ser lo más cercana posible a la temperatura del hábitat natural de los organismos (o temperatura de recolección) En nuestro caso el *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin), es un alga verde de agua dulce en la que vive en clima templados (10-25 °C) y se le puso a 22 ° C. Por otro lado, el autor Chisti *et al.*, 2007, los sistemas cerrados pueden llegar a calentarse demasiado y requieren de refrigeración como aire acondicionado, que se puede hacer con intercambiadores de calor.

### 3.1.1.1.6 Agitación de medio

La agitación es necesaria para evitar la sedimentación de las algas, garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y a los nutrientes, evitar la estratificación térmica y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire; esto último es de vital importancia, ya que, el aire contiene CO<sub>2</sub>, fuente de carbono para la fotosíntesis.

A la mayoría de cultivos les va bien con una baja agitación, sobre todo cuando no están muy concentrados, pero siempre que sea posible, se recomienda suave agitación manual diaria. De esta manera se puede tener éxito en la obtención de cierto control sobre la composición de las poblaciones microalgales, incluso a gran escala dicho por los autores *De Pauw et al., 2011*.

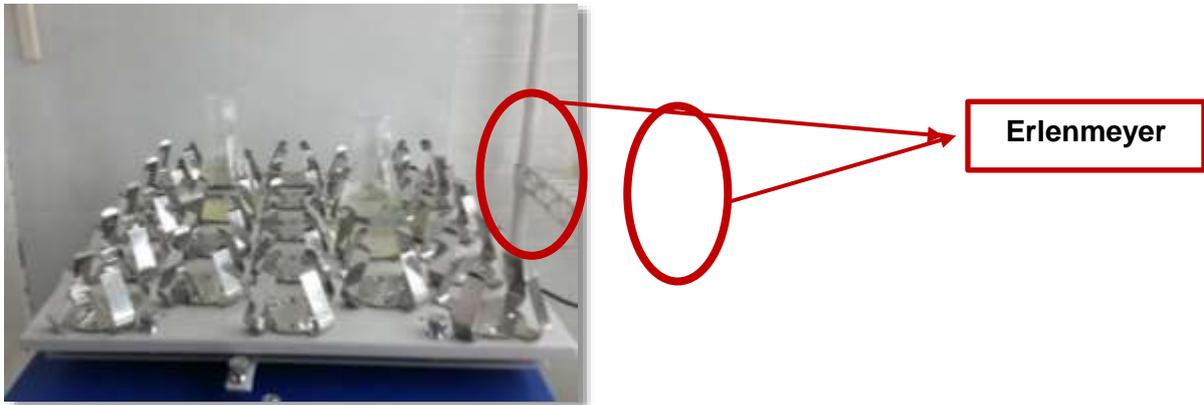


Figura 11. Solución de *S. dimorphus* dentro de matraces y en constante agitación por un Multi-shaker. (fuente: elaboración propia).

## 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

### 3.2.1 Método de Cultivo

El tipo de cultivo que se realizó es llamado “Cultivo a escala intermedia” y es debido a que el trabajo fue realizado dentro de las instalaciones en el laboratorio de biotecnología Ambiental de la facultad ciencia Biológicas (Universidad Ricardo Palma), y no se necesitaría volúmenes grandes de algas. Por esta razón, se instaló un ambiente adecuado para realizar cultivos a escala, utilizando 42 Erlenmeyers (total) de diferentes capacidades: 100mL (6), 250mL (6), 500mL (6), 1L (6), 2L (6) y 5L (6). El experimento consistió en la inoculación de *S. dimorphus* en diferentes tipos de medios, tales como Guillard, BG-11 y Bayolan comenzando con un volumen de 50 mL. Después de la inoculación, se tomaron muestras diariamente para el conteo de la densidad poblacional y de esta forma controlar la tasa de crecimiento. El propósito de este trabajo fue determinar la tasa de crecimiento de la biomasa y de los lípidos durante Las fases de latencia, exponenciales, estacionarias y fase de muerte, también se determinó el tiempo que demora la biomasa para llegar a la fase estacionaria que es el tiempo óptimo para pasar la biomasa a la siguiente escala.

Una típica curva de crecimiento de cultivo discontinuo se muestra en la Figura 6. La curva de crecimiento tiene cuatro fases: 1) Fase de latencia, 2) fase de crecimiento o fase exponencial, 3) fase estacionaria y 4) fase de muerte. La fase de latencia se produce justo después de la inoculación como las células se ajustan al nuevo entorno. La fase de crecimiento o fase exponencial sucede cuando el cultivo tiene gran cantidad de nutrientes y la tasa de crecimiento es independiente de la concentración de nutriente. Las células comienzan la transición a la fase estacionaria cuando ya sea agotado el nutriente o el subproducto tóxico se ha acumulado. Durante la fase estacionaria la tasa de crecimiento es cero, pero la función metabólica, tal como la producción de lípidos es todavía activo. La fase de muerte sucede cuando todas las funciones metabólicas se han detenido según Shuler en el año 2002. Ver en la figura 12.

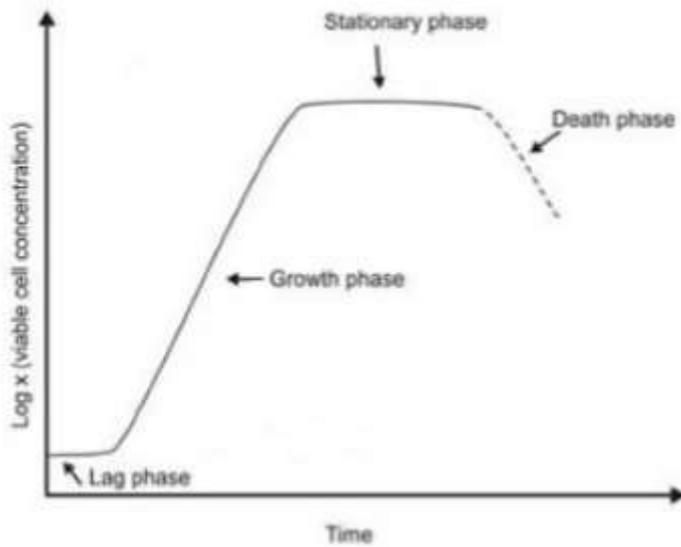


Figura 12. Típica curva de crecimiento (fuente: Shuler., 2002).

### 3.2.1.1 Semi-Continuo

Se realizó la inoculación del medio de cultivo con *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) mediante una cámara flujo laminar para disminuir el riesgo de contaminación con Erlenmeyers debidamente esterilizados por Autoclave. El cultivo entonces se desarrolla rápidamente. El volumen cosechado se sustituye por medio del cultivo recién preparado y el proceso se repite 5 días después. De esta manera se amplía la vida del cultivo e incrementándose el rendimiento de la biomasa celular.



Figura 13. Sistema de cultivo semi-continuo a escala en laboratorio. (fuente: elaboración propia).

## 3.2.2 Sistema de Cultivo

### 3.2.2.1 Sistema Cerrado

La producción de *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) por ser una alga muy susceptible, frágil y difícil de cultivar siendo una de sus principales razones por poseer paredes gruesas lo que hace que se sedimente rápidamente y cubra a las otras microalgas en la fase exponencial (si no hay una buena agitación), de esta manera impide la captación de la radiación UV, convirtiendo a la densidad poblacional vulnerable contra el desplazamiento de otra especie. Por tal razón es preferible que *S. dimorphus* se ha cultivada en un sistema cerrado ya que tiene menor riesgo de contaminación que en estanques abiertos. Las células de algas se mantuvieron en su fase de crecimiento por 6 biorreactores estériles de cultivo de 5 L. La inoculación se realiza en medio de Bayfolan Forte y se roció CO<sub>2</sub> mediante una compresora de forma continua.



Figura 14. Inoculación de *Scenedesmus dimorphus* a Erlenmeyer de dos litros dentro de una cámara flujo laminar (fuente: elaboración propia).

### 3.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

#### 3.3.1 Medio de Guillard

Se esterilizo 1 L de agua destilada mediante una autoclave a 120°C por 45 min.

Se esterilizo 3 Erlenmeyer de 150 mL, 3 pipetas (1,5 y 10 mL) y 4 tubos de ensayo mediante una autoclave a 120 °C por 45 min.

Se esterilizo las Vitaminas por filtración.

Se mezcló todos los componentes mediante una agitadora magnética para la preparación del medio de cultivo Guillard f/2.

Se mezcló los componentes que conforman el medio Guillard f/2. Se agregó el medio Guillard f/2 al litro de agua destilada.

Se mantuvo el medio Guillard f/2 en refrigeración a 12°C.

Panel fotográfico se ver en anexo 1.

Compuesto	Sol Stock	Cantidad
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L H <sub>2</sub> O destilada	1 mL
NaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5g/L H <sub>2</sub> O destilada	1 mL
Sol. Metales traza		1 mL
Sol. Vitaminas		0.5 mL

Figura 15. Compuestos químicos para Guillard f/2 (fuente: elaboración propia).

Compuesto	Sol Stock	Cantidad
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O		4.3 g
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O		3.15 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8 g/L	1 mL
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22 g/L	1 mL
CuCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 g/L	1 mL
MnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	180 g/L	1 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	63 g/L	1 mL

Figura 16. Metales pesados para el medio de cultivo Guillard f/2. (fuente: elaboración propia).

Metales pesados y vitaminas	1000 mL	300 mL
NaNO <sub>3</sub>	1 mL	0.3 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mL	0.3 mL
Vitamina B12	1mL	0.3 mL
Biotina	1mL	0.3 mL
Tiamina	0.5 mL	0.15 mL

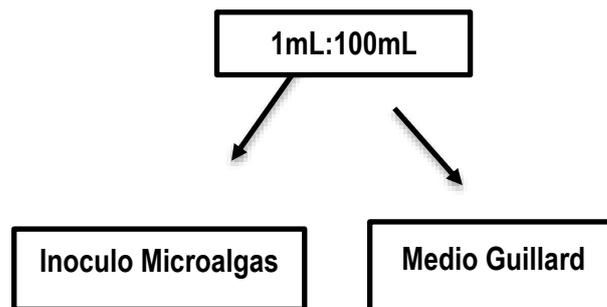
Figura 17. Mestales pesados y vitaminas (fuente: elaboración propia).

*\*\*Nota: Se preparó Stock de 300 mL de Metales pesados y vitaminas (B12, Biotina y Tiamina).*

### INOCULACIÓN:

Se inculo 1 ml en por cada 100 mL de medio Guillard en Erlenmeyer de 250 mL.

Crecimiento:



### 3.3.2 Preparación de medio BG-11

Procedimiento:

Se esterilizo 1 L de agua destilada mediante una autoclave a 120°C por 45 min.

Se esterilizo 3 Erlenmeyer de 150 mL, 3 pipetas (1,5 y 10 mL) y 6 tubos de ensayo mediante una autoclave a 120 °C por 45 min.

Se autoclavó 1 L de agua destilada a 120°C por 45 min.

Se mezcló los componentes que conforman el medio BG-11.

se esterilizo las vitaminas por filtración.

Se agregó el medio BG-11 al litro de agua destilada.

Se mantuvo el medio de cultivo BG-11 en refrigeración a 12°C.

El panel fotográfico se en el anexo 2.

Componentes	mg/L	g/L	mL
NaNO <sub>3</sub>	1500	1,5	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40	0,04	0,02
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	0,02	0,01
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	75	0,075	0,0375
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	36	0,036	0,018
EDTA	1	0,001	5 mL
Citrato férrico de Amonio	6	0,006	5 mL
Ácido cítrico	6	0,006	5 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	0,00286	5 mL
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81	0,00181	5 mL
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,22	0,00022	0,5 mL
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079	7,9 x 10 <sup>-5</sup>	0,5 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39	0,00039	0,5 mL
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049	4,9 x 10 <sup>-5</sup>	0,5 mL

Figura 18. Compuestos químicos para el medio de cultivo BG-11. (fuente: elaboración propia).

### **3.3.3 Preparación del medio de cultivo Bayfolan**

Procedimiento:

Se esterilizo 2 tubos de ensayo y un Erlenmeyer, 3 placas Petri (pequeñas), pipetas y tapones mediante una autoclave a 120°C por 45 min.

Se agregó 1 mL de la formula Bayfolan Forte en un litro de agua destilada.

Se esterilizo el litro de medio de Bayfolan Forte mediante una autoclave a 120°C por 45 min.

Se dejó reposar el medio Bayfolan Forte esterilizado a T° de ambiente por 24h.

Se inoculo cepa pura de *S. dimorphus* en los tres tubos de ensayo.

Se realizó la prueba de pureza por Agar Nutritivo de los dos tubos de ensayos y un Erlenmeyer rotulados por 1, 2 y 3 respectivamente.

Se inoculo en 4 tubos de ensayo.

El panel fotográfico se ve en el anexo 4.

### **3.4 PRUEBA DE PUREZA DE AGAR NUTRITIVO**

Se utilizó la prueba de pureza por Agar nutritivo con el fin de verificar que en los medios de cultivos se encontraban libres de contaminación por bacterias, hongos u otros, ver en el anexo 3. Este procedimiento consistió que en tres tubos de ensayo con medio Bayfolan con el extracto de *Scenedesmus dimorphus* provenientes de tres distintos Erlenmeyers en escala de 250 mL, luego se rotula del 1 al 3 para posteriormente ser sembradas en tres placas Petri con Agar nutritivo, Finalmente, en un periodo de tres días se verifica si hubo crecimiento de organismo invasores en dichas placas.

### **3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS**

En las figuras 19 y 20, se presenta el listado de materiales y equipos necesarios para el trabajo experimental de cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) para la obtención de biomasa y lípidos (materia prima) para la transformación a Biodiesel. Los equipos a ser utilizados deben ser calibrados de acuerdo a sus respectivos manuales.

<b>Materiales</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>
Cepas de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	14	mL
Pipetas de 1 mL	3	und.
Pipetas de 5 mL	4	und.
Pipetas de 10 mL	4	und.
Pipetas de 20 mL	2	und.
Micropipetas	100	und.
Tubos de Vidrio	12	und.
Matraces Erlenmeyer 50 mL	6	und.
Matraces Erlenmeyer 150 mL	6	und.
Matraces Erlenmeyer 250 mL	6	und.
Matraces Erlenmeyer 500 mL	6	und.
Matraces Erlenmeyer 1 L	6	und.
Matraces Erlenmeyer 2 L	6	und.
Matraces Erlenmeyer 5 L	6	und.
Eppendorf	20	und.
Placas Petri	15	und.
Jeringas de 10 mL	20	und.
Papel Craff	5	mt
Papel Aluminio	5	mt
Pabulo	3	mt
Mangueras de Silicón (Grueso)	10	mt
Mangueras de Silicón (delgado)	25	mt
Filtros esterilizados	11	und.
Filtros	20	und.
Nutrientes Agrícolas Bayfolan	1	L
Alcohol Isopropílico	750	mL
Hexano	500	mL
Etanol de 96°.	1	L
Hipoclorito	1	L
Detergente industrial.	1	K
Metanol p.a.	1	L
Guantes quirúrgicos	100	und.
Mascarillas	100	und.
Sulfato de fosforo Heptahidratado	1	K
Cloruro férrico	85	g
Sulfato férrico	100	g
Sulfato de Aluminio	50	g

Figura 19: Materiales (fuente: elaboración propia).

Equipos o Instrumento	Cantidad	Unidad
Cámara Flujo Laminar	1	und.
Autoclave	1	und.
Multi-shaker	1	und.
Comprensora de aire	1	und.
Llaves de conexiones y salida de aireación	20	und.
Destiladora	1	und.
Balanza analítica de Precisión	1	und.
Termómetro de columna Min/Max.	1	und.
Microscopio Binocular de Campo: Claro, campo oscuro y contraste de fase.	1	und.
Cámara de Neubauer	1	und.
Contómetro	1	und.
Estufa	1	und.
Aire acondicionado	1	und.
Vórtex	1	und.
Centrifuga	1	und.
Timer	1	und.
pH metro	1	und.
Campana extractora	1	und.

Figura 20: Equipos. (fuente: elaboración propia).

## 3.6 RECOLECCIÓN DE DATOS

### 3.6.1 Conteo celular manual por cámara de Neubauer

Se utilizó la cámara de Neubauer para determinar el crecimiento celular del *S. dimorphus*, siguiendo la fórmula de Neubauer (Fuente: De Rio et al., 2014). Ver en anexo 7.

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células}}{\text{n}^\circ \text{ de cuadrantes contabilizados}} \times 10.000$$

n° de cuadrantes contabilizados

Figura 21. Formula de Neubauer. (Fuente: De Rio et al., 2014).

## 3.6.2 Cosecha de Microalga

### 3.6.2.1 Por floculación

Se evaluó 2 tipos de sales de metales polivalentes para poder verificar cuál de ellas tuvo mejor coagulación y precipitación en el proceso de sedimentación de la biomasa celular del *S. dimorphus*. cuales fueron: Sulfato de aluminio ( $Al_2(SO_4)_3$ ) y sulfato férrico ( $Fe_2(SO_4)_3$ ) en dos Erlenmeyers de 100 mL de medio de cultivo Bayfolan Forte respectivamente, en un periodo de 24 horas. Ver en anexo 5.



Figura 22. Efecto de coagulación y precipitación en la biomasa por las dos sales de metales polivalentes. (fuente: elaboración propia).

## 3.6.3 Secado de la Biomasa alga

### 3.6.3.1 Filtración

Se utilizó papel filtro Whatman 42 para la extracción directa de la biomasa coagulada dentro de los fotobiorreactores (6 uni. de 5L c/u). Previamente cada papel filtro que se requirió fue pesado antes de ser utilizado, luego de terminar de filtrar fue nuevamente pesado para obtener el peso real de la biomasa húmeda. Posteriormente, se secó la biomasa húmeda durante 24 horas o por una estufa (4 horas) dentro de las instalaciones en el laboratorio de biotecnología Ambiental de la facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Ricardo Palma. Finalmente, pasando las 24 h se prosiguió a raspar cuidadosamente el papel filtro con un bisturí y así

obtener biomasa seca sin residuos de celulosa para luego ser puesto en placas Petri (rotulado) y refrigerado a 4 °C.



Figura 23. Filtración para la extracción de la biomasa coagulada (fuente: elaboración propia).



Figura 24. Raspado de la biomasa seca con Bisturí. (fuente: elaboración propia).

### 3.6.4 Extracción de aceite

#### 3.6.4.1 Destrucción mecánica

La microalga *S. dimorphus* con la que se trabajó fue sometida a un pretratamiento de molienda en mortero de porcelana, de modo que la muestra quede completamente pulverizada y homogeneizada.

En un mortero de porcelana se colocó 14g de biomasa seca. - Se procedió a la molienda, por un periodo que asegure que la muestra quede finamente pulverizada.

Con ayuda de un pincel se depositó en placas petri que fueron selladas con parafilm y refrigerada a 4 °C.



Figura 25. Emolienda de la biomasa seca. (fuente: elaboración propia).



Figura 26. Biomasa pulverizada y depositadas en placas Petri. (fuente: elaboración propia).

### **3.6.4.2 Método de extracción de lípidos**

#### 3.6.4.2.1 Extracción con solvente químico

El método de extracción en base a una solución propanol: hexano que se evaluó en el presente trabajo fue planteado por Ramos et al. (2010). Se presenta el procedimiento seguido:

En un tubo de ensayo, por cada gramo de biomasa alga se añade 9 mL de solución hexano: isopropanol 3:2 (v/v).

Se agitó en Vórtex hasta que la biomasa se disperse.

Se dejó reposar los tubos por 24 horas a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.

En un Vórtex se agita la mezcla por espacio de 1 minuto.

Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min.

Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un nuevo tubo de vidrio de 15 mL.

Se evapora la solución resultante en baño maría a 95 °C, bajo campana de seguridad.

El contenido de lípidos es determinado gravimétricamente, ver en anexo 6.

# CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

## 4.1 RESULTADOS

### 4.1.1 Comparación de crecimiento poblacional con diferentes medios de cultivo

a) Datos del Crecimiento poblacional del *Scenedesmus obliquus dimorphus* “Turpin”: Se tomó dos muestras “A” y “B” en medio de cultivo Guillard.

Se muestran los valores obtenidos in situ y analizados en el laboratorio en la fase estacionaria de muestreo. La información recoge los resultados de muestreo realizadas en el mes de julio del año 2015 (tablas 1 y 2, figuras 27 y 28).

Tabla 1. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos. (fuente: elaboración propia).

<b>Tiempo</b>	<b>Crecimiento Poblacional</b>	<b>unidades</b>
<b>21/07/2015</b>	85, 000	Células
<b>22/07/2015</b>	220, 000	Células
<b>23/07/2015</b>	247, 500	Células
<b>24/07/2015</b>	327, 500	Células
<b>25/07/2015</b>	310, 000	Células
<b>30/07/2015</b>	255, 000	Células
<b>31/07/2015</b>	167, 500	Células
<b>03/08/2015</b>	56, 000	Células

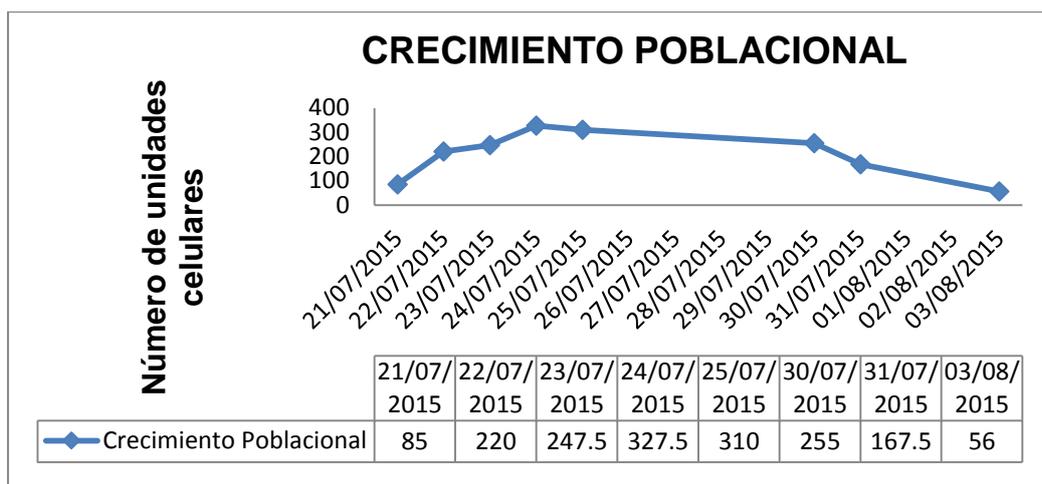


Figura 27. Crecimiento poblacional de la biomasa de *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo Guillard. (fuente: elaboración propia).

Tabla 2. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos. (fuente: elaboración propia).

<b>Tiempo</b>	<b>Crecimiento Poblacional</b>	<b>unidades</b>
<b>21/07/2015</b>	32, 500	Células
<b>22/07/2015</b>	35,000	Células
<b>23/07/2015</b>	42, 500	Células
<b>24/07/2015</b>	327, 500	Células
<b>25/07/2015</b>	310, 000	Células
<b>30/07/2015</b>	265, 000	Células
<b>31/07/2015</b>	320,000	Células
<b>03/08/2015</b>	109, 000	Células

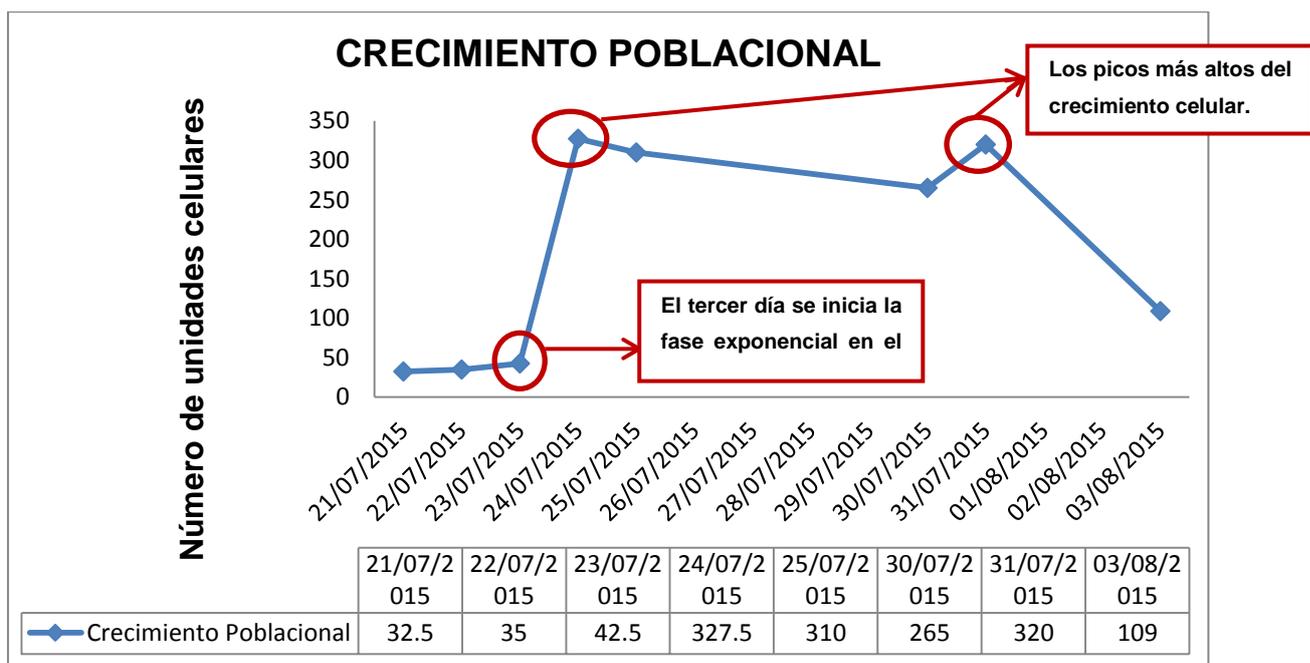


Figura 28. Curva de Crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo Guillard. (fuente: elaboración propia).

b) Datos del Crecimiento poblacional del *Scenedesmus obliquus dimorphus* “Turpin”: Se tomó dos muestras “A” y “B” en medio de cultivo BG-11.

Se muestran los valores obtenidos in situ y analizados en el laboratorio en la fase estacionaria de muestreo. La información recoge los resultados de muestreo realizadas en el mes de setiembre del año 2015 (tablas 3 y 4, figuras 29 y 30).

Tabla 3. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos (fuente: elaboración propia).

Tiempo	Crecimiento Poblacional	Unidades
16/09/2015	877,500	Células
19/09/2015	2´970,000	Células
21/09/2015	2´242,000	Células
22/09/2015	1´185,000	Células
23/09/2015	1´637,000	Células
24/09/2015	1´235,000	Células
26/09/2015	1´170,000	Células
27/09/2015	2´475,000	Células
28/09/2015	2´162,000	Células
29/09/2015	1´405.000	Células

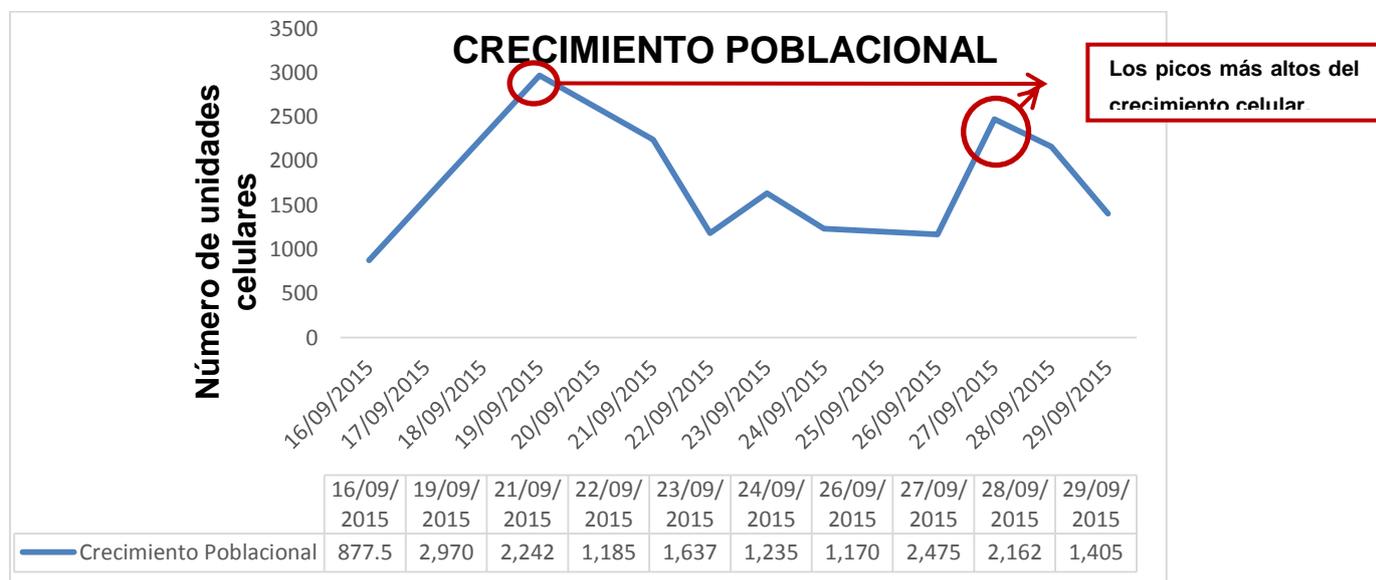


Figura 29. Curva de Crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo BG-11 (fuente: elaboración propia).

Tabla 4. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos (fuente: elaboración propia).

Tiempo	Crecimiento Poblacional	Unidades
16/09/2015	650,000	Células
19/09/2015	1´ 227,000	Células
21/09/2015	1´ 370,000	Células
22/09/2015	1´ 715,000	Células
23/09/2015	1´ 557,000	Células
24/09/2015	1´ 217,000	Células
25/09/2015	1´ 752,000	Células
26/09/2015	2´ 470,000	Células
27/09/2015	1´ 752,000	Células
28/09/2015	1´ 772,000	Células
29/09/2015	1´ 405,000	Células

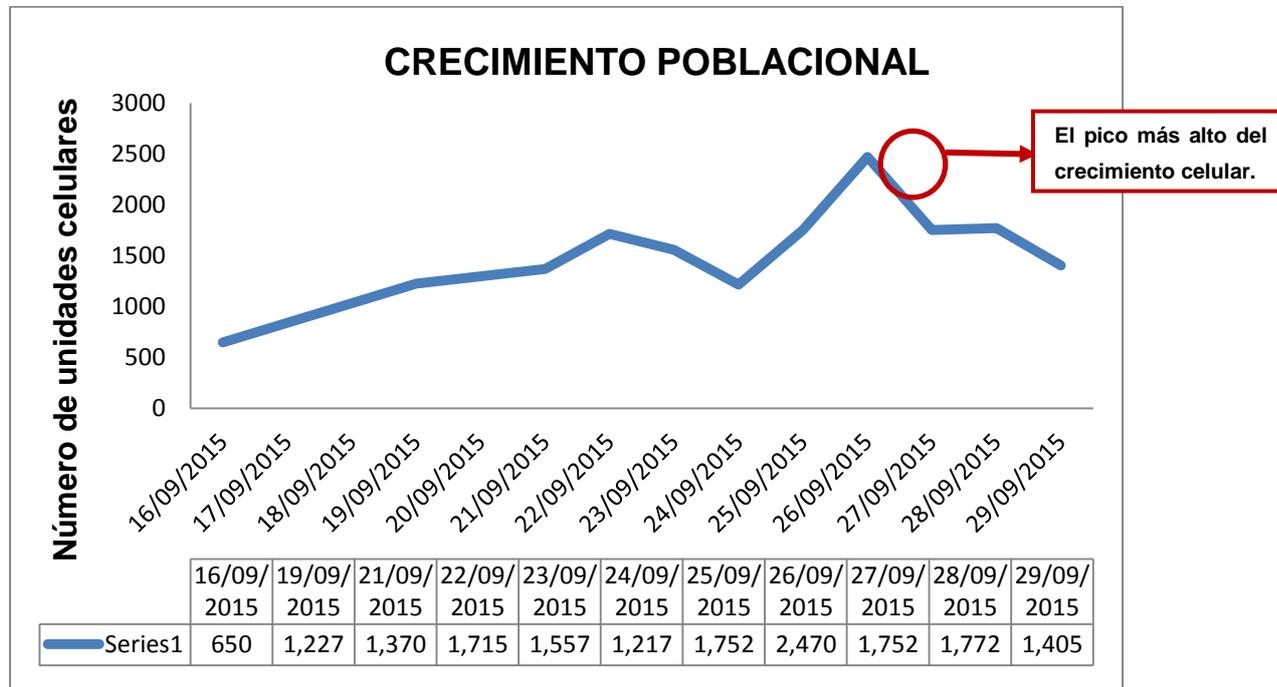


Figura 30. Curva de Crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo BG-11. (fuente: elaboración propia).

c) Datos del Crecimiento poblacional del *Scenedesmus obliquus dimorphus* “Turpin”: Se tomó dos muestras “A” y “B” en medio de cultivo Bayfolan.

Se muestran los valores obtenidos in situ y analizados en el laboratorio en la fase estacionaria de muestreo. La información recoge los resultados de muestreo realizadas en el mes de setiembre del año 2015 (tablas 5 y 6, figuras 31 y 32).

Tabla 5. Muestra “A”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “A” en diferentes tiempos. (fuente: elaboración propia).

<b>Tiempo</b>	<b>Crecimiento Poblacional</b>	<b>Unidades</b>
<b>02/11/2015</b>	165,000	células
<b>03/11/2015</b>	965,000	células
<b>04/11/2015</b>	710,000	células
<b>05/11/2015</b>	1´660,000	células
<b>06/11/2015</b>	3´295,000	células
<b>07/11/2015</b>	1´743,000	células
<b>09/11/2015</b>	2´925,000	células
<b>10/11/2015</b>	2´038,000	células
<b>11/11/2015</b>	3´795,000	células
<b>12/11/2015</b>	1´950,000	células
<b>13/11/2015</b>	3´288,000	células
<b>16/11/2015</b>	2´270,000	células
<b>17/11/2015</b>	545,000	células



Figura 31. Curva de Crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo Bayfolan. (fuente: elaboración propia)

Tabla 6. Muestra “B”. Se muestra a continuación la comparación de los resultados en la muestra “B” en diferentes tiempos. (fuente: elaboración propia).

Tiempo	Crecimiento Poblacional	Unidades
02/11/2015	213,000	células
03/11/2015	1´ 130,000	células
04/11/2015	785, 000	células
05/11/2015	1´ 675,000	células
06/11/2015	3´ 608,000	células
07/11/2015	843,000	células
09/11/2015	1´ 375,000	células
10/11/2015	448,000	células
11/11/2015	1´ 185,000	células
12/11/2015	440,000	células

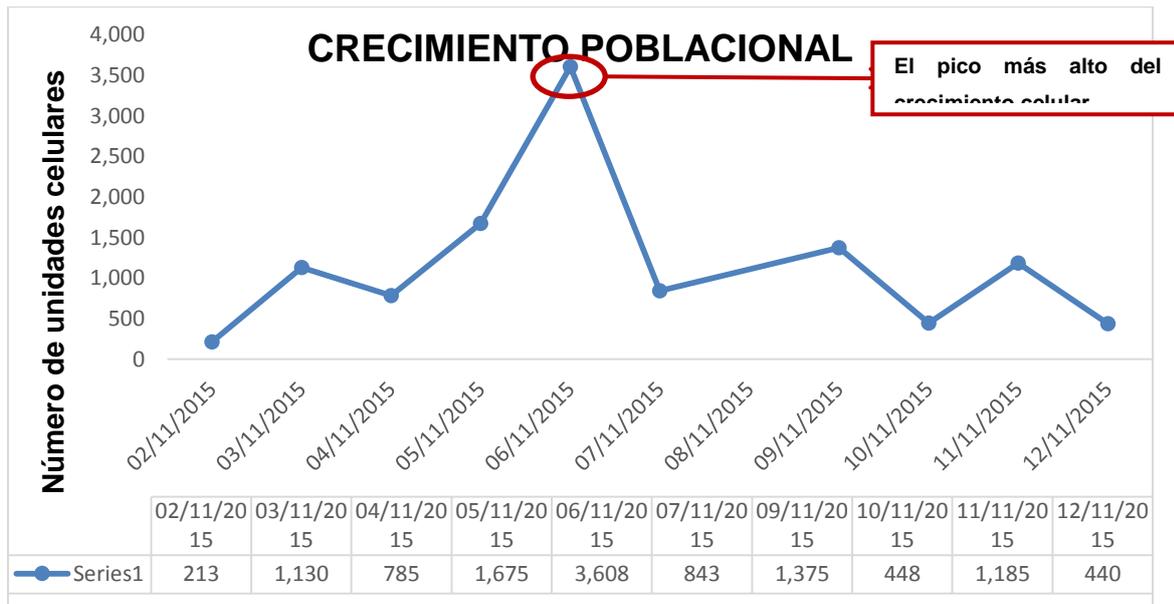


Figura 32. Curva de Crecimiento poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) en medio de cultivo Bayfolan. (fuente: elaboración propia).

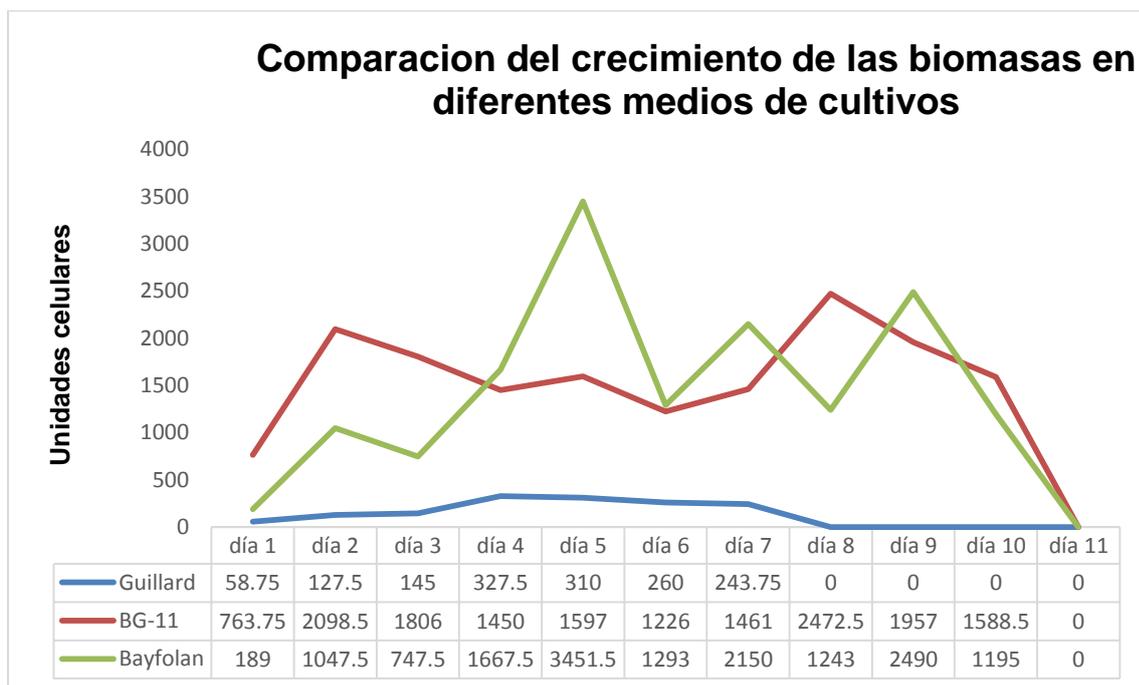


Figura 33. Crecimiento de poblacional de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* en los 3 diferentes medios de cultivos Bayfolan. (fuente: elaboración propia).

#### 4.1.2 Comparación de biomasa seca a 100 mL con dos diferentes floculantes

Tabla 7. Biomasa seca a 100 mL. (fuente: elaboración propia).

Coagulantes		Biomasa seca a 100 mL
Sulfato Férrico con cal		0.053 g
Sulfato sin cal	Aluminio	0.0799 g

Tabla 8. Tiempo total de maduración por escala. (fuente: elaboración propia).

Ítem	Cantidad	Días
Erlenmeyer (6)	50 mL	5
Erlenmeyer (6)	250 mL	5
Erlenmeyer (6)	500 mL	5
Erlenmeyer (6)	1 L	5
Erlenmeyer (6)	2 L	5
Erlenmeyer (6)	5 L	5
TOTAL	30 días	

#### 4.1.3 Resultado de la prueba de pureza por Agar Nutritivo



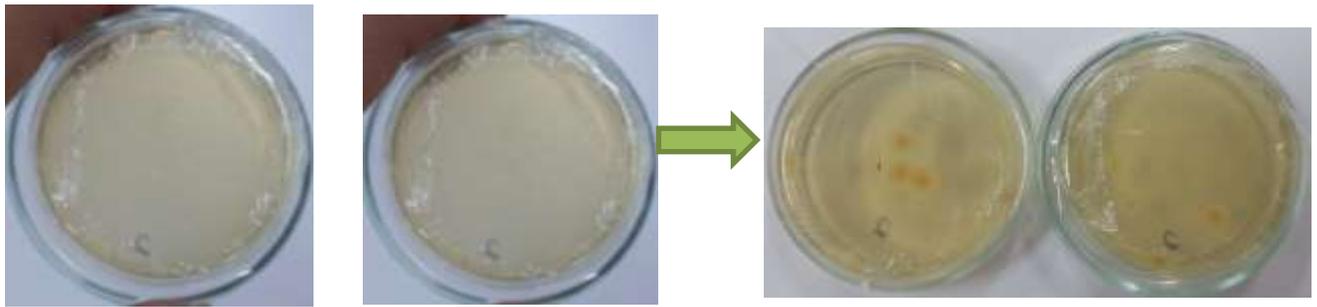


Figura 34. Prueba de Agar nutritivo inoculadas con Cepa de *Scenedesmus dimorphus*. (fuente: elaboración propia).

#### 4.1.4. Determinación de la cantidad de biomasa y lípidos (con medio Bayfolan)

Tabla 9. Determinación de la cantidad de biomasa y lípidos.

Cosecha	Medio cultivo	de Biomasa seca (mg. L <sup>-1</sup> )	Biomasa seca (mg /L/d)	Lípido	Porcentaje de Lípidos
1ra (30 días)	30 L	6735	224.5	6.1995 mL	92.05%
2 da (30 días)	30 L	6400	213.3	6.01 mL	95.31%
3 era (30 días)	30 L	7500	250	6.4991 mL	85.33%
4 ta (30 días)	30 L	7650	255	4.998 mL	65.36%
5 ta (30 días)	30 L	8300	276.6	6.2939 mL	75.90%
30 días	30 L	7317	243	5.9818 mL	82.79%
150 días	150 L	36,585	1,219.4	30.0005 mL	

Tabla 10. Base de datos de T student.

Tiempo (días)	Lípidos (%)	Biomasa (mg/ L/d)	Pto. referencia Lípidos	de Pto. de referencia de Biomasa
30	92.05 %	224.5	42.1 %	86.5 mg. L <sup>-1</sup> /d
30	95.31 %	213.3	42.1 %	86.5 mg. L <sup>-1</sup> /d
30	85.33 %	250	42.1 %	86.5 mg. L <sup>-1</sup> /d
30	65.3594 %	255	42.1 %	86.5 mg. L <sup>-1</sup> /d
30	75.9036 %	276.6	42.1%	86.5 mg. L <sup>-1</sup> /d
<b>PROMEDIO</b>	82.7906 %	243		

#### 4.1.5 Prueba de hipótesis

En el medio de cultivo Bayfolan se obtiene mayor abundancia de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* que en los medios Guillard y BG-11.

Tabla 11. Determinación de los días de la fase estacionaria en el incremento de la biomasa de *S. dimorphus* en tres diferentes medios de cultivo. (Fuente: elaboración propia).

Fase exponencial	Días	Guillard	BG-11	Bayfolan
	1 er	59 células	763.75 células	189 células
	2 do	128 células	2099 células	1048 células
	3 ero	145 células	1806 células	748 células
<b>x</b>	4 to	328 células	1450 células	1668 células
<b>x</b>	5 to	310 células	1597 células	3452 células
	6 to	260 células	1226 células	1293 células
	7mo	244 células	1461 células	2150 células
<b>x</b>	8 vo	0	2473 células	1250 células
	9 eno	0	1957 células	1243 células
	10 mo	0	1589 células	1195 células
	Promedio	147.4 células	1642.175 células	1423.6 células

Tabla 12. Análisis de un Factor para prueba estadística de Anova. (fuente: elaboración propia).

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Guillard	4	1142	285.5	1593
BG-11	4	5734	1433.5	23605.6667
Bayfolan	4	8563	2140.75	887211.583

ANÁLISIS DE  
VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7013412.167	2	3506706.08	11.5300308	0.00329042	4.25649473
Dentro de los grupos	2737230.75	9	304136.75			
Total	9750642.917	11				

Tabla 13. Prueba de estimación de Tukey. (fuente: elaboración propia).

<b>Medios de cultivos</b>	<b>Grupo Guillard</b>	<b>a: Grupo b: BG-11</b>	<b>Grupo Bayfolan</b>	<b>c:</b>
<b>Grupo a: Guillard</b>	-	-1494.775	-1276.2	
<b>Grupo b: BG-11</b>	-1494.775	-	218.575	
<b>Grupo c: Bayfolan</b>	-1276.200	218.575	-	

**HSD= 203.2**

Resultados:

Grupos a-b = -1494.775

Grupos a-c = -1276.2

Grupos b-c = 218.575

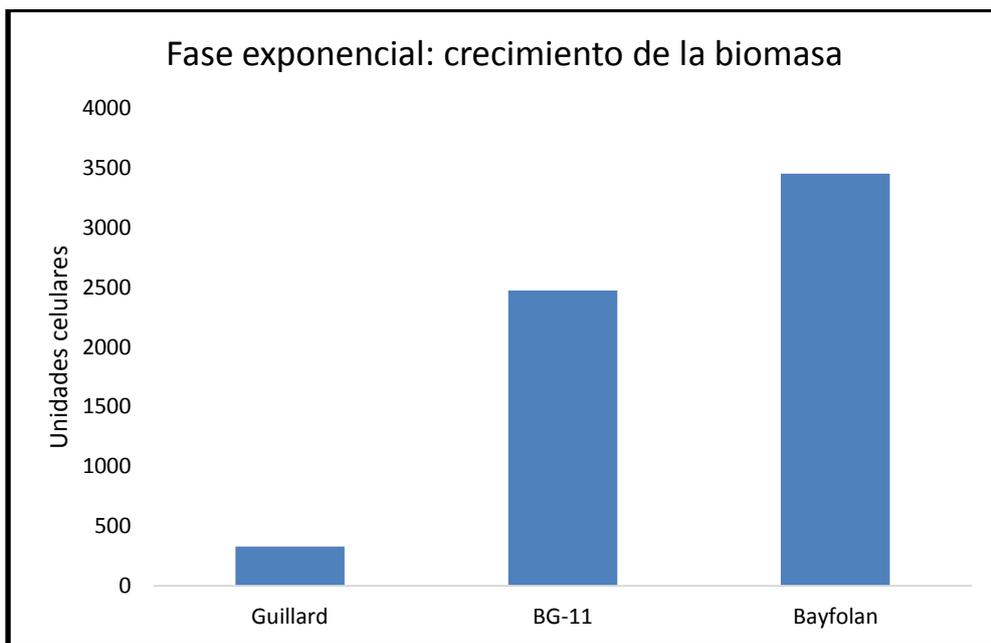


Figura 35. Comparación de las fases estacionarias de los tres diferentes medios de cultivo, con un 95% de confiabilidad. (fuente: elaboración propia).

#### 4.1.5.1. Límite de confianza al 95% para los valores de biomasa seca y lípidos

El contenido de biomasa seca tiene un intervalo de confianza al 95 % con un margen de error para la media (Tab.14, fig.37).

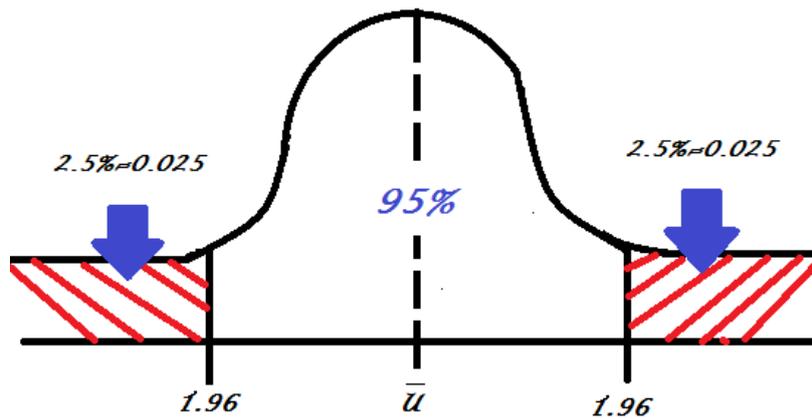


Figura 36. Grafica ilustrativa de intervalos de confianza al 95%. (fuente: elaboración propia)

Tabla 14. Base de datos para la construcción de límite de confianza al 95%. (fuente: elaboración propia).

<b>Media: X</b>	<b>243.38</b>
desv. Estandar (d)	25.21
Confianza	95%
Tamaño de muestra (n)	5
z	1.95
alfa	5%
Distribución t	2.77
Sigma X	11.27

Tabla 15. Fórmulas para la construcción de límite de confianza. (fuente: elaboración propia).

Fórmula para hallar el “u”:	Distribución t x Sigma X
Fórmula de Intervalo de confianza:	$X \pm Z \cdot d / \text{raíz}(n)$

Tabla 16. Resultados de Intervalos de confianza:

LIC	221.45mg. L <sup>-1</sup> /d
LSC	265.30 mg. L <sup>-1</sup> /d
“u”	31.29 mg. L <sup>-1</sup> /d

El contenido de lípido tiene un intervalo de confianza al 95 % con un margen de error para la media (Tab.17, fig.38).

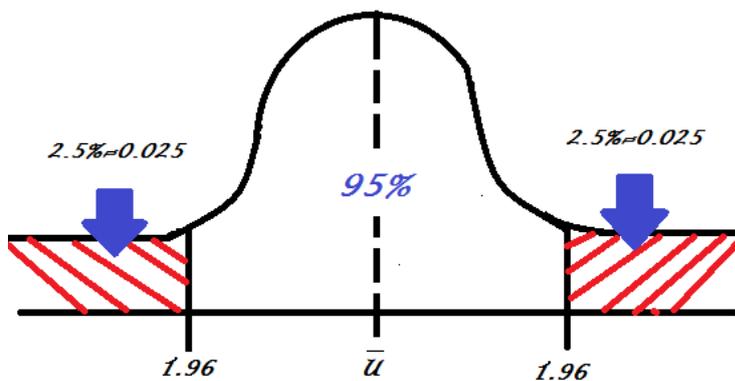


Figura 37. Grafica ilustrativa de intervalos de confianza al 95%. (fuente: elaboración propia).

Tabla 17. Base de datos para la construcción de límite de confianza al 95%. (fuente: elaboración propia).

<b>Media:</b>	82.79
desv. Estandar	12.24
Confianza	95%
Tamaño de muestra	5
z	1.95
alfa	5%
Distribución t	2.77
Sigma X	5.47

Tabla 18. Fórmulas para la construcción de límite de confianza. (fuente: elaboración propia).

<b>Fórmula para hallar el “u ” :</b>	$\frac{\bar{x} - t_{\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}}{\sigma}$
<b>Fórmula de Intervalo de confianza:</b>	$\bar{x} \pm Z \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

Tabla 19. Resultados de Intervalos de confianza.

LIC	80.35 %
LSC	93.52 %
“u”	15.20

La biomasa obtenida es significativamente mayor al punto de referencia ( $p < 0.05$ ) (Tab. 11, figura 46)

Tabla 20. Prueba de estimación t de student de la biomasa. (fuente: elaboración propia).

<b>Ho:</b>	
<b>Ha:</b>	$H > 86.5$
<b>PRL</b>	86.5
<b>Y</b>	243.76
<b>s</b>	25.02
<b>EE</b>	11.18
<b>tp</b>	14.05
<b>p</b>	0.00005

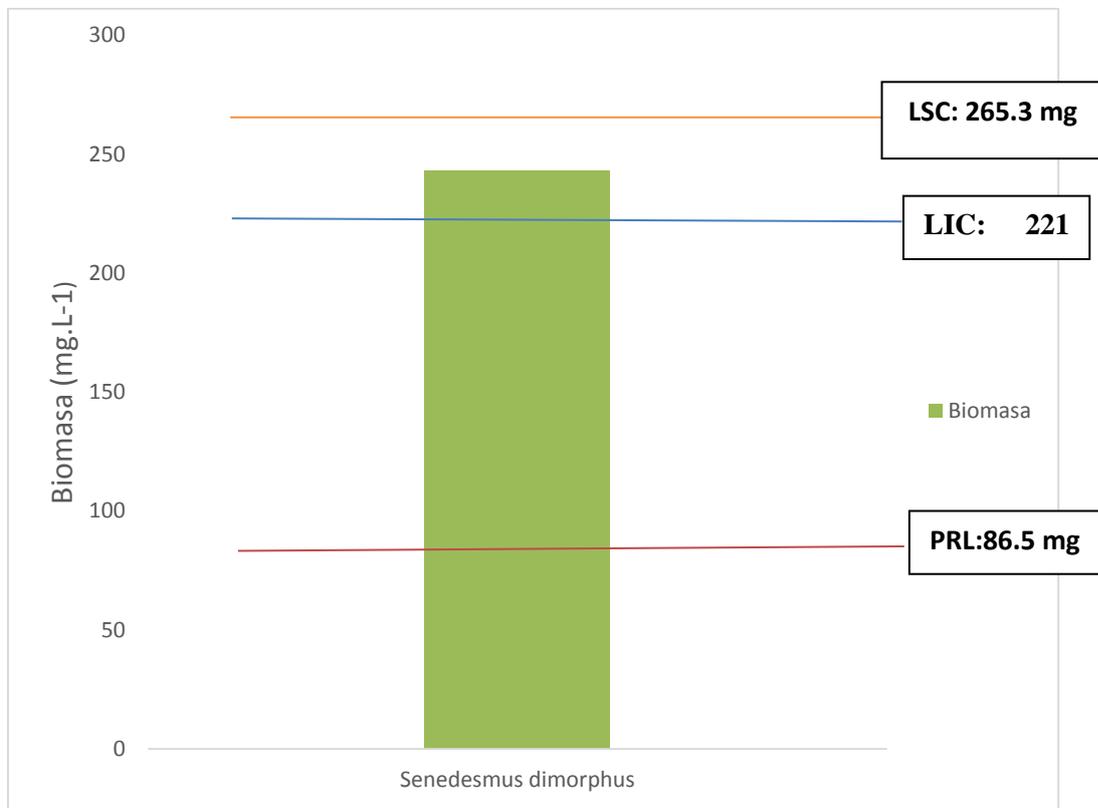


Figura 38. Prueba T de student-biomasa. (fuente: elaboración propia).

El contenido de lípido es significativamente mayor al punto de referencia ( $p < 0.05$ ) (Tab.12, figura 36)

Tabla 21. Prueba T de student-lípidos. (fuente: elaboración propia).

<b>Ho:</b>	
<b>Ha:</b>	$H > 42.1$
<b>PRL</b>	42.1
<b>Y</b>	82.79
<b>s</b>	12.24
<b>EE</b>	5.47
<b>tp</b>	7.42
<b>p</b>	0.0008

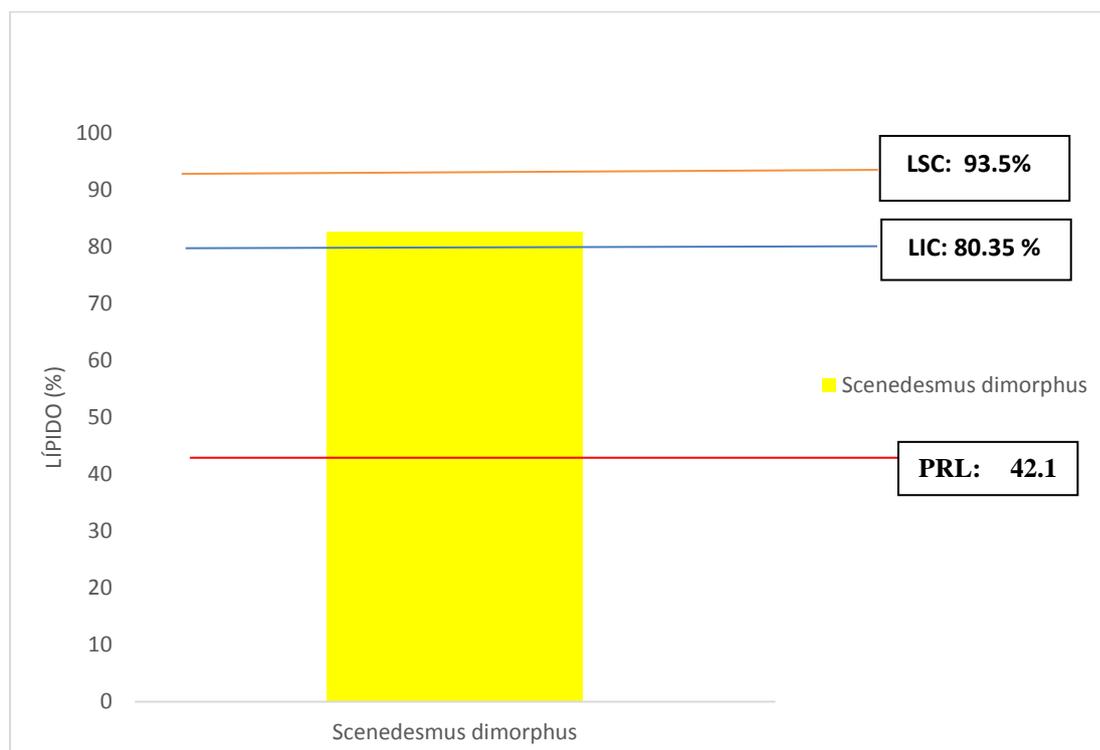


Figura 39. Prueba T de student-lípidos. (fuente: elaboración propia).

La correlación que existe entre las variables (biomasa y lípidos) fue de un valor de -0.7 indicando que la fuerza de relación no es fuerte y tienen un valor no significativo ( $p > 0.05$ ).

Tabla 22. Prueba de correlación de la prueba estadística t de student entre lípidos y biomasa. (fuente: elaboración propia).

<b>Ho:</b>	
<b>Ha:</b>	$H \neq 0$
<b>r</b>	-0.78
<b>r<sup>2</sup></b>	0.61
<b>n</b>	5
<b>a</b>	0.05
<b>tp</b>	-2.17
<b>p</b>	0.11

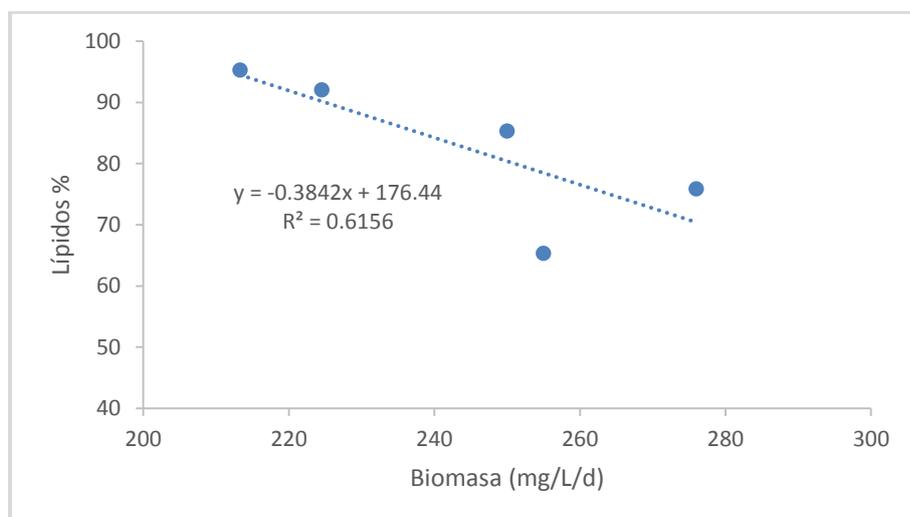


Figura 40. Correlación de las dos variables en la prueba de T de student, donde el eje X = biomasa y, el eje Y = Lípidos. (fuente: elaboración propia)

## 4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El resultado que arrojó la prueba de pureza por agar nutritivo demostró que solo la placa Petri número 2 hubo crecimiento de colonias de bacterias luego de 72 horas que es el tiempo límite para el crecimiento de otros invasores. La placa número 1 y 3 mostró la ausencia de dichos invasores, esto significa que los dichos tubos presentan cepas puras de *Scenedesmus dimorphus*. Dando confiabilidad en la pureza de la cepa de *S. dimorphus* en el crecimiento de escala que se realizó con los tubos n°1 y n°2. Ver en figura 34.

En el medio de cultivo Guillard hubo un cambio en la tinción después de una semana de inoculación con *S. dimorphus*, el cual cambió de un color verde amarillento a un color blancuzco. Esto es debido al efecto de cambio de adaptación frente al medio de cultivo Guillard, por lo tanto, el *S. dimorphus* no tuvo una buena absorción de los nutrientes necesarios para estimular al crecimiento de la biomasa y logrando el desplazamiento del alga verde por agentes invasores. Ver en anexo 1.

En el medio de cultivo BG-11 inoculado con algas *Scenedesmus dimorphus*, se obtuvo una coloración de amarillo mostaza, se presume que es por el elemento de Cu, luego de tres días la tinción pasó de amarillo a blancuzco, se concluyó que tuvo la misma razón que ocurrió con Guillard impidiendo continuar con las siguientes escalas. Ver en anexo 2.

En la figura 33, se realizó una comparación de 3 medios de cultivo: Bayfolan Forte, BG-11 y Guillard, donde los resultados que arrojó el Bayfolan Forte fue que en el quinto día se obtuvo un pico alto de 3,451,500 unidades celulares de biomasa y el valor más bajo fue de 1890 unidades celulares en el primer día, a diferencia de BG-11 que obtuvo un incremento máximo de 2,472,500 unidades celulares en el octavo día y un mínimo de 76,375 unidades celulares en el primer día. Por último, con Guillard se obtuvo un incremento máximo de 327,500 unidades celulares en el cuarto día y un mínimo de 587.5 unidades celulares en el primer día.

En la tabla 7, se comparó los resultados de Sulfato de aluminio ( $Al^2(SO_4)_3$ ) y sulfato férrico ( $Fe^2(SO_4)_3$ ), siendo 0.079 g de masa seca a 100 mL y 0.053 g a 100 mL, respectivamente.

Obteniendo mejor resultado con el Sulfato de Aluminio debido a que se obtuvo mayor cantidad de biomasa y como es compuesto que presentaba un pH:8 no era necesario del uso de cal para que el medio de cultivo sea alcalino, de esta forma se pudo facilitar la coagulación de la biomasa evitando la contaminación de esta con cal. Ver en anexo 5.

En la Tabla 10, Se determinó que la cantidad de biomasa y lípidos en 5 cosechas tuvo un total de 36.58 gramos de biomasa seca y total de lípidos de 30 mL con un promedio de lípidos con un porcentaje de 82.79 %.

En la tabla 11, se determinó que el tiempo que demora la biomasa para llegar a la fase estacionaria es el tiempo óptimo para pasar a la siguiente escala y fue de 120 horas mientras el tiempo total de maduración por escala fue 35 días. Ver en anexo 7.

En la tabla 12, se utilizó la prueba de Anova, donde se determinó los siguientes valores: la Suma de cuadrados: 9154421.556, Grados de libertad: 27, el valor F: 19.22 y valor de la probabilidad: 6.4383E-06.

En la tabla 13, se demostró los promedios de los medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados: -1494.775 (Guillard y BG-11), -1276.2 (Guillard y Bayfolan) y 218. 575 (BG-11 y Bayfolan), además se obtuvo el HSD: 203. 2.

En la figura 35, se realizó la comparación de las fases exponenciales de los tres diferentes medios de cultivo Guillar, BG-11 y Bayfolan con un 95% de confiabilidad, donde se obtuvieron los siguientes resultados: 328 células, 2473 células y 3452 células, respectivamente.

En la tabla 16, se determinó los resultados de intervalo de confianza al 95% para la biomasa seca, fueron: LIC = 22.12, LSC=26.54 y con un Mug:  $u = 3.12$ .

En la tabla 19, se determinó los resultados de intervalo de confianza al 95% para lípidos, fueron: LIC =80.35, LSC =93.52 y con un Mug:  $u = 15.2$ .

En las tablas 20 y 21, los datos se analizaron mediante el uso de los valor-p en la prueba t de Student e indican el significado de cada parámetro, en el caso de la variable 1: biomasa arrojó un valor de 0.0006 y la variable 2: Lípido tuvo un valor de 0.0009.

En las figuras 38 y 39, se muestra la prueba de t de student de biomasa y lípidos en donde se ubicó los valores del PRL, LIC y LSC.

En la tabla 22, se determinó la correlación de las dos variables: Biomasa ( $\text{gL}^{-1}$ ) y lípidos (%) en la prueba de T de Student, donde se obtuvo los siguientes resultados  $r = -0.78$  y  $r^2 = 0.61$ ,  $t_p = -2.17$  y  $p = 0.12$  con un valor de confiabilidad de 0.05 (95%).

En la figura 40, se determinó la correlación de las dos variables en la prueba de T de student donde el eje X = biomasa y, el eje Y = Lípidos.

#### Extracción de lípidos

Para extraer la biomasa pulverizada se aplicó el método de solución de solvente por dar un alto porcentaje de lípidos. Con *S. dimorphus* se utilizó previamente el método de molienda para mejorar la determinación del contenido de lípidos. Este método dio la recuperación de lípidos más consistente y también es un método fácil entre todos los métodos de extracción de lípidos. Sin embargo, hay algunas limitaciones con este método; Una desventaja es que se necesita mucho tiempo para completar el proceso de extracción y otra desventaja es la pérdida de biomasa en forma de polvo.

La elección de la solución disolvente es un factor clave en la extracción de lípidos de las algas, utilizando hexano / isopropanol (3: 2, v / v). El hexano es el disolvente más popular y es seguro, relativamente barato, en gran parte un-reactivo, volátil y no polar. Es un disolvente orgánico y se demuestra que es un buen candidato para la extracción de lípidos (Gouveia 2009). Alcoholes tales como isopropanol son muy buen disolvente para la mayoría de los lípidos. Por supuesto, hay otros métodos extracciones con disolvente sobre las algas como Bligh y Dyer (Bligh 1959), que no se usa nunca en esta investigación que puede ser considerado en futuros trabajos.

## Crecimiento por escala

El resultado que se obtuvo de la concentración de biomasa de las cinco cosechas fue mediante el conteo celular por el método de Neubauer para estimar el valor de la biomasa durante la fase de crecimiento con un 60% de confiabilidad. Se utilizó diferentes medios de cultivos como Guillard, BG-11 y Bayfolan Forte, y con los datos obtenidos en cada uno de estos medios se realizó una comparación concluyendo que el Bayfolan Forte tenía todos los nutrientes necesarios para que las algas continuara con el crecimiento de escala, ver en el anexo 7.

El crecimiento celular en los seis frascos de 5 litros con medio Bayfolan Forte del experimento discontinuo, se calculó con un total 36.5850 g para los 30 días. Ver en la figura 42. La diferencia significativa en las curvas de crecimiento es debido a factores tales como la evaporación, velocidad de flujo de aire / CO<sub>2</sub>, agitación o incluso pequeña contaminación en los medios de cultivo. Como se ha mostrado en las figuras 28,30,32,34,36 y 38.

## Rendimiento

Los factores de crecimiento ambientales como la luz, las pequeñas variaciones de temperatura, agitación o incluso pequeña contaminación por agentes extraños pueden afectar a la absorción de nutrientes tales como el nitrógeno. Pero ya que todos los experimentos tienen estos cambios, entonces dan diferentes rendimientos en nuestro sistema. Se probó si con el medio de cultivo de *Scenedesmus obliquus var. dimorphus* (Turpin) se obtiene un alto porcentaje de aceite, para esto se utilizó el método de T de Student, donde se concluye que si habría un alto porcentaje en lípidos con un 82.79% con respecto al total de biomasa. Sin embargo, otros estudios realizados por diferentes autores para obtener los valores de los coeficientes de rendimiento para *S. dimorphus*, estos resultados prácticamente les impedía un cálculo fiable en la rentabilidad (Ribita 2011).

# CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados establecidos en la tabla 11, se concluye que el medio Bayfolan se obtuvo mejores resultados debido al incremento de la abundancia en un corto tiempo de 5 días a diferencia del BG-11 y Guillard. Además, la relación de las variables: biomasa (36.5850 gramos) y lípidos (30 mL) obtuvo un promedio de 74.62 %, esto demuestra que el *Scenedemus dimorphus* como materia prima es muy productivo para la producción de Biodiesel. Además, se demostró con la prueba de Anva y Tukey, la comparación de los promedios de los tres diferentes medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados: -1494.775 (Guillard y BG-11), -1276.2 (Guillard y Bayfolan) y 218.575 (BG-11 y Bayfolan) con el HSD: 203.2, como dichos resultados superan este valor, entonces si existe diferencias en los promedios en los tres medios de cultivo, con un 95% de confiabilidad. Ver en tabla 13.

Se concluyó que hubo un mejor resultado con el coagulante Sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) a diferencia del sulfato férrico ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ), debido que no fue necesario el uso de cal para subir el pH:8 (alcalino) y facilitar la coagulación de la biomasa, además que no contamina la biomasa seca con residuos de cal y tuvo mayor cantidad de biomasa coagulada.

La correlación que existe entre las variables (biomasa y lípidos) fue de un valor de -0.7 indicando que la fuerza de relación no es fuerte y tienen un valor no significativo ( $p > 0.05$ ).

Se probó que el rango promedio de valores de la cantidad de biomasa es significativamente mayor a 86.5 mg. L<sup>-1</sup>/d, aunque el valor promedio de la biomasa fue 243 mg. L<sup>-1</sup>/d por lo que la primera hipótesis específica es verdadera.

Se probó que el rango promedio de valores de lípido es significativamente mayor a 43.2 %, ya que el valor promedio de lípidos fue 82.79 % por lo que la segunda hipótesis es verdadera.

Se determinó que con los valores de la biomasa seca con un 95% de probabilidad de que “*u*” dentro del margen de error de 31.29 de la media de 243.76 mg/L/d.

Se determinó que con los valores de lípidos con un 95% de probabilidad de que “*u*” dentro del margen de error de 15.2% de la media de 82.7%.

Se demostró que el 95% de seguridad que la cantidad de biomasa de las 5 cosechas esta entre los valores de 221.2 mg/L/d y 265.4 mg/L/d.

Se demostró que el 95% de seguridad que la cantidad de biomasa de las 5 cosechas esta entre los valores de 80.3% y 93.5%.

Se demostró que el P valor = 0.11 es mayor que 0.05, por lo que no hay una relación significativa entre las dos variables (lípidos y la biomasa) de manera inversa.

## 5.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda más investigación, incluyendo:

Hacer énfasis especial a los futuros trabajos de investigación con microalgas en el área de biotecnología ambiental, en la etapa de secado dentro del cultivo de biomasa, dado a que es importante al momento de definir la viabilidad económica del proceso.

Hacer hincapié en el estudio de las microalgas viables a la producción de almidón y carbohidratos que pueden ser explotados como una potencial ruta y sustrato hacia la producción de biodiesel.

Investigar a mayor profundidad las fuentes de nitrógeno como alternativa para mejorar el medio de cultivo Bayfolan Forte.

Estudiar a mayor profundidad las cepas nativas de microalgas en Perú, haciendo énfasis en su adaptación diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

Implementar fotobiorreactores que tenga una mayor capacidad para realizar aumento de biomasa a mayor escala y poder saber si es factible para su comercialización.

Evaluar experimentalmente las propiedades de aceite de *S. dimorphus*, tales como densidad, viscosidad, índice ácido entre otras para aumentar la rigurosidad de la modelación tecnológica.

Buscar alternativas en la formulación del medio de cultivo, buscando nutrientes más baratos que se puedan utilizar a gran escala en la industria para producción de biodiesel.

Evaluar diferentes sustratos, así como glucosa para el crecimiento experimental de las microalgas en medio heterotrófico.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E y Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña, 210 pp.
- Aguilar, C., Chang, I., Tenorio, L., Ynga, G., Oscanoa, A y Flores (2011). Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustible. Compendio metodológico para la extracción de lípidos totales a partir de biomasa microalgal. Proyecto IMARPE - FINCYT
- American Society. (2003). For testing and materials, Standard Specification D 6751-03<sup>a</sup> for biodiesel fuel (B100).
- Bahareh, K. (2013). Lipid production by *scenedesmus dimorphus* comparison: of extraction techniques and effect of sodium nitrate concentration. Bachelor of Science in Chemical Engineering Mazandaran University.
- Baumgarten, E., Nagel, N y Tischnel, R. (1999). Reduction of the Nitrogen and Carbon Content in a Swine Waste with Algae and Bacteria. Environmental Geology. Appl Microbiol Biotechnol; (2): 281-284.
- Borowitzka, M. (1988). Vitamins and Fine Chemical from Microalgae. Cambridge University Press, Cambridge 153-196.
- Bligh, E y Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Vol. 37: Issue 8: Pages. 911-917.
- Carrasco de la Peña, J. (1982). Método estadístico de la investigación médica. Madrid: Karpos, D.L. ISBN 84-85261-26-7.

- Castro, P., Coello, J y Castillo, L. (2007). Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú. Lima: Soluciones Prácticas-ITDG; 176p: il. ISBN No 978-9972-47-139-0.
- Chengchen, W., Wei, Y., Long, Y., Zhen, F y Qingfu, Y. (2013). Enhancement effect of ethanol on lipid and fatty acid accumulation and composition of *Scenedesmus sp.*- Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol. Trends In Biotechnology, 2007. 26: P. 126-131.
- De pauw, N., Morales, J y Persoone, G. (1984) Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. Hydrobiología. 116/117: 121–34.
- De rio, M. (2014). Ensayo de ecotoxicidad e inhibición de crecimiento de algas - Recuento celular en cámara de Neubauer. Universidad Miguel Hernández. <https://www.youtube.com/watch?v=JCpCOhm8a50>.
- Echenique, R. (2004). Chlorellaceae y Scenedesmaceae Chlorococcales of the Colombia Amazonia I: Chlorellaceae and Scenedesmaceae. Chlorococcales de la Amazonia Colombiana I:[http://www.unal.edu.co/icn/publicaciones/caldasias/26\(1\)/02F.pdf](http://www.unal.edu.co/icn/publicaciones/caldasias/26(1)/02F.pdf).
- Bécares, E. (2014). La Biotecnología Ambiental, ¿la cenicienta de la Biotecnología? AmbioCiencias, 12, 81-94. Revista de divulgación científica editada por la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147- 8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.
- Estrada. C., Noguera, Y y López. J (2010). Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, como biocombustible de segunda generación. Eight LACCEI Latin American and Caribbean Conference for Engineering and technology (LACCEI'2010). Innovation and Development for the Americas. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

- Faith, M. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*. October 2011, Vol. 88 (10):3473-3480. Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends. [http://ac.els-cdn.com/S0306261911000778/1-s2.0-S0306261911000778-main.pdf?\\_tid=05c5d440-2273-11e3-b4ab](http://ac.els-cdn.com/S0306261911000778/1-s2.0-S0306261911000778-main.pdf?_tid=05c5d440-2273-11e3-b4ab).
- Feng, P., Yang, K., Xu, Z, Wang, Z, Fan, F, Qin, Y & Zhu, S. (2014). Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology*. December, 2014, Vol. 173:406-414. Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640.
- Garibay, A. Vázquez, R. Sánchez, M. Serrano, L. y Martínez. A. (2009). Biodiesel a Partir de Microalgas. *Bio Tecnología*, Vol. 13 No. 3. [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2009\\_3/Biodiesel.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf).
- Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y. y Qui, W. (2009). Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy* March 2010, Vol. 87 (3): 756 -761, doi:10.1016/j.apenergy.2009.09.2016. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261909003857>.
- Gonzales, L., Cañizares, R y Baema, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian Agroindustry Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60: 259-262.
- Gouveia, L. y Oliveira, A. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36(2): 269-274.
- Hegewald, E. (1982). "The *Scenedesmus* strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin (UTEX)." *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82, *Algological Studies* 55:153-189.
- HO, S., Chen, C., Yeh, K., Chen, W., Lin, C y Chang, J. (2010). Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. *Biochemical Engineering Journal* 53(1): 57-62.

- Hong, Y., Liu, B., Kong, F., Zhao, L., Jun, G y Qi Ren, N. (2014). “Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus sp.* by metal ions and EDTA addition”. Contents lists available at ScienceDirect Bioresource Technology journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech). 169 (2014) 763–767.
- Izco, J. (1997), Botánica. McGraw Hill – Interamericana de España, S.A.U. Madrid. ISBN 84486-0182-3. <https://es.wikipedia.org/wiki/Ficolog%C3%ADa>.
- Jaramillo, J. (2011). Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química.
- Lavoie, A y De la NOUE, J. (1985). Hyperconcentrated Cultures of *Scenedesmus obliquus*: A New Approach for Wastewater Biological Tertiary Treatment. *Wat. Res.* 19: 1437-1442.
- Lee, J., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C y Oh, H. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101: S75-S77.
- Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P y Ruan, R. (2011). Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410002993>.
- Ling, G., Hongmei, Z., Xuping, Z., Delu, Y y Chunxiang, H. (2013). Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. a Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China. Department of Biological Science and Biotechnology, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China.

- Liu, J., Huang, J., Sun, J., Zhong, Y. Jiang, y & Chen, F. (2010). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410009971>.
- Maribel, M., Quezada, L., y Olguin, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades.  
[http://www3.inecol.edu.mx/relbaa/images/docs/loera\\_olguin\\_2010\\_revlatinoa\\_mbiotecnolambalgal\\_v1n1.pdf](http://www3.inecol.edu.mx/relbaa/images/docs/loera_olguin_2010_revlatinoa_mbiotecnolambalgal_v1n1.pdf).
- Mandotra, P., Kumar, M., SUSEELA, Y y Ramteke, P. (2013). Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production. Algology Laboratory, CSIR-National Botanical Research Institute, Rana Pratap Marg, Lucknow, Uttar Pradesh 226 001, India Department of Biological Sciences, Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology and Sciences, Allahabad, Uttar Pradesh 211 007, India.
- Mccurdy, A., Higham, M., Morgan. J. Quinn, Y y Seefeldt, L. (2014). Two-step process for production of biodiesel blends from oleaginous yeast and microalgae. Department of Chemistry and Biochemistry, Utah State University, 0300 Old Main Hill, Logan, UT 84322, United States. Department of Mechanical and Aerospace Engineering, Utah State University, Old Main Hill, Logan, UT 84322, United States.
- Morais, G., y Costa, J. (2007). Biofixation of carbon dioxide by spirulina sp.and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology: 439-445.
- Navarrete, F., Demarco, A., Hernan, E y Hernan, M. (2010). Model of Algae Biodiesel Production in Argentina. <http://www.dinamica-de-sistemas.com/revista/0613e-dinamica-de-sistemas.pdf>.

- Nalewajko, C., Colman, B. y Olaveson, M. (1997). Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. *Environmental and Experimental Botany* 37(2-3): 153-160
- Nelson J. Leonard. (1994). Bioorganic chemistry-a scientific endeavour in continuous transition *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 66, No. 4, pp. 659-662. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 66, No. 4, pp. 659-662. Printed in Great Britain.
- OPEM, J. (2006). Fotobiorreactor para el cultivo continuo de algas. <http://www.economiadelaenergia.com/2011/>.
- Pérez Cruz, J. (2005). *La Termodinámica de Galileo a Gibbs*. Fundación Canaria Orotava de Historia de la Ciencia. ISBN 978-84-609-7580-9.
- Ramos, C., Salazar, G., Mendez, G y Curras, S. (2010). Maximization of *Scenedesmus dimorphus* Lipid yield for the Production of biodiesel. Chemical Engineering department course- CHE-5916 Capstone Project Presentation. *Scenedesdimorphus*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019736/#fn1>.
- Ribita, D. (2011). *Quantification of Scenedesmus dimorphus growth and substrate kinetics for continuous photobioreactor design*. Master's Thesis, Cleveland State University.
- Ritu, S., Yoti, J., Indu, S y Shekhar, T. (2014). Characterization of microalga *Scenedesmus sp.* ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. A Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, University of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China. Department of Biological Science and Biotechnology, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China.
- Salomon, W. (1995). Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal of Geochemical Exploration* Volume 52, Issues 1–2, January 1995, Pages 5-23.

- Soroosh, H., Vought, L y Martensoon, L. (2011). Considering human urine as nutrients resource for cultivation of microalgae *Scenedesmus quadricauda* for biodiesel production in photoautotrophic metabolism. [http://www.susana.org/docs\\_ccbk/susana\\_download/2-1735-hadi-soroosh-master-thesis.pdf](http://www.susana.org/docs_ccbk/susana_download/2-1735-hadi-soroosh-master-thesis.pdf).
- Shen, Y., Pei, Z., Yuan, W., y Mao, E. (2009). Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 2(1): 51-57. <http://www.ijabe.org/index.php/ijabe/article/view/86>.
- Shovon. M. (2010). Waste Utilization and Biodiesel Production by the Green Microalga. *Scenedesmus obliquus*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019736/#fn1>.
- Shuler, M. (2002). Bioprocess engineering- basic concepts (2nd ed). Prentice Hall. [http://www.gcet.ac.in/departments/CH/course/CourseDetail\\_SPU\\_new/CH482.pdf](http://www.gcet.ac.in/departments/CH/course/CourseDetail_SPU_new/CH482.pdf).
- Tabernerero, A., Martin, E. y Galan, M. (2001). Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X11002993>.
- Tam, N y Wong, Y. (1989). Wastewater Nutrient Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp.* Environmental Pollution 58: 19-34.
- Xu, H., Mao, X y Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* En linea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772097>.
- XuPing, Z., Ling, X., HongMei, G., DeLu, Z y ChunXiang, H. (2013). Feasibility of biodiesel production by microalgae *Chlorella sp.* (FACHB-1748) under outdoor conditions. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, University of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China. University of Chinese Academy of

Sciences, Beijing 100049, China. Department of Biological Science and  
Biotechnology, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China.

# ANEXOS

## ANEXO 1: PREPARACIÓN DEL MEDIO GUILLARD E INOCULACIÓN



Figura 41. Compuestos químicos para la preparación de medio Guillard y balanza analítica. (fuente: elaboración propia).

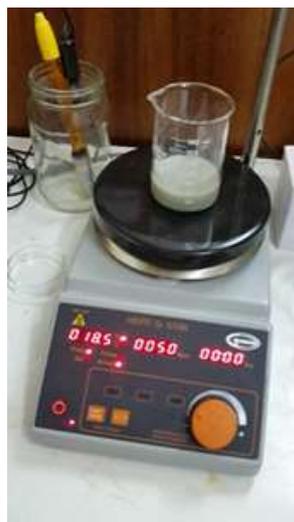


Figura 42. Mezcla todos los compuestos de Metales pesados y vitaminas en un agitador magnético. (fuente: elaboración propia).



Figura 43. Inoculación de *Scenedesmus dimorphus* en medio de cultivo Guillard F/2 dentro de la cámara flujo laminar. (fuente: elaboración propia).



Figura 44. Se mantuvo la inoculación de *Scenedesmus dimorphus* a condiciones de laboratorio. (fuente: elaboración propia).

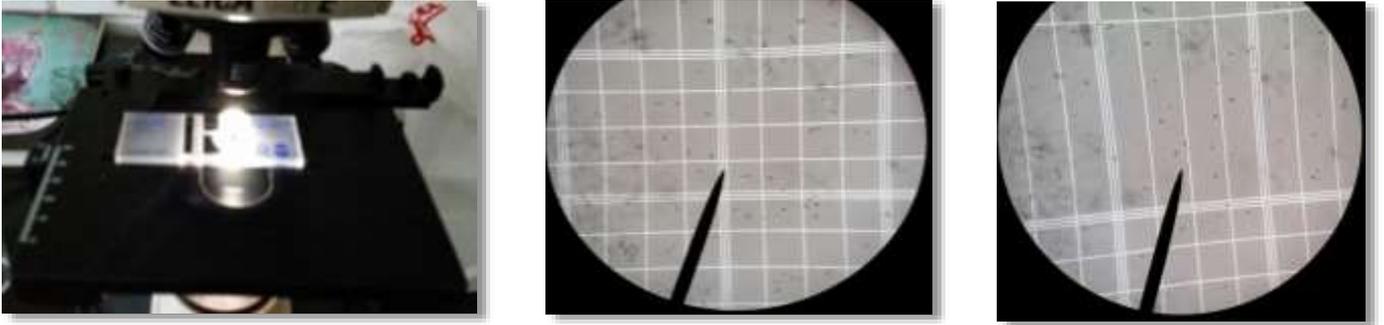


Figura 45. Conteo celular de *S. dimorphus* en la cámara Neubauer. (fuente: elaboración propia).

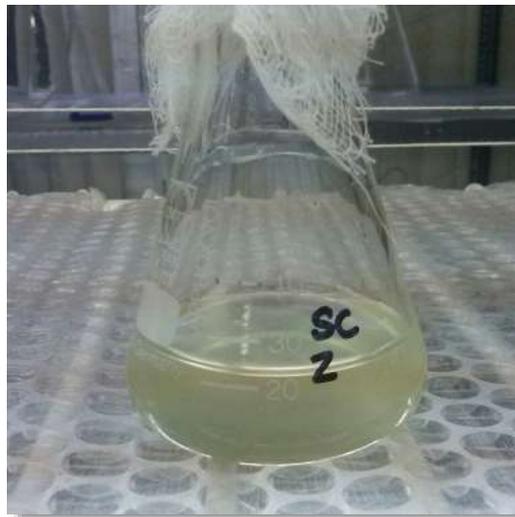


Figura 46. Cambio de color de la inoculación del medio de cultivo Guillard de verde intenso a blancuzco. (fuente: elaboración propia).

## ANEXO 2: PREPARACIÓN DEL MEDIO BG-11 E INOCULACIÓN



Figura 47. Compuestos químicos que conforman el medio de cultivo BG-11. (fuente: elaboración propia).

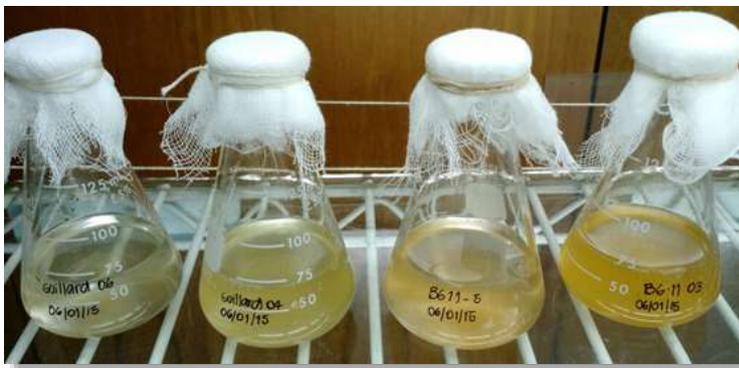


Figura 48. Inoculación de *Scenedesmus dimorphus* en medio de cultivo BG-11 dentro de la cámara flujo laminar. (fuente: elaboración propia).



Figura 49. Cambio de color de la inoculación del medio de cultivo BG-11 de verde a verde amarillento. (fuente: elaboración propia).

### **ANEXO 3: PROCEDIMIENTO DE RECUPERACIÓN DE ALGAS EN MUESTRAS CONTAMINADAS.**

Procedimiento:

Se esterilizo 6 tubos de ensayo, 6 placas Petri, 6 Eppendorf, pipetas y tapones por autoclave a 120°C por 45 min.

Se preparó medio de cultivo Guillard f/2.

Se agregó el medio Guillard al litro de agua destilada y se mantuvo refrigerado a 12°C.

se filtró las vitaminas y metales pesados tales como NaNO<sub>3</sub>, NaHPO<sub>4</sub>.

se extrajo *S. dimorphus* de la muestra contaminada de BG-11 mediante una pipeta a 6 tubos de Eppendorf y se procedió a centrifugar.

Se Inoculó en 4 tubos de ensayo de las algas sedimentadas extraídas de la muestra de cultivo BG-11 que fueron centrifugadas.

Se plaqueo 4 veces en medio de cultivo Guillard el *S. dimorphus* hasta evidenciar visualmente la ausencia de bacterias para así obtener la cepa de *S. dimorphus*.

Se obtuvo la cepa pura de *S. dimorphus*.



Figura 50. Medios de cultivo BG-11 contaminados por bacterias. (fuente: elaboración Propia).



Figura 51. Tubos Eppendorf (6) con muestras de cultivo BG-11 contaminados en centrifugadora. (fuente: elaboración propia).

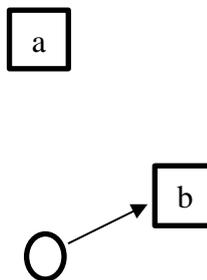


Figura 52. Centrifugación de muestra de cultivo BG-11 en donde (a) Sobrenadante con bacterias y (b) Algas sedimentadas. (fuente: elaboración propia).

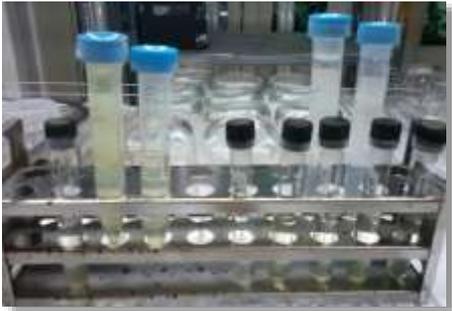


Figura 53. Inoculación en 4 tubos de ensayo de las algas sedimentadas extraídas de la muestra de cultivo BG-11 que fueron centrifugadas. (fuente: elaboración propia).

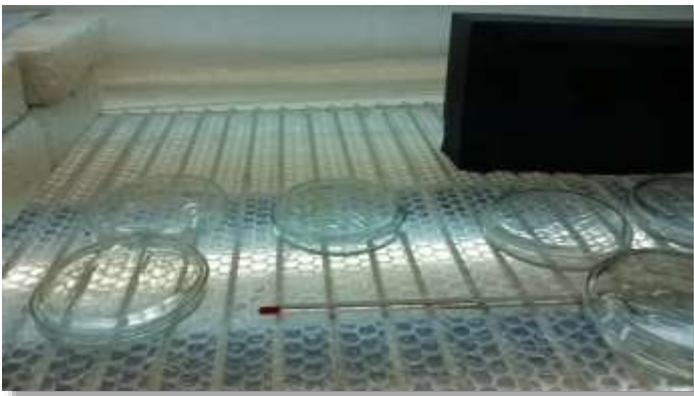


Figura 54. Siembra en placa petri en medio de cultivo Guillard con *S. dimorphus*. (fuente: elaboración propia).

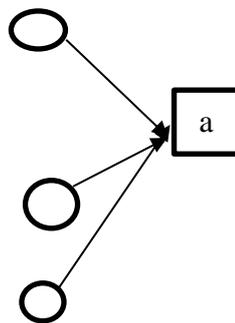


Figura 55. Cepas puras de *Scenedesmus dimorphus* (a) por plaqueo. (fuente: elaboración propia).

## **ANEXO 4: CRECIMIENTO DE BIOMASA DE *SCENEDESMUS DIMORPHUS* EN MEDIO DE CULTIVO BAYFOLAN FORTE POR MÉTODO DE ESCALA INTERMEDIA.**

Después de obtener los dos tubos de ensayos (1 y 3) donde se tuvo la pureza de la cepa de esta alga verde, se procedió hacer el crecimiento de la biomasa mediante el método de escala intermedia. Comenzando con 6 Erlenmeyers de 50 mL hasta llegar a 6 Erlenmeyers de 5 L.

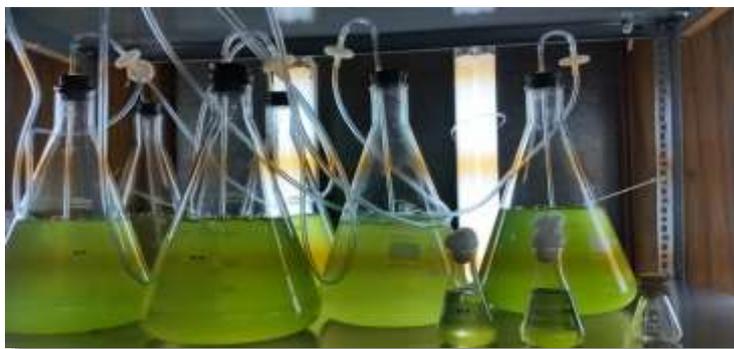


Figura 56. Crecimiento de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* en medio de cultivo Bayfolan Forte por método de escala Intermedia. (fuente: elaboración propia).

## ANEXO 5: PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA SECA A 100 ML.



Figura 57. Coagulación de dos muestras de cepas puras de *Scenedesmus dimorphus* en Erlenmeyer de 100 mL. (fuente: elaboración propia).



Figura 58. Filtración de la biomasa de *Scenedesmus dimorphus* coagulada por floculantes. (fuente: elaboración propia).

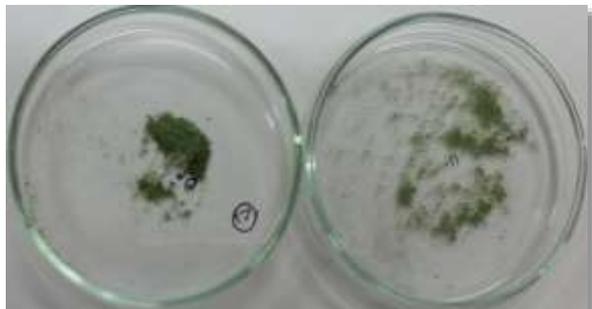


Figura 59. Raspado de la biomasa seca de *Scenedesmus dimorphus* después de 24h de reposo a T° de ambiente. (fuente: elaboración propia).

## ANEXO 6: PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS



Figura 60. Se pesó 0.5 g de la biomasa seca de *S. dimorphus* por balanza analítica. (fuente: elaboración propia).



Figura 61. Se agregó 9 mL de hexano- isopropanol 3:2 (v/v) por cada 0.5 g de biomasa. (fuente: elaboración propia).



Figura 62. Se colocó en el vórtex cada tubo de ensayo durante un min y luego se puso 6 tubos de ensayo a la centrifuga por 20 min. (fuente: elaboración propia).



Figura 63. El 12 tubo de ensayo con extracto se dejó reposar por 24 horas a T° de ambiente. (fuente: elaboración propia).



Figura 64. Se evapora la solución de hexano- isopropanol 3:2 (v/v) en baño maría a 95 °C, bajo campana extractora de seguridad. (fuente: elaboración propia).



Figura 65. Obtención de 30 mL de lípidos de *Scenedesmus dimorphus* en Erlenmeyer de 50 mL. (fuente: elaboración propia).

**ANEXO 7: CONTEO DE ALGAS VERDES *S. DIMORPHUS* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS: GUILLARD F/2, BG-11 Y BAYFOLAN FORTE**

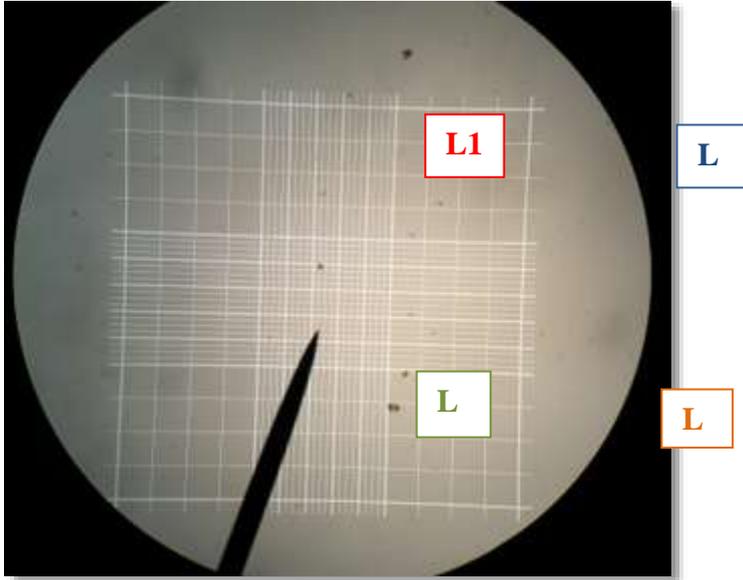


Figura 66. Muestra de *S. dimorphus* en cámara de Neubauer. (fuente: elaboración propia).

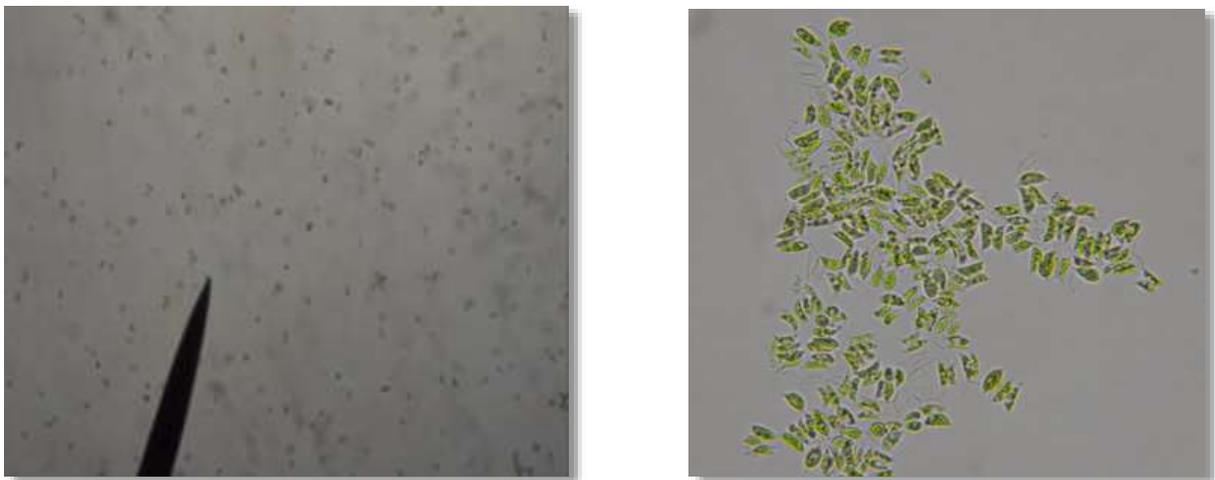


Figura 67. Muestra de *Scenedesmus dimorphus*. (fuente: elaboración propia).

## ANEXO 7.1

Crecimiento de la biomasa celular del *S. dimorphus* en medio de cultivo “Guillard” utilizando el método de conteo de la cámara Neubauer. Se subdividieron en dos tubos: “A” y “B”.

### Tubo A

	Cuadrante L1 (21/07/2015)	Cuadrante L2 (21/07/2015)	Cuadrante L3 (21/07/2015)	Cuadrante L4 (21/07/2015)
Conteo de Células	4	5	19	6

Nº de Células L1: 4

Nº de Células L2: 5

Nº de Células L3: 19

Nº de Células L4: 6

Suma 34

$$\frac{34 \times 10000}{4} = \frac{340000}{4} = 85000$$

Concentraciones (células/mL) = 85.000 células/mL

	Cuadrante L1 (22/07/2015)	Cuadrante L2 (22/07/2015)	Cuadrante L3 (22/07/2015)	Cuadrante L4 (22/07/2015)
Conteo de Células	19	7	6	56

Nº de Células L1: 19

Nº de Células L2: 7

Nº de Células L3: 6

Nº de Células L4: 56

Suma 88

$$\frac{88 \times 10000}{4} = \frac{880000}{4} = 220000$$

Concentraciones (células/mL) = 220.000 células/mL

	Cuadrante L1 (23/07/2015)	Cuadrante L2 (23/07/2015)	Cuadrante L3 (23/07/2015)	Cuadrante L4 (23/07/2015)
Conteo de Células	2	2	12	16
Nº de Células L1:	2			
Nº de Células L2:	2			
Nº de Células L3:	12			
Nº de Células L4:	16			
Suma	32			

$$\frac{32}{4} \times 10000 = \frac{320000}{4} = 80000$$

Concentraciones (células/mL) = 80.000 células/mL

	Cuadrante L1 (24/07/2015)	Cuadrante L2 (24/07/2015)	Cuadrante L3 (24/07/2015)	Cuadrante L4 (24/07/2015)
Conteo de Células	7	41	23	28
Nº de Células L1:	7			
Nº de Células L2:	41			
Nº de Células L3:	23			
Nº de Células L4:	28			
Suma	99			

$$\frac{99}{4} \times 10000 = \frac{990000}{4} = 247500$$

Concentraciones (células/mL) = 247.500 células/mL

	Cuadrante L1 (25/07/2015)	Cuadrante L2 (25/07/2015)	Cuadrante L3 (25/07/2015)	Cuadrante L4 (25/07/2015)
Conteo de Células	45	13	11	35
Nº de Células L1:	45			
Nº de Células L2:	13			
Nº de Células L3:	11			
Nº de Células L4:	35			
Suma	104			

Concentraciones (células/mL) =260.000 células/mL

	Cuadrante L1 (30/07/2015)	Cuadrante L2 (30/07/2015)	Cuadrante L3 (30/07/2015)	Cuadrante L4 (30/07/2015)
Conteo de 65 Células	15	13	9	
N° de Células L1:	65			
N° de Células L2:	15			
N° de Células L3:	13			
N° de Células L4:	9			
Suma	102			

$$\frac{102}{4} \times 10000 = \frac{1020000}{4} = 255000$$

Concentraciones (células/mL) =255.000 células/mL

	Cuadrante L1 (31/07/2015)	Cuadrante L2 (31/07/2015)	Cuadrante L3 (31/07/2015)	Cuadrante L4 (31/07/2015)
Conteo de 24 Células	20	14	9	
N° de Células L1:	24			
N° de Células L2:	20			
N° de Células L3:	14			
N° de Células L4:	9			
Suma	67			

$$\frac{67}{4} \times 10000 = \frac{670000}{4} = 167500$$

Concentraciones (células/mL) =167.500 células/mL

## Cuadro N° 2

Tubo B

	Cuadrante L1 (21/07/2015)	Cuadrante L2 (21/07/2015)	Cuadrante L3 (21/07/2015)	Cuadrante L4 (21/07/2015)
Conteo de Células	6	-	3	4

N° de Células L1: 6

N° de Células L2: 0

N° de Células L3: 3

N° de Células L4: 4

Suma 13

$$\frac{13}{4} \times 10000 = \frac{130000}{4} = 32500$$

Concentraciones (células/mL) = 32.500 células/mL

	Cuadrante L1 (22/07/2015)	Cuadrante L2 (22/07/2015)	Cuadrante L3 (22/07/2015)	Cuadrante 4 (22/07/2015)
Conteo de Células	5	4	5	0

N° de Células L1: 5

N° de Células L2: 4

N° de Células L3: 5

N° de Células L4: 0

Suma 14

$$\frac{14}{4} \times 10000 = \frac{140000}{4} = 35000$$

Concentraciones (células/mL) = 35.000 células/mL

	Cuadrante L1 (23/07/2015)	Cuadrante L2 (23/07/2015)	Cuadrante L3 (23/07/2015)	Cuadrante L4 (23/07/2015)
Conteo de Células	3	10	0	4

N° de Células L1: 3

N° de Células L2: 10

N° de Células L3: 0

N° de Células L4: 4

Suma 17

$$\frac{17}{4} \times 10000 = \frac{170000}{4} = 42500$$

Concentraciones (células/mL) = 42.500 células/mL

	Cuadrante L1 (24/07/2015)	Cuadrante L2 (24/07/2015)	Cuadrante L3 (24/07/2015)	Cuadrante L4 (24/07/2015)
<b>Conteo de células</b>	43	52	14	22

Nº de Células L1: 43

Nº de Células L2: 52

Nº de Células L3: 14

Nº de Células L4: 22

Suma 131

$$131 \times 10000 = 1310000 = 327500$$

4

4

Concentraciones (células/mL) = 327.500 células/mL

	Cuadrante L1 (25/07/2015)	Cuadrante L2 (25/07/2015)	Cuadrante L3 (25/07/2015)	Cuadrante L4 (25/07/2015)
Conteo de Células	23	44	19	38

Nº de Células L1: 23

Nº de Células L2: 44

Nº de Células L3: 19

Nº de Células L4: 38

Suma 124

$$124 \times 10000 = 1240000 = 310000$$

4

4

Concentraciones (células/mL) =310.000 células/mL

	Cuadrante L1 (30/07/2015)	Cuadrante L2 (30/07/2015)	Cuadrante L3 (30/07/2015)	Cuadrante L4 (30/07/2015)
Conteo de Células				

Nº de Células L1: 41

Nº de Células L2: 53

Nº de Células L3: 11

Nº de Células L4: 1

Suma 106

$106 \times 10000 = 1060000 = 265000$

4

4

Concentraciones (células/mL) =265.000 células/mL

	Cuadrante L1 (31/07/2015)	Cuadrante L2 (31/07/2015)	Cuadrante L3 (31/07/2015)	Cuadrante L4 (31/07/2015)
Conteo de Células	33	31	39	25

Nº de Células L1: 33

Nº de Células L2: 31

Nº de Células L3: 39

Nº de Células L4: 25

Suma 128

$128 \times 10000 = 1280000 = 320000$

4

4

Concentraciones (células/mL) =320.000 células/mL

## ANEXO 7.2

Crecimiento de la biomasa celular del *S. dimorphus* en Medio de cultivo “BG-11” utilizando el método de conteo de la cámara Neubauer. Se subdividieron en dos tubos: “A” y “B”.

### Tubo A

	Cuadrante L1 (16/09/2015)	Cuadrante L2 (16/09/2015)	Cuadrante L3 (16/09/2015)	Cuadrante L4 (16/09/2015)
Conteo de células	86	77	132	54

Nº de Células L1: 86

Nº de Células L2: 77

Nº de Células L3: 132

Nº de Células L4: 56

---

Suma 351

$$\text{Formula: } \frac{351}{4} \times 10000 = \frac{3510000}{4} = 877500$$

Concentraciones (células/mL) = 877.5000 células/mL

	Cuadrante L1 (19/09/2015)	Cuadrante L2 (19/09/2015)	Cuadrante L3 (19/09/2015)	Cuadrante L4 (19/09/2015)
Conteo de Células	248	257	336	347

Nº de Células L1: 248

Nº de Células L2: 257

Nº de Células L3: 336

Nº de Células L4: 347

---

Suma 1188

$$\text{Fórmula} \quad \frac{1188}{4} \times 10000 = \frac{11,800,000}{4} = 2,970,000$$

Concentraciones (células/mL) = 2,970,000 células/mL

	Cuadrante L1 (21/09/2015)	Cuadrante L2 (21/09/2015)	Cuadrante L3 (21/09/2015)	Cuadrante L4 (21/09/2015)
Conteo de células	66	148	336	347

Nº de Células L1:	66
Nº de Células L2:	148
Nº de Células L3:	336
Nº de Células L4:	347
Suma	897

$$\text{Formula:} \quad \frac{897}{4} \times 10000 = \frac{8,970,000}{4} = 2,242,500$$

Concentraciones (células/mL) = 2,242,500 células/mL

	Cuadrante L1 (22/09/2015)	Cuadrante L2 (22/09/2015)	Cuadrante L3 (22/09/2015)	Cuadrante L4 (22/09/2015)
Conteo de Células	194	180	186	167

Nº de Células L1:	194
Nº de Células L2:	180
Nº de Células L3:	186
Nº de Células L4:	167
Suma	727

$$\text{Formula} \quad \frac{727}{4} \times 10000 = \frac{181.75}{4} = 1817500$$

Concentraciones (células/mL) =1,817,500 células/mL

	Cuadrante L1 (23/09/2015)	Cuadrante L2 (23/09/2015)	Cuadrante L3 (23/09/2015)	Cuadrante L4 (23/09/2015)
Conteo de Células	179	134	137	205

Nº de Células L1: 179

Nº de Células L2: 134

Nº de Células L3: 137

Nº de Células L4: 205

Suma 655

$$\text{Formula } \frac{655}{4} \times 10000 = \frac{665000}{4} = 1,637,500$$

Concentraciones (células/mL) =1,637,500 células/mL

	Cuadrante L1 (24/09/2015)	Cuadrante L2 (24/09/2015)	Cuadrante L3 (24/09/2015)	Cuadrante L4 (24/09/2015)
Conteo de células	66	121	201	106

Nº de Células L1: 66

Nº de Células L2: 121

Nº de Células L3: 201

Nº de Células L4: 106

Suma 494

$$\text{Formula } \frac{494}{4} \times 10000 = \frac{4940000}{4} = 1235000$$

Concentraciones (células/mL) =1,235.000 células/mL

	Cuadrante L1 (26/09/2015)	Cuadrante L2 (26/09/2015)	Cuadrante L3 (26/09/2015)	Cuadrante L4 (26/09/2015)
Conteo de células	190	204	90	200

$$\text{Formula } \frac{684}{4} \times 10000 = \frac{6840000}{4} = 1710000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,710.000 células/mL

Nº de Células	190
L1:	
Nº de Células	204
L2	
Nº de Células	90
L3	
Nº de Células	200
L4	
<hr/>	
Suma	684

	Cuadrante L1 (27/09/2015)	Cuadrante L2 (27/09/2015)	Cuadrante L3 (27/09/2015)	Cuadrante L4 (27/09/2015)
Conteo de células	273	301	273	143

Nº de Células L1:	273
Nº de Células L2:	301
Nº de Células L3:	273
Nº de Células L4:	143
<hr/>	
Suma	990

$$\text{Formula } \frac{990}{4} \times 10000 = \frac{9900000}{4} = 2475000$$

Concentraciones (células/mL) = 2,475.000 células/mL

	Cuadrante L1 (28/09/2015)	Cuadrante L2 (28/09/2015)	Cuadrante L3 (28/09/2015)	Cuadrante L4 (28/09/2015)
Conteo de células	163	96	483	123

N° de Células L1:	163
N° de Células L2:	96
N° de Células L3:	483
N° de Células L4:	123
Suma	865

Formula:  $\frac{865}{4} \times 10000 = \frac{8650000}{4} = 2162500$

Concentraciones (células/mL) = 2,162,500 células/mL

	Cuadrante L1 (29/09/2015)	Cuadrante L2 (29/09/2015)	Cuadrante L3 (29/09/2015)	Cuadrante L4 (29/09/2015)
Conteo de células	155	144	133	130

N° de Células L1:	155
N° de Células L2:	144
N° de Células L3:	133
N° de Células L4:	130
Suma	562

Formula:  $\frac{562}{4} \times 10000 = \frac{5620000}{4} = 1405000$

Concentraciones (células/mL) = 1,405.000 células/mL

Tubo B

	Cuadrante L1 (16/09/2015)	Cuadrante L2 (16/09/2015)	Cuadrante L3 (16/09/2015)	Cuadrante L4 (16/09/2015)
Conteo de células	58	66	71	65

Nº de Células L1: 58

Nº de Células L2: 66

Nº de Células L3: 71

Nº de Células L4: 65

---

Suma 260

$$\text{Formula: } \frac{260}{4} \times 10000 = \frac{2600000}{4} = 650000$$

Concentraciones (células/mL) = 650.000 células/mL

	Cuadrante L1 (19/09/2015)	Cuadrante L2 (19/09/2015)	Cuadrante L3 (19/09/2015)	Cuadrante L4 (19/09/2015)
Conteo de Células	106	48	127	210

Nº de Células L1: 106

Nº de Células L2: 48

Nº de Células L3: 127

Nº de Células L4: 210

---

Suma 491

$$\frac{491}{4} \times 10000 = \frac{4,910,000}{4} = 1227500$$

Concentraciones (células/mL) = 1,227,500 células/mL

	Cuadrante L1 (21/09/2015)	Cuadrante L2 (21/09/2015)	Cuadrante L3 (21/09/2015)	Cuadrante L4 (21/09/2015)
Conteo de células	62	156	220	110

Nº de Células L1:	62
Nº de Células L2:	156
Nº de Células L3:	220
Nº de Células L4:	110
Suma	548

$$\text{Formula: } \frac{548}{4} \times 10000 = \frac{5,480,000}{4} = 1,370,000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,370,000 células/mL

	Cuadrante L1 (22/09/2015)	Cuadrante L2 (22/09/2015)	Cuadrante L3 (22/09/2015)	Cuadrante L4 (22/09/2015)
Conteo de Células	180	134	184	188

Nº de Células L1:	180
Nº de Células L2:	134
Nº de Células L3:	184

N° de Células L4:	188
Suma	686

$$\text{Formula } \frac{686}{4} \times 10000 = \frac{171.5}{4} = 1715000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,715,000 células/mL

	Cuadrante L1 (23/09/2015)	Cuadrante L2 (23/09/2015)	Cuadrante L3 (23/09/2015)	Cuadrante L4 (23/09/2015)
Conteo de Células	172	121	133	197

N° de Células L1:	172
N° de Células L2:	121
N° de Células L3:	133
N° de Células L4:	197

Suma	623
------	-----

$$\text{Formula: } \frac{623}{4} \times 10000 = \frac{6230000}{4} = 1,557,500$$

Concentraciones (células/mL) = 1,557,500 células/mL

	Cuadrante L1 (24/09/2015)	Cuadrante L2 (24/09/2015)	Cuadrante L3 (24/09/2015)	Cuadrante L4 (24/09/2015)
Conteo de células	61	112	194	120

N° de Células L1:	61
N° de Células L2:	112
N° de Células L3:	194
N° de Células L4:	120

Suma	487
------	-----

$$\text{Formula } \frac{487}{4} \times 10000 = \frac{4870000}{4} = 1217500$$

Concentraciones (células/mL) = 1,217,500 células/mL

	Cuadrante L1 (26/09/2015)	Cuadrante L2 (26/09/2015)	Cuadrante L3 (26/09/2015)	Cuadrante L4 (26/09/2015)
Conteo de células	183	222	85	211

Nº de Células L1: 183

Nº de Células L2: 222

Nº de Células L3: 85

Nº de Células L4: 211

Suma 701

$$\text{Formula: } \frac{701}{4} \times 10000 = \frac{7010000}{4} = 1752500$$

Concentraciones (células/mL) = 1,752500 células/mL

	Cuadrante L1 (27/09/2015)	Cuadrante L2 (27/09/2015)	Cuadrante L3 (27/09/2015)	Cuadrante L4 (27/09/2015)
Conteo de células	233	318	290	147

Nº de Células L1: 233

Nº de Células L2: 318

Nº de Células L3: 290

Nº de Células L4: 147

Suma 988

$$\text{Formula: } \frac{988}{4} \times 10000 = \frac{9880000}{4} = 2470000$$

Concentraciones (células/mL) = 2,470,000 células/mL

---

	Cuadrante L1 (28/09/2015)	Cuadrante L2 (28/09/2015)	Cuadrante L3 (28/09/2015)	Cuadrante L4 (28/09/2015)
Conteo de células	156	195	244	114

---

Nº de Células L1: 156

Nº de Células L2: 195

Nº de Células L3: 244

Nº de Células L4: 114

---

Suma 709

$$\text{Formula: } \frac{709}{4} \times 10000 = \frac{7090000}{4} = 1772500$$

Concentraciones (células/mL) = 1,772,500 células/mL

---

	Cuadrante L1 (29/09/2015)	Cuadrante L2 (29/09/2015)	Cuadrante L3 (29/09/2015)	Cuadrante L4 (29/09/2015)
Conteo de células	152	135	137	138

---

Nº de Células L1: 152

Nº de Células L2: 135

Nº de Células L3: 137

Nº de Células L4: 138

---

Suma 562

$$\text{Formula: } \frac{562}{4} \times 10000 = \frac{5620000}{4} = 1405000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,405,000 células/mL

	Cuadrante 1 (02/09/2015)	Cuadrante 2 (02/09/2015)	Cuadrante 3 (02/09/2015)	Cuadrante 4 (02/09/2015)
Contero de células	22	25	19	0

Nº de Células L1:	22
Nº de Células L2:	25
Nº de Células L3:	19
Nº de Células L4:	0
Suma	66

$$\text{Formula: } \frac{66}{4} \times 10000 = \frac{660000}{4} = 165000$$

Concentraciones (células/mL) = 165.000 células/mL

	Cuadrante 1 (03/09/2015)	Cuadrante 2 (03/09/2015)	Cuadrante 3 (03/09/2015)	Cuadrante 4 (03/09/2015)
Contero de células	69	179	60	78

Nº de Células L1:	69
Nº de Células L2:	179
Nº de Células L3:	60
Nº de Células L4:	78
Suma	386

$$\text{Formula: } \frac{386}{4} \times 10000 = \frac{3860000}{4} = 965000$$

Concentraciones (células/mL) = 965.000 células/mL

	Cuadrante 1 (04/09/2015)	Cuadrante 2 (04/09/2015)	Cuadrante 3 (04/09/2015)	Cuadrante 4 (04/09/2015)
Conteo de células	29	120	81	54

Nº de Células L1	29
Nº de Células L2	120
Nº de Células L3	81
Nº de Células L4	54
Suma	284

$$\text{Formula: } \frac{284}{4} \times 10000 = \frac{2840000}{4} = 710000$$

Concentraciones (células/mL) = 710.000 células/mL

	Cuadrante 1 (07/09/2015)	Cuadrante 2 (07/09/2015)	Cuadrante 3 (07/09/2015)	Cuadrante 4 (07/09/2015)
Conteo de células	186	120	202	156

Nº de Células L1	186
Nº de Células L2	120
Nº de Células L3	202
Nº de Células L4	156
Suma	664

$$\text{Formula } \frac{664}{4} \times 10000 = \frac{6640000}{4} = 1660000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,660000 células/mL

	Cuadrante 1 (08/09/2015)	Cuadrante 2 (08/09/2015)	Cuadrante 3 (08/09/2015)	Cuadrante 4 (08/09/2015)
Conteo de células	191	345	294	488

Nº de Células L1:	191
Nº de Células L2:	345
Nº de Células L3:	294
Nº de Células L4:	488
<hr/> Suma	1318

$$\text{Formula: } \frac{1318}{4} \times 10000 = \frac{13180000}{4} = 3295000$$

Concentraciones (células/mL) = 3, 295000 células/mL

	Cuadrante 1 (09/09/2015)	Cuadrante 2 (09/09/2015)	Cuadrante 3 (09/09/2015)	Cuadrante 4 (09/09/2015)
Conteo de células	240	182	117	158

Nº de Células L1:	240
Nº de Células L2:	182
Nº de Células L3:	117
Nº de Células L4:	158
<hr/> Suma	697

$$\text{Formula: } \frac{697}{4} \times 10000 = \frac{6970000}{4} = 1742500$$

Concentraciones (células/mL) = 1, 742500 células/mL

	Cuadrante 1 (10/09/2015)	Cuadrante 2 (10/09/2015)	Cuadrante 3 (10/09/2015)	Cuadrante 4 (10/09/2015)
Conteo de células	288	359	261	262

Nº de Células L1:	288
Nº de Células L2:	359
Nº de Células L3:	261
Nº de Células L4:	262
<u>Suma</u>	1170

$$\text{Formula } \frac{1170}{4} \times 10000 = \frac{11700000}{4} = 2925000$$

Concentraciones (células/mL) = 2, 925000 células/mL

	Cuadrante 1 (11/09/2015)	Cuadrante 2 (11/09/2015)	Cuadrante 3 (11/09/2015)	Cuadrante 4 (11/09/2015)
Conteo de células	184	110	237	284

Nº de Células L1:	184
Nº de Células L2:	110
Nº de Células L3:	237
Nº de Células L4:	284
<u>Suma</u>	815

$$\text{Formula } \frac{815}{4} \times 10000 = \frac{8150000}{4} = 2037500$$

Concentraciones (células/mL) =2, 037500 células/mL

	Cuadrante 1 (11/09/2015)	Cuadrante 2 (11/09/2015)	Cuadrante 3 (11/09/2015)	Cuadrante 4 (11/09/2015)
Conteo de células	184	110	237	284

Nº de Células L1:	184
Nº de Células L2:	110
Nº de Células L3:	237
Nº de Células L4:	284
<u>Suma</u>	815

$$\text{Formula } \frac{815}{4} \times 10000 = \frac{8150000}{4} = 2037500$$

Concentraciones (células/mL) =2, 037500 células/mL

	Cuadrante 1 (14/09/2015)	Cuadrante 2 (14/09/2015)	Cuadrante 3 (14/09/2015)	Cuadrante 4 (14/09/2015)
Conteo de células	335	271	434	478

Nº de Células L1:	335
Nº de Células L2:	271
Nº de Células L3:	434
Nº de Células L4:	478
<u>Suma</u>	1518

$$\text{Formula } \frac{1518}{4} \times 10000 = \frac{15180000}{4} = 3795000$$

Concentraciones (células/mL) =3, 795000 células/mL

	Cuadrante 1 (15/09/2015)	Cuadrante 2 (15/09/2015)	Cuadrante 3 (15/09/2015)	Cuadrante 4 (15/09/2015)
Conteo de células	149	158	218	255

Nº de Células L1: 149  
 Nº de Células L2: 158  
 Nº de Células L3: 218  
 Nº de Células L4: 255  
 Suma 780

$$\text{Formula } \frac{780}{4} \times 10000 = \frac{7800000}{4} = 1950000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,950000 células/mL

---

	Cuadrante 1 (16/09/2015)	Cuadrante 2 (16/09/2015)	Cuadrante 3 (16/09/2015)	Cuadrante 4 (16/09/2015)
Conteo de células	260	365	348	342

---

Nº de Células L1: 260  
 Nº de Células L2: 365  
 Nº de Células L3: 348  
 Nº de Células L4: 342  
 Suma 1315

$$\text{Formula } \frac{1315}{4} \times 10000 = \frac{13150000}{4} = 3287500$$

Concentraciones (células/mL) = 3,287500 células/mL

---

	Cuadrante 1 (17/09/2015)	Cuadrante 2 (17/09/2015)	Cuadrante 3 (17/09/2015)	Cuadrante 4 (17/09/2015)
Conteo de células	195	240	278	190

---

Nº de Células L1: 195  
 Nº de Células L2: 240  
 Nº de Células L3: 278  
 Nº de Células L4: 195  
 Suma 908

$$\text{Formula } \frac{908}{4} \times 10000 = \frac{9080000}{4} = 2270000$$

Concentraciones (células/mL) = 2, 270000 células/mL

	Cuadrante 1 (18/09/2015)	Cuadrante 2 (18/09/2015)	Cuadrante 3 (18/09/2015)	Cuadrante 4 (18/09/2015)
Conteo de células	66	38	65	49

Nº de Células L1:	66
Nº de Células L2:	38
Nº de Células L3:	65
Nº de Células L4:	49
<u>Suma</u>	218

$$\text{Formula } \frac{218}{4} \times 10000 = \frac{2180000}{4} = 545000$$

Concentraciones (células/mL) = 545,000 células/mL

### ANEXO 7.3

Crecimiento de la biomasa celular del *S. dimorphus* en Medio de cultivo “Bayfolan” utilizando el método de conteo de la cámara Neubauer. Se subdividieron en dos tubos: “A” y “B”.

Tubo A

	Cuadrante L1 (02/11/2015)	Cuadrante L2 (02/11/2015)	Cuadrante L3 (02/11/2015)	Cuadrante L4 (02/11/2015)
Contero de células	22	25	19	0

Nº de Células L1: 22

Nº de Células L2: 25

Nº de Células L3: 19

Nº de Células L4: 0

Suma 66

$$\text{Formula: } \frac{66}{4} \times 10000 = \frac{660000}{4} = 165000$$

Concentraciones (células/mL) = 165.000 células/mL

	Cuadrante L1 (03/11/2015)	Cuadrante L2 (03/11/2015)	Cuadrante L3 (03/11/2015)	Cuadrante L4 (03/11/2015)
Contero de células	69	179	60	78

Nº de Células L1: 69

Nº de Células L2: 179

Nº de Células L3: 60

Nº de Células L4: 78

Suma 386

$$\text{Formula: } \frac{386}{4} \times 10000 = \frac{3860000}{4} = 965000$$

Concentraciones (células/mL) = 965.000 células/mL

	Cuadrante L1 (04/11/2015)	Cuadrante L2 (04/11/2015)	Cuadrante L3 (04/11/2015)	Cuadrante L4 (04/11/2015)
Conteo de células	29	120	81	54

Nº de Células L1	29
Nº de Células L2	120
Nº de Células L3	81
Nº de Células L4	54
Suma	284

$$\text{Formula: } \frac{284}{4} \times 10000 = \frac{2840000}{4} = 710000$$

Concentraciones (células/mL) = 710.000 células/mL

	Cuadrante L1 (05/11/2015)	Cuadrante L2 (05/11/2015)	Cuadrante L3 (05/11/2015)	Cuadrante L4 (05/11/2015)
Conteo de células	186	120	202	156

Nº de Células L1	186
Nº de Células L2	120
Nº de Células L3	202
Nº de Células L4	156
Suma	664

$$\text{Formula } \frac{664}{4} \times 10000 = \frac{6640000}{4} = 1660000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,660000 células/mL

	Cuadrante L1 (06/11/2015)	Cuadrante L2 (08/11/2015)	Cuadrante L3 (08/11/2015)	Cuadrante L4 (08/11/2015)
Conteo de células	191	345	294	488

Nº de Células L1:	191
Nº de Células L2:	345
Nº de Células L3:	294
Nº de Células L4:	488
<u>Suma</u>	<u>1318</u>

$$\text{Formula: } \frac{1318}{4} \times 10000 = \frac{13180000}{4} = 3295000$$

Concentraciones (células/mL) = 3, 295000 células/mL

	Cuadrante L1 (07/11/2015)	Cuadrante L2 (07/11/2015)	Cuadrante L3 (07/11/2015)	Cuadrante L4 (07/11/2015)
Conteo de células	240	182	117	158

Nº de Células L1:	240
Nº de Células L2:	182
Nº de Células L3:	117
Nº de Células L4:	158
<u>Suma</u>	<u>697</u>

$$\text{Formula: } \frac{697}{4} \times 10000 = \frac{6970000}{4} = 1742500$$

Concentraciones (células/mL) = 1, 742500 células/mL

	Cuadrante L1 (09/11/2015)	Cuadrante L2 (09/11/2015)	Cuadrante L3 (09/11/2015)	Cuadrante L4 (09/11/2015)
Conteo de células	288	359	261	262

Nº de Células L1:	288
Nº de Células L2:	359
Nº de Células L3:	261
Nº de Células L4:	262
<hr/> Suma	1170

$$\text{Formula } \frac{1170}{4} \times 10000 = \frac{11700000}{4} = 2925000$$

Concentraciones (células/mL) = 2, 925000 células/mL

	Cuadrante L1 (10/11/2015)	Cuadrante L2 (10/11/2015)	Cuadrante L3 (10/11/2015)	Cuadrante L4 (10/11/2015)
Conteo de células	184	110	237	284

Nº de Células L1:	184
Nº de Células L2:	110
Nº de Células L3:	237
Nº de Células L4:	284
<hr/> Suma	815

$$\text{Formula } \frac{815}{4} \times 10000 = \frac{8150000}{4} = 2037500$$

Concentraciones (células/mL) = 2, 037500 células/mL

	Cuadrante L1 (11/11/2015)	Cuadrante L2 (11/11/2015)	Cuadrante L3 (11/10/2015)	Cuadrante L4 (11/11/2015)
Conteo de células	335	271	434	478

Nº de Células L1:	335
Nº de Células L2:	271
Nº de Células L3:	434
Nº de Células L4:	478
<hr/> Suma	1518

$$\text{Formula } \frac{1518}{4} \times 10000 = \frac{15180000}{4} = 3795000$$

Concentraciones (células/mL) = 3, 795000 células/mL

	Cuadrante L1 (12/11/2015)	Cuadrante L2 (12/11/2015)	Cuadrante L3 (12/11/2015)	Cuadrante L4 (12/11/2015)
Conteo de células	149	158	218	255

Nº de Células L1: 149

Nº de Células L2: 158

Nº de Células L3: 218

Nº de Células L4: 255

Suma 780

$$\text{Formula } \frac{780}{4} \times 10000 = \frac{7800000}{4} = 1950000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,950000 células/mL

	Cuadrante L1 (13/11/2015)	Cuadrante L2 (13/11/2015)	Cuadrante L3 (13/11/2015)	Cuadrante L4 (13/11/2015)
Conteo de células	260	365	348	342

Nº de Células L1: 260

Nº de Células L2: 365

Nº de Células L3: 348

Nº de Células L4: 342

Suma 1315

$$\text{Formula } \frac{1315}{4} \times 10000 = \frac{13150000}{4} = 3287500$$

Concentraciones (células/mL) = 3,287500 células/mL

	Cuadrante L1 (16/11/2015)	Cuadrante L2 (16/11/2015)	Cuadrante L3 (16/11/2015)	Cuadrante L4 (16/11/2015)
Conteo de células	195	240	278	190

Nº de Células L1	195
Nº de Células L2	240
Nº de Células L3	278
Nº de Células L4	195
<u>Suma</u>	908

$$\text{Formula } \frac{908}{4} \times 10000 = \frac{9080000}{4} = 2270000$$

Concentraciones (células/mL) = 2, 270000 células/mL

	Cuadrante L1 (17/11/2015)	Cuadrante L2 (17/11/2015)	Cuadrante L3 (17/11/2015)	Cuadrante L4 (17/11/2015)
Conteo de células	66	38	65	49

Nº de Células L1:	66
Nº de Células L2:	38
Nº de Células L3:	65
Nº de Células L4:	49
<u>Suma</u>	218

$$\text{Formula } \frac{218}{4} \times 10000 = \frac{2180000}{4} = 545000$$

Concentraciones (células/mL) = 545,000 células/mL

TUBO B

	Cuadrante L1 (02/11/2015)	Cuadrante L2 (02/11/2015)	Cuadrante L3 (02/11/2015)	Cuadrante L4 (02/11/2015)
Contero de células	14	5	21	45

Nº de Células L1:	14
Nº de Células L2:	5
Nº de Células L3:	21
Nº de Células L4:	45
Suma	85

$$\text{Formula: } \frac{85}{4} \times 10000 = \frac{850000}{4} = 212500$$

Concentraciones (células/mL) = 212.500 células/mL

	Cuadrante L1 (03/11/2015)	Cuadrante L2 (03/11/2015)	Cuadrante L3 (03/11/2015)	Cuadrante L4 (03/11/2015)
Contero de células	84	71	75	84

Nº de Células L1:	84
Nº de Células L2:	71
Nº de Células L3:	75
Nº de Células L4:	84
Suma	314

$$\text{Formula: } \frac{314}{4} \times 10000 = \frac{3140000}{4} = 785000$$

Concentraciones (células/mL) = 785.000 células/mL

	Cuadrante L1 (04/11/2015)	Cuadrante L2 (04/11/2015)	Cuadrante L3 (04/11/2015)	Cuadrante L4 (04/11/2015)
Conteo de células	29	120	81	54

Nº de Células L1	29
Nº de Células L2	120
Nº de Células L3	81
Nº de Células L4	54
Suma	284

$$\text{Formula: } \frac{284}{4} \times 10000 = \frac{2840000}{4} = 710000$$

Concentraciones (células/mL) = 710.000 células/mL

	Cuadrante L1 (05/11/2015)	Cuadrante L2 (05/11/2015)	Cuadrante L3 (05/11/2015)	Cuadrante L4 (05/11/2015)
Conteo de células	164	114	191	201

Nº de Células L1:	164
Nº de Células L2:	114
Nº de Células L3:	191
Nº de Células L4:	201
Suma	670

$$\text{Formula } \frac{670}{4} \times 10000 = \frac{6700000}{4} = 1675000$$

Concentraciones (células/mL) = 1,675000 células/mL

	Cuadrante L1 (06/11/2015)	Cuadrante L2 (06/11/2015)	Cuadrante L3 (06/11/2015)	Cuadrante L4 (06/11/2015)
Conteo de células	320	329	350	444

Nº de Células L1:	320
Nº de Células L2:	329
Nº de Células L3:	350
Nº de Células L4:	444
Suma	1443

$$\text{Formula } \frac{1443}{4} \times 10000 = \frac{14430000}{4} = 3607500$$

Concentraciones (células/mL) =3, 607500 células/mL

	<b>Cuadrante (07/11/2015)</b>	<b>L1</b>	<b>Cuadrante L2 (07/11/2015)</b>	<b>Cuadrante L3 (07/11/2015)</b>	<b>Cuadrante L4 (07/11/2015)</b>
Conteo de células	61		98	105	73

Nº de Células L1: 61  
 Nº de Células L2: 98  
 Nº de Células L3: 105  
 Nº de Células L4: 73  
 Suma 337

$$\text{Formula } \frac{337}{4} \times 10000 = \frac{3370000}{4} = 842500$$

Concentraciones (células/mL) =842.500 células/mL

	<b>Cuadrante (09/11/2015)</b>	<b>L1</b>	<b>Cuadrante L2 (09/11/2015)</b>	<b>Cuadrante L3 (09/11/2015)</b>	<b>Cuadrante L4 (09/11/2015)</b>
Conteo de células	131		205	117	193

Nº de Células L1: 131  
 Nº de Células L2: 205  
 Nº de Células L3: 117  
 Nº de Células L4: 193  
 Suma 646

$$\text{Formula: } \frac{646}{4} \times 10000 = \frac{6460000}{4} = 1615000$$

Concentraciones (células/mL) =1, 615,000 células/mL

	Cuadrante L1 (11/11/2015)	Cuadrante L2 (11/11/2015)	Cuadrante L3 (11/11/2015)	Cuadrante L4 (11/11/2015)
Conteo de células	36	103	3	37

N° de Células L1:	36
N° de Células L2:	103
N° de Células L3:	3
N° de Células L4:	37
<u>Suma</u>	179

$$\text{Formula } \frac{179}{4} \times 10000 = \frac{1790000}{4} = 447500$$

Concentraciones (células/mL) = 447,500 células/mL

	Cuadrante L1 (10/11/2015)	Cuadrante L2 (17/11/2015)	Cuadrante L3 (17/11/2015)	Cuadrante L4 (17/11/2015)
Conteo de células	61	49	16	50

N° de Células L1	61
N° de Células L2	49
N° de Células L3	16
N° de Células L4	50
<u>Suma</u>	176

$$\text{Formula } \frac{176}{4} \times 10000 = \frac{1760000}{4} = 440000$$

Concentraciones (células/mL) = 440,000 células/mL