

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE LA MICRO ALGA
SCENEDESMUS SP CERTIFICADA Y *SCENEDESMUS* SP (NATIVA) EN DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL



KEVIN ORTIZ MARTINEZ
CRISTIAN ALFONSO LOZANO DURAN



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO
2019

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE LA MICRO ALGA
SCENEDESMUS SP CERTIFICADA Y *SCENEDESMUS* SP (NATIVA) EN DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

KEVIN ORTIZ MARTINEZ
CRISTIAN ALFONSO LOZANO DURAN

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Ambiental

Asesor
MSc. MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL
Microbióloga Industrial

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2019

Autoridades Académicas

P. Juan Ubaldo LÓPEZ SALAMANCA, O.P.

Rector General

P. Mauricio Antonio CORTÉS GALLEGO, O.P.

Vicerrector Académico General

P. José Arturo RESTREPO RESTREPO, O.P.

Rector Sede Villavicencio

P. Rodrigo GARCÍA JARA, O.P.

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

Mg.JULIETH ANDREA SIERRA TOBÓN

Secretaria de División Sede Villavicencio

YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana Facultad de Ingeniería Ambiental.

Nota De Aceptación

JESICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana de Facultad

MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Director Trabajo de Grado

CHRISTIAN JOSÉ ROJAS REINA

Jurado

OLGA LUCIA CUBIDES DUSSAN

Jurado

Villavicencio, mayo 2019

Agradecimientos

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres **Liliana Duran** y **Alfonso Lozano**, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí. Ha sido un orgullo y un gran privilegio ser su hijo, son los mejores padres.

Agradezco de manera muy especial y sincera a mi directora de grado, la microbióloga **María Alexandra Méndez Leal** por haber confiado en mí, y darme todo su apoyo y ayuda a lo largo del desarrollo de este trabajo de Grado. Su experiencia y conocimiento brindado han sido un aporte invaluable. Agradecimientos a la decana de la facultad de ingeniería ambiental **Jesica Natalia Mosquera Beltrán** y la coordinación de laboratorios de la universidad Santo Tomas Sede Villavicencio por su apoyo para la terminación de este proyecto de grado.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Cristian A. Lozano Duran

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio.

Agradecemos a nuestros docentes de la Universidad Santo Tomas Sede Villavicencio, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, a la microbióloga **María Alexandra Méndez Leal** tutora de nuestro proyecto de investigación quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente, y a la decana de la facultad de ingeniería ambiental **Jesica Natalia Mosquera Beltrán** y la coordinación de laboratorios de la universidad Santo Tomas Sede Villavicencio por su apoyo para la terminación de este proyecto de grado.

Kevin Ortiz Martínez

Tabla de contenido

	Pág.
Resumen.....	10
Abstract	11
Introducción	12
1. Capítulo I.....	14
1.1. Planteamiento del problema	14
1.1.1. Descripción del Problema	14
1.1.2. Formulación en torno al problema.....	16
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo General	16
1.2.2. Objetivos Específicos.....	16
1.3. Justificación	17
1.4. Alcance del Proyecto	19
2. Capítulo II.....	20
2.1. Antecedentes	20
2.2. Marco Teórico	22
2.2.1. Biocombustibles de Primera Generación.....	22
2.2.2. Biocombustibles de Segunda Generación.....	23
2.2.3. Biocombustibles de Tercera Generación	23
2.2.4. Biocombustibles en Colombia	24
2.3. Marco Conceptual	27
2.4. Marco Legal	29
3. Capítulo III	33
3.1. Metodología	33
3.1.1. Diseño Metodológico	33
4. Capítulo IV	40
4.1. Resultados y Análisis de Resultados.....	40
4.1.1. Identificación de algas presentes en la muestra de agua del Caño Aguas Claras.....	40

4.1.2.	Análisis del crecimiento de <i>Chlorella</i> sp y de la ausencia de <i>Scenedesmus</i> sp Caño Aguas Claras	41
4.1.3.	Diseño Experimental	46
4.1.3.1.	Montaje de los medios de cultivo	46
4.1.4.	Recuento celular.....	47
4.1.5.	Análisis con énfasis a las fases de la curva de crecimiento y fuentes nitrógeno	50
4.1.5.1.	Adaptación o latencia.....	50
4.1.5.2.	Crecimiento exponencial	51
4.1.5.3.	Estacionaria.....	53
4.1.5.4.	Declive o fase de muerte.....	54
4.1.6.	Análisis con énfasis en intensidad lumínica y climatología	55
4.1.7.	Nubosidad en Villavicencio.....	57
4.1.8.	Recuento microbiano de densidad celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> ..	59
4.1.9.	Producción de biomasa.....	64
4.1.10.	Producción de aceite.....	66
4.1.11.	Correlación luz – concentración celular según correlación Pearson	69
4.1.12.	Correlación alimento – Concentración celular	69
	Conclusiones	71
	Recomendaciones	72
	Referencias bibliográficas.....	73

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Localización de muestreos	34
Figura 2 Medio de cultivo en fotobiorreactores.....	36
Figura 3. Curva de Crecimiento.....	36
Figura 4. Reglilla de Neubauer de 9 mm ²	38
Figura 5. Obtención e inoculación de la cepa certificada y nativa de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i>	40
Figura 6. Muestra de la microalga <i>Chlorella</i> sp	45
Figura 7. Medios de Cultivo en luz natural y en luz artificial	47
Figura 8. Recuento del crecimiento celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> expuesta a luz natural	48
Figura 9. Recuento de crecimiento celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> expuesta a luz artificial	49
Figura 10. Comparación del crecimiento celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> entre condiciones de luz natural y luz artificial en el cultivo con presencia de harina de soja.....	56
Figura 11. Curva de crecimiento de densidad óptica de <i>Scenedesmus acutus</i> en luz natural	61
Figura 12. Curva de crecimiento de densidad óptica de <i>Scenedesmus Acutus</i> en luz artificial	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Producción de porcentaje de lípidos reportados en diferentes microalgas.	18
Tabla 2. Normatividad Colombiana para Biodiesel.....	31
Tabla 3. Diseño Experimental.....	35
Tabla 4. muestreos en el humedal aguas claras	41
Tabla 5. muestreos en el humedal aguas claras	42
Tabla 6. Caracterización del Caño aguas claras.....	43
Tabla 7. Caracterización de nitratos.....	43
Tabla 8. Características de la microalga <i>Chlorella</i> sp	46
Tabla 9. Porcentajes de nitrógeno	46
Tabla 10. Recuento de crecimiento celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> expuesta a luz natural	47
Tabla 11. Recuento de crecimiento celular de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> expuesta a luz artificial	48
Tabla 12. Composición de la gallinaza por “BIORGANICOS E.U”.	52
Tabla 13. Tabla comparativa del medio de cultivo con presencia de Harina de Soja	55
Tabla 14. valores de intensidad lumínica en condiciones de luz natural y luz artificial.....	57
Tabla 15. Climatología de los días de muestreados	58
Tabla 16. Densidad Óptica a luz natural	59
Tabla 17. Densidad Óptica a luz artificial	60
Tabla 18. Producción de biomasa en luz natural	64
Tabla 19. Producción de biomasa en luz artificial.....	65
Tabla 20. Producción de aceite	66
Tabla 21. Análisis Correlacional entre las variables (luz implementada, alimentos implementados, número de células, biomasa de las muestras).	66
Tabla 22. Análisis Correlacional entre las variables (luz implementada, alimentos implementados, número de células, biomasa de las muestras).	68

Resumen

Las micro-algas, han demostrado ser una alternativa con muchas ventajas como sustituyentes de los monocultivos de oleaginosas para la producción de biocombustibles, puesto que comparativamente, tienen una tasa de crecimiento mayor debida a la alta eficiencia fotosintética, con una producción de aceite de 7 a 30 veces superior a dichos cultivos (Fernández, 2004) (Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI, 2008)

Por esto se desarrolló el presente proyecto en tres fases, la primera fase; se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la USTA Villavicencio, donde se buscó identificar y aislar las algas nativas, a partir de muestras de agua del Caño Aguas Claras ubicado en el campus Aguas Claras, obteniéndose la identificación de *Chlorella* sp. En contraste con lo anterior, en los cuatro meses de estudio no se consiguió realizar el aislamiento de la microalga *Scenedesmus* sp nativa; la adquisición de la cepa certificada de *Scenedesmus acutus*, se realizó del banco de cepas del laboratorio de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de los Llanos, a la cual se le evaluó el crecimiento celular y la producción de lípidos variando las fuentes de nitrógeno y las condiciones lumínicas.

Posteriormente al medio de cultivo caldo alga, se le adicionaron 3 sustratos ricos en nitrógeno 4 g/L gallinaza, 2,2 g/L harina de soja y 3,2 g/L harina de pescado, por triplicado, en dos condiciones de iluminación (artificial y natural) durante 3 meses, se determinó que el mayor crecimiento celular se obtuvo al emplear al emplear como fuente de nitrógeno, la harina de soja. En la segunda fase, se implementó la centrifugación, destilación y extracción con el método Soxhlet siguiendo las indicaciones del SM 5520D, obteniéndose un rendimiento de 0,7ml, siendo un volumen inferior al requerido (mínimo 40 ml) para la identificación del perfil lipídico. En la tercera fase y se realizó un análisis estadístico con la correlación de Pearson entre las fuentes de nitrógeno empleadas y la producción de biomasa y aceite a partir del alga de estudio.

Palabras clave: Fotobiorreactor, lípidos, *Scenedesmus* sp, biodiesel, biomasa, microalga, nitrógeno, crecimiento celular, biocombustibles.

Abstract

Microalgae have proved to be an alternative with many advantages as substituents of oilseed monocultures for the production of biofuels, since comparatively, they have a higher growth rate due to the high photosynthetic efficiency, with 7% of an oil production 30 times higher than these crops (Fernández, 2004) (Instituto Amazónico de investigación Científicas SINCHI, 2008) This is why, the present experimental research was carried out with a quantitative and qualitative approach, which seeks to contribute to the generation of third generation biofuels through the production of oil for biodiesel from microalgae.

The project was developed in three stages, the first one was carried out in the Microbiology laboratory of the Universidad Santo Tomás Villavicencio, where it was sought to identify and isolate the native algae, from water samples from the Caño Aguas Claras located in the main headquarters, obtaining the identification of *Chlorella* sp. In contrast to the above, in the four months of the study the isolation of the native microalgae *Scenedesmus* sp was not achieved; the acquisition of the certified strain of *Scenedesmus acutus* was made from the strains bank of the Agroindustrial Engineering laboratory of the Universidad de los Llanos, which was evaluated for cell growth and lipid production by varying nitrogen sources.

The nitrogen regulates the yield of intracellular lipids in the micro algae, therefore, alga broth culture medium, 3 nitrogen-rich substrates were added 4 g / L chicken manure, 2,2 g / L soybean meal and 3,2 g / L fish meal, in triplicate, in two lighting conditions (artificial and natural) for 3 months, it was determined that the highest cell growth was obtained when using soy flour as a nitrogen source. In the second stage, centrifugation, distillation and extraction were implemented with the Soxhlet method following the indications of the SM 5520D, obtaining a yield of 0,7ml, Finally, in the third stage, a statistical analysis was carried out with the Pearson correlation between the nitrogen sources used and the production of biomass and oil from the study algae.

Keywords: Photobioreactor, lipids, *Scenedesmus* sp, biodiesel, biomass, microalgae, nitrogen, cell growth, biofuels.

Introducción

En el transcurso del año 2008, los biocombustibles tomaron un nuevo impulso en virtud del incremento de precios en alimentos y combustibles tradicionales, como una solución para sustituir al petróleo y a su vez disminuir los efectos negativos causados por éste (Salinas Callejas & Gasca Quezada, 2009). Esta demanda de biocombustibles, se ha mantenido e incrementado hasta ahora, debido a las mezclas legalizadas entre biodiesel y diésel; éstas a la vez, emiten menos gases de efecto invernadero cuando se queman comparadas con el diésel de petróleo (FAO, 2008)

De acuerdo; a la biomasa de donde se realice el proceso de extracción de aceite para la fabricación de biodiesel, se les clasifica en generaciones, los de primera generación y segunda, proceden de cultivos agrícolas y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites (Maciel, 2009). Colombia, posee 65 mil ha de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) sembrada, siendo el cuarto productor de aceite del mundo y el primero en América. La mayoría de la producción se emplea en la fabricación de biodiesel y otros subproductos como concentrados para animales, jabones, cosméticos, pintura, y tinta para impresiones, entre otros (Cárdenas, 2016)

Sin embargo, la producción de aceite por hectárea de palma no es suficiente para cubrir la totalidad de la demanda de biodiesel, aumentado día a día el tamaño de las plantaciones, específicamente en el departamento del Meta se incrementó de 65.164 ha el año 2004 a 141.068 ha en 2015, lo que ha generado algunos conflictos, como el uso del suelo, inseguridad alimentaria, deforestación de selvas tropicales, desplazamiento de comunidades campesinas y de fauna silvestre, vertimiento de aguas residuales e intoxicación en trabajadores por el uso de plaguicidas y pesticidas (R. Triana, 2014)

A partir de esta problemática, se suscitó la búsqueda de otras fuentes de biocombustibles, permitiendo el desarrollo de la tercera generación, conocida como cultivos energéticos; entre los que se encuentran los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las micro-algas verdes y verde azules (M. Triana, Martínez, & Cañizares, 2013) . Siendo, las micro-algas, una

alternativa con muchas ventajas como sustituyentes de los monocultivos de oleaginosas, puesto que comparativamente, tienen una tasa de crecimiento mayor debida a la alta eficiencia fotosintética, con una producción de aceite estimada entre 4.6 y 1.8 L/m², es decir, 7 a 30 veces superior a dichos cultivos; así mismo, no compiten por el suelo con los cultivos, ya que crecen tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, requiriendo espacios pequeños para su producción (Fernandez, 2004) (Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI, 2008).

Por esto la presente investigación de tipo experimental con enfoque cuantitativo y cualitativo, busca aportar insumos básicos para la generación de biocombustibles de tercera generación (cultivos energéticos) a través de la producción de aceite para biodiesel a partir de micro algas. En atención a esto, se desarrolló el proyecto en tres fases, la primera fase, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la USTA Villavicencio; se buscó identificar y aislar las algas nativas, especialmente *Scenedesmus* sp, a partir de muestras de agua del Caño Aguas Claras ubicado en el campus Aguas Claras, obteniendo la identificación de, *Chlorella* sp. Sin embargo, durante los cuatro meses de estudio no se consiguió realizar el aislamiento de esta última, debido a que su presencia fue escasa o nula. Posteriormente se logró obtener la microalga *Scenedesmus acutus* proveniente del banco de cepas del laboratorio de algas del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de los Llanos. Se buscó evaluar el crecimiento celular y la producción de lípidos variando las fuentes de nitrógeno, ya que este nutriente regula la producción de biomasa y por ende el rendimiento de lípidos intracelulares, en el medio de cultivo líquido caldo alga, adicionando 4 g/L gallinaza, 2,2 g/L harina de soja y 3,2 g/L harina de pescado, por triplicado, en dos condiciones de iluminación (artificial y natural) durante 3 meses. La segunda fase, realizada en el laboratorio de Toxicología de la USTA Villavicencio, se implementó la centrifugación, destilación y extracción por el método Soxhlet siguiendo las indicaciones del SM 5520D, obteniendo un rendimiento de aceite 0,7ml, siendo un volumen inferior al requerido (mínimo 40 ml) para la identificación del perfil lipídico.

1. Capítulo I

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Descripción del Problema

La demanda mundial de energía a partir de la quema de combustibles fósiles; representan actualmente más del 80% del suministro total de energía, ocasionando el aumento en la emisión de gases de efecto invernadero. Gases reactivos liberados a la atmósfera, a partir de actividades antrópicas, ocasionan cambios en el comportamiento climático, algunos compuestos de carbono, NO_x, compuestos orgánicos persistentes y acidificantes, y metales pesados debido a la combustión contribuyen al calentamiento global (Borja, 2017). Un ejemplo claro se observa con el aumento de los niveles de CO₂ a medida del transcurso de los años, ya que la concentración que se tenía para el año 1958 era de 280 ppm y la que se midió para el año 2018 fue de 402.5ppm. (Bohórquez, 2013)

Por tanto, ante los drásticos cambios, se han buscado soluciones alternativas que destaquen por producir niveles inferiores de gases efecto invernadero y otros contaminantes, comparados con las fuentes de energía fósil; entre estos sustituyentes energéticos, destacan los “biocombustibles”, como el bioetanol, biobutanol, biodiesel, aceites vegetales, bioetanol, aceites de pirólisis, biogás y biohidrógeno. Una de las apuestas en ese sentido en el uso del bioetanol y el biodiesel, en el transporte, como combustibles líquidos a base de biomasa que podrían reemplazar la gasolina y el diésel, respectivamente (SciDev.Net América Latina y el Caribe, 2007)

La producción mundial de biodiésel se extrae de aceite vegetal no comestible, aceite residual y grasa, es decir a partir de palma de aceite, aguacate, coco, girasol y soja (cultivos oleaginosos), permitiendo satisfacer una demanda global de 9 millones de Litros en 2007. En Colombia la demanda del cultivo de palma de aceite, ha aumentado con el transcurso del tiempo, pasando de 5 mil has en el año 1962, a 103 mil has a finales de los años 80, y superando actualmente las 500

mil has (Fedepalma, 2017). Específicamente, el departamento del Meta ocupa el primer lugar en el país, con un total de 141.068 ha de cultivo de palma de aceite sembradas. Adicionalmente hay que mencionar que, el incremento de los monocultivos ha generado afectaciones ambientales directas e indirectas, como la destrucción de bosques, sabanas y vida silvestre dado el alto consumo de agua, producción de aguas residuales, pérdida de la capa vegetal, conflictos en el uso del suelo debido a la tenencia, ya que algunas comunidades rurales se han desplazado, para dar lugar a estas plantaciones (Altieri, 2009).

De tal manera, que los avances tecnológicos han continuado con la búsqueda de la sustentabilidad de la industria del biodiesel, requiriendo materias primas alternas que permitan operar continuamente y mitiguen los impactos ambientales y sociales señalados anteriormente (Hansen *et al.* 2005). Tal es el caso de la obtención de aceites a partir de cultivos de micro algas, debido al elevado contenido de triglicéridos por transesterificación, menor requerimiento de espacios para su producción, es decir, no compite por el uso de suelo y son totalmente biodegradables (Tupiñón, 2016)

Entre los géneros de microalgas que destacan como eficientes productores de aceites para biodiesel, sobre salen las especies de *Scenedesmus* sp, por tanto, a partir del Grupo de Estudio para el Uso de la Biomasa como Energía Renovable (GEUBER), se proyectó la obtención, identificación y estudio del comportamiento, de este género al cambiar las fuentes de nitrógeno, nutriente clave en el aumento de biomasa y el contenido lipídico intracelular, además se varió la fuente lumínica (luz natural o artificial en tiempos de 12 horas) de la cepa de *Scenedesmus acutus* proveniente del banco de cepas del laboratorio de algas del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de los Llanos. Las microalgas han demostrado ser la fuente de energía con mejor eficiencia como sustituyente energético con respecto a los monocultivos oleaginosos; puesto que tienen una tasa de crecimiento mayor y la producción del aceite es estimada entre 1,8 y 4,6 L/m², siendo de 7 a 30 veces mayor que cultivos de oleaginosas (Tupiñón, 2016).

1.1.2. Formulación en torno al problema

1.1.2.1. Problema General

¿Cómo varía el recuento celular y la producción de lípidos de *Scenedesmus acutus* (adquirida de cepario), a partir de la modificación de la fuente de nitrógeno y la variación de dos condiciones lumínicas?

1.1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuánto variaría el crecimiento celular, cantidad de biomasa, y el porcentaje de lípidos en *Scenedesmus acutus* con las fuentes de nitrógeno gallinaza, harina de soja, y harina de pescado?
- ¿Con cuál de las condiciones lumínicas (luz natural, luz artificial) se podría obtener mayor crecimiento celular, cantidad biomasa, y mayor porcentaje de lípidos de *Scenedesmus acutus*?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

O.G. Evaluar el comportamiento generado en el crecimiento celular y en la producción de lípidos del micro alga *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus* sp (nativa) a partir de la variación de fuentes de nitrógeno (de bajo costo), en dos condiciones lumínicas.

1.2.2. Objetivos Específicos

O.E.1. Determinar la variación del recuento celular y producción de lípidos de *Scenedesmus acutus* (certificada) y *Scenedesmus* sp (nativa) a partir de la modificación de la fuente de nitrógeno de bajo costo (gallinaza, harina de pescado, harina de soja)

O.E.2. Comparar la variación de la producción de lípidos, crecimiento celular, cantidad de biomasa *Scenedesmus acutus* (certificada) y *Scenedesmus* sp (nativa) a partir de la modificación de las condiciones lumínicas (luz natural, luz artificial).

O.E.3. Analizar la correlación entre las modificaciones de las condiciones de medios de cultivo (variando la fuente de nitrógeno y condiciones lumínicas) sobre el crecimiento celular y la producción de lípidos de *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus* sp (nativa).

1.3. Justificación

Los biocombustibles tienen niveles de oxígeno del 10 al 45%, mientras que el petróleo no tiene prácticamente ninguno, lo que hace que las propiedades químicas de los biocombustibles sean muy diferentes de las de petróleo, representando una gran alternativa para suplir la demanda energética global actuando como sustituyentes energéticos, principalmente en lo que se refiere al sector del transporte (Salinas Callejas & Gasca Quezada, 2009). Como combustible estos son mucho más ecológicos que los convencionales, el Fondo Mundial para la Naturaleza World Wildlife Fund (WWF), menciona que la utilización de biocombustibles bajo prácticas sostenibles podría reducir de un 55% a 80% las emisiones de gases contaminantes a nivel mundial (“La Hora del Planeta 2009 marca nuevos récords en la lucha contra el cambio climático,” 2009).

Una de las desventajas de la utilización de biocombustibles de primera generación o provenientes de productos agrícolas destinados a la alimentación humana, es que podrían poner en riesgo la seguridad alimentaria de la población y pueden causar una pérdida de biodiversidad por monocultivos (Salinas Callejas & Gasca Quezada, 2009)(“La Hora del Planeta 2009 marca nuevos récords en la lucha contra el cambio climático,” 2009). Sin embargo, los biocombustibles de tercera generación, como es el caso del biodiesel producido a partir de micro algas, por el contrario utilizan eficientemente el área de terreno para su producción y no ponen en riesgo la seguridad alimentaria, una vez que los lípidos son extraídos de las micro algas, la biomasa puede ser utilizada para producir etanol, metano, alimento de ganado o fertilizante orgánico, entre otros (El-Haggar, 2010). Los biocombustibles son importantes porque reemplazan los combustibles derivados del petróleo. En general, se considera que los biocombustibles abordan muchas de las preocupaciones actuales relacionadas con la energía, incluida la sostenibilidad, la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, el desarrollo regional, la estructura social y la agricultura y la seguridad del suministro energético (Reijnders 2006).

En la actualidad las investigaciones se enfocan en mejorar la eficiencia de la producción de biodiesel a partir de micro algas, disminuyendo el precio de este combustible y convirtiéndolo en un combustible comercialmente atractivo. Las micro algas han demostrado ser la fuente de energía más económica, ya que alcanzan la mayor producción de aceite en corto tiempo y menor espacio de producción, secuestran el dióxido de carbono, y la reproducción es muy rápida, duplicando la producción cada 8 horas aproximadamente, produciendo entre 15 y 300 veces más aceite para la obtención de biodiesel que los cultivos tradicionales en función de la superficie.

Entre más de 100 especies de micro algas, *Scenedesmus* sp ha sido reportada como una de las de mayor potencial para la producción de biodiesel (Tupiñón, 2016). Por ello, se han considerado diferentes especies de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp (Tabla 1) como candidatas para la producción comercial de lípidos debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo (Jesus, 2012)

Tabla 1.

Producción de porcentaje de lípidos reportados en diferentes microalgas.

Microalgas (Especie)	Lípidos (peso seco %)
<i>Chlorella emersoni</i>	63
<i>Chlorella</i> sp	19-43
<i>Chlorella vulgaris</i>	15 - 58
<i>Hecmatococcus pluvialis</i>	35
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 -43
<i>Scenedesmus</i> sp.	7 – 53

Nota: se observa en detalle la producción de lípidos reportados en las diferentes especies de microalgas. por (Rodríguez,2016)

El cultivo y la obtención de aceite a partir de *Scenedesmus acutus* presenta muchas ventajas con respecto a los cultivos de oleaginosas; puesto que tienen una tasa de crecimiento mayor y la producción de lípidos es estimada entre 4.6 y 1.8 L/m², lo cual es de 7 a 30 veces mayor que cultivos de oleaginosas, requiriendo pequeños espacios para su producción (Tupiñón, 2016).

1.4. Alcance del Proyecto

El presente proyecto tuvo como alcance, evaluar el comportamiento generado en el crecimiento celular y en la producción de lípidos de las micro algas *Scenedesmus* sp y *Scenedesmus* sp (nativa) a partir de la variación de fuentes de nitrógeno (Gallinaza, harina de pescado, harina de soja), en dos condiciones lumínicas (luz natural y luz artificial), para la producción de aceite para biodiesel. Para esto, se llevó a cabo pruebas *ex-situ* durante un tiempo de 4 a 6 meses en los laboratorios de Toxicología y Microbiología de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio.

Al finalizar el tiempo de muestreo de las pruebas se tomaron dos meses para la recopilación, análisis y elaboración del informe final.

2. Capítulo II

2.1. Antecedentes

El empleo de biocombustibles se reporta a partir de 1895, cuando el Dr. Rudolf Diésel desarrolló el primer motor a diésel, al cual se le incorporó aceites vegetales como el aceite de maní para la combustión interna (Martin, 2010). En 1908, Henry Ford utilizó etanol, elaborado a partir de aceites vegetales para los vehículos diseñados por su empresa, pero los altos costos del maíz, de almacenamiento y de la producción ocasionaron que el proyecto decayera, además el petróleo penetró en el mercado con un costo más barato, mejor eficiencia y disponibilidad (“Biocombustibles,” 2010).

Aunque, poco a poco, los biocombustibles han vuelto a retomar fuerza en el mercado actual debido a la crisis del petróleo desencadenada el 23 de agosto de 1973 debido a la acción de la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) de no exportar más petróleo a aquellos países que habían apoyado a Israel durante la guerra de Yom Kippur, en la cual participó Israel, Siria y Egipto. Esto provoca que aquellos países cuya industrialización dependía del petróleo fueran enormemente afectados, de esto nace una crisis energética en la cual cada país se hace responsable”(HOBBSAWM, 1998).

Por lo anterior el precio del petróleo se elevó enormemente, “esta crisis afectó a todos los países del mundo, principalmente a aquellos países sin reservas petrolíferas o producción suficiente del recurso. Entre estos últimos estaban Brasil y Estados Unidos”. De tal forma, que los países afectados, iniciaron la búsqueda de sustituyentes energéticos para no volver a depender 100% de los combustibles fósiles. “A fines de 1979 se estableció una mezcla de gasolina y etanol: los biocombustibles se volvían a presentar como una alternativa al alza de los precios del petróleo y al posible agotamiento de los recursos no renovables” (Altieri, 2009).

En Sur América, Brasil empezó su desarrollo en biocombustibles a base de aceites vegetales en el año 1975 por medio de un proyecto llamado pro-alcohol con el objetivo de no poner en riesgo su seguridad energética (Salinas, 2009).

Posteriormente, a partir de 2008, Estados Unidos y Brasil elevaron el uso de biocombustibles de primera generación para no depender de los combustibles fósiles y a su vez mitigar los impactos negativos que se causaban al medio ambiente por la extracción de petróleo, y la quema de combustibles fósiles, iniciando investigaciones para encontrar la mejor alternativa, estudiando detalladamente las ventajas y las desventajas de los biocombustibles de primera generación, segunda generación, y tercera generación (Salinas, 2009).

A partir de esto se han venido realizando investigaciones, empleando el cultivo de micro algas, para la obtención de aceites como fuente de energía, con mejor eficiencia como sustituyente energético con respecto a los monocultivos oleaginosos, dado que se requiere de menor espacio de producción y su rendimiento productivo de aceites es superior.

Así mismo en 2016 en la ciudad de Lima Perú, estudiantes de la Universidad Ricardo Palma llevaron a cabo la investigación “Cultivo de la microalga *Scenedesmus Obliquus* var. *Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos”, para determinar a través de qué medio de cultivo (Guillar, BG-11 y Bayfolan) esta microalga tendría mejor crecimiento celular y por ende mejor rendimiento productivo de aceites y lípidos, llevando a cabo la medición y control de los niveles de luz, CO₂, temperatura, nutrientes y aire. Concluyendo, que el medio de cultivo Bayfolan Forte, permitió un desarrollo óptimo de crecimiento celular al quinto día, debido a que posee los nutrientes necesarios para el incremento de biomasa, determinando 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 % (Tupiñón, 2016)

En Colombia, se han desarrollado investigaciones similares en busca del medio adecuado de cultivo para una mejor producción y obtención no solo de biocombustibles a partir de micro algas, también de alimentos funcionales con alto contenido nutricional dado su alto contenido aminoacídico; en la Universidad de Antioquia de la ciudad de Medellín por parte de la facultad

de química farmacéutica se llevó a cabo un proyecto de carácter experimental “Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal” con el cual se buscaba el medio de cultivo donde se pueda alcanzar la mayor producción de biomasa y proteína de la micro alga verde (MORALES V, 2008). Concluyendo, que según el perfil aminoacídico obtenido para la micro alga *Scenedesmus sp*, ésta tiene aplicación potencial en la industria de alimentos balanceados para animales, siendo cultivada en el medio Estándar 2, debido a que es allí donde presenta la mayor concentración de biomasa y proteína, además, recomiendan emplear CO₂ como fuente de carbono (MORALES V, 2008).

Otro de los asuntos que surgen como motivo de investigación en busca de fuentes de energía limpia para la producción de biocombustibles, es el desarrollo de un montaje para la creación de un banco de cepas de microalgas nativas para procesos de biorremediación, bioensayos y bio-productos, en el centro Internacional Náutico Fluvial y Portuario del SENA (Virviescas, Martha; Aponte, 2016)

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Biocombustibles de Primera Generación

Los biocombustibles de primera generación son producidos a partir de cultivos alimenticios como “el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuate, entre otros, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites” (Maciel, 2009).

Estos biocombustibles se producen con tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenida a partir de los desperdicios orgánicos) (Maciel, 2009).

La ventaja de los biocombustibles de primera generación es que los cultivos de los cuales procede asimilan el CO₂ que se produce al generar combustión de los motores de los vehículos, pero tiene una gran desventaja debido a la gran necesidad de tierras para cultivo, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria.

2.2.2. Biocombustibles de Segunda Generación

Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Se usan como materias primas el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallos, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

Estos biocombustibles tienen una desventaja, ya que los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto que los de primera generación, y como ejemplos destacan la sacarificación, fermentación y el proceso Fischer-Tropsch. Respectivamente, los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulosa de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol. Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2,5-dimetilfurano (DMF), entre otros (Maciel, 2009).

2.2.3. Biocombustibles de Tercera Generación

Los biocombustibles de tercera generación o cultivos energéticos se están dando a conocer como la mejor alternativa para ser sustituyente energético de los combustibles fósiles; debido a la eficiencia de producción de aceites en menor espacio con respecto a los monocultivos. Para la generación de estos, se emplean como materias primas los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde azules.

“Los procesos de obtención de biocombustibles a partir de micro algas se encuentran en desarrollo, en países como, Chile, Perú, China y España, quienes son pioneros en estas

investigaciones, sin embargo, en los actuales momentos se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel de planta piloto. Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de anhídrido carbónico (CO₂) para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero; sin embargo su desventaja radica en la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos como los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido; con excepción de las algas verdes”(Maciel, 2009).

2.2.4. Biocombustibles en Colombia

En Colombia, se desarrolla la producción de biocombustibles apoyados en la Ley 693 de 2001, denominada ley del etanol carburante y la ley 939 de 2004 o ley del biodiesel. El etanol de caña de azúcar empezó a producirse el 3 de octubre de 2005 y el biodiesel de aceite de palma el 1 de enero de 2008 (Bendeck, 2017).

A partir de la implementación de la legislación, aumento la demanda de biocombustibles de manera progresiva, mezclándose con otros combustibles, hasta alcanzar un promedio del 8 % en las gasolinas. Igualmente, la mezcla de biodiesel con el ACPM, actualmente es del 10% en todo el país, excepto en Bogotá y su área de influencia donde la mezcla es del 9%. Para alimentar las plantas productoras fue necesario sembrar 165 mil hectáreas de palma africana y aumentar los cultivos de caña de azúcar a 30 mil nuevas hectáreas (Bendeck, 2017).

La palma de aceite es el principal cultivo oleaginoso para la producción de biodiesel a nivel mundial, dado que es el que mayor cantidad de aceite produce por unidad de área sembrada y, por lo tanto, es la materia prima que ofrece mejores posibilidades para su producción a nivel nacional (Herrera, 2009).

El Departamento del Meta tiene actualmente unas condiciones edafológicas y climáticas, para participar por su tradición en el cultivo de la palma, ubicándolo como el Departamento con mayor área sembrada en palma de aceite en el país con 120.892 has., en el año 2009 y con posibilidades de expansión del cultivo de palma en extensas áreas que no tienen restricciones para su siembra, como también para el establecimiento de cultivos de caña de azúcar en la altillanura plana, donde

ofrece alrededor de un millón de hectáreas (García, 2010). Esta región, rica en agua y suelos, cosecha más de un millón de toneladas de arroz, palma y soja, al año, ocupando el primer lugar en el país, al igual que plátano, maíz, frutales, entre otros.

La palma africana *Elaeis guineensis* ha ampliado la frontera agrícola e incluso ha ocupado tierras dedicadas a la ganadería y al arroz. Es llamada por algunos sectores como el cultivo líder del Meta, en el que es primer productor nacional con una participación del 35%. La palma, según la secretaría de Agricultura de la Gobernación del Meta, genera 5.000 empleos directos y 10.000 indirectos. Existen 18 plantas extractoras con una capacidad instalada de 212 toneladas/fruto/hora y una capacidad de almacenamiento de 20.800 toneladas (Meta, primero en palma, soja y arroz, 2005).

La expansión de los monocultivos oleaginosos para la producción de biodiesel a gran escala lleva a la destrucción de bosques, sabanas y vida silvestre; eleva el precio del suelo y de los alimentos. Además, impacta negativamente en las comunidades rurales que son expulsadas de sus tierras para dar lugar a estas plantaciones (Altieri, 2009)

La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y mitiguen los impactos ambientales y sociales señalados. Una alternativa prometedora es la obtención de aceites a partir de cultivos de micro algas. Debido a esto han aumentado las investigaciones para realizar biocombustibles de tercera generación a partir de micro algas, a continuación, se presentan resúmenes de investigaciones destacadas.

En el artículo de revisión, “Una visión sobre la alteración de las células de algas para la producción de biodiesel”, estudiaron las técnicas de alteración celular (molienda de perlas, la homogeneización a alta presión, la ultrasonificación, la liofilización, el tratamiento ácido y la lisis enzimática) útiles para la eficiencia de la extracción de lípidos intracelulares, es decir, al optimizar el proceso de extracción se obtendrá mayor rendimiento en la producción de biodiesel a partir de algas, concluyen que aunque requiere mayores estudios para la óptima recuperación de los lípidos, reducción de costos operativos y consumo de energía, se debe seguir investigando con la producción de biodiesel sostenible, debido a que algunas especies de algas poseen mayor

contenido de lípidos, mayor tasa de crecimiento, mayor producción de biomasa y menor uso del suelo. (“An insight on algal cell disruption for biodiesel production,” 2018)

En el artículo de revisión, realizado por Vishwanath y Col en Noruega, “Hacia la producción sostenible de biocombustibles a partir de microalgas”; afirman que los biocombustibles renovables y neutros en carbono, como los obtenidos a partir de algas, son necesarios para el medio ambiente y la sostenibilidad económica, ya que satisfacen las necesidades energéticas y ambientales de la sociedad. Realizan una crítica fuerte a la producción de biocombustibles de primera generación debido al conflicto con el suministro de alimentos y concluyen analizando y promoviendo enfoques de integración técnica y tecnológica (ejemplo: licuefacción hidrotérmica, para la conversión directa de algas en líquido combustible) que incrementen la producción de combustibles empleando algas. (“Towards sustainable production of biofuels from microalgae,” 2008)

En el 2016, Kurniawati y co *et al*, en el artículo de conferencia, denominado “efecto de la intensidad de la luz para la producción óptima de biomasa y lípidos de *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing (estos últimos hacen referencia a los autores que han aislado y entregado al banco de algas la muestra), presentaron y afirmaron que un sustituto de energía alternativa para las materias primas del petróleo son los aceites vegetales renovables conocidos como biodiesel, el cual se puede producir a partir de microalgas, enfocándose en *Scenedesmus dimorphus* (Turpin), conocida por su alta producción de lípidos; así, que determinaron la tasa de crecimiento en diferentes tipos de iluminación (7,500, 10,000 y 12,500 lux) y la intensidad luminosa óptima para la producción de biomasa y lípidos, obteniendo que la tasa de crecimiento óptima y producción de lípidos se obtuvo con la intensidad de 12.500 lux, la cual se aplicará en el presente estudio. (“Effect of Light Intensity for Optimum Biomass and Lipid Production from *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing,” 2016)

En el artículo “Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater” reportan el uso de la microalga *Scenedesmus acutus* para realizar biorremediación en aguas residuales urbanas y aprovechamiento de la biomasa para la producción de proteínas y energía, se cultivó en un fotobiorreactor de columna vertical utilizando

un medio de crecimiento estándar, obteniendo una productividad máxima de 0,3 g de peso seco L^{-1} d. Cuando se cultivó la misma cepa en el fotobiorreactor lleno de aguas residuales recolectadas en el paso final de la planta purificadora urbana local que contenía 18,8 mg de L^{-1} nitrato, se determinó la eliminación completa de nitrógeno junto con una producción de biomasa de aproximadamente 0,74 g de peso seco L^{-1} en los primeros 3 días de fermentación, después de 10 días, se analizó el contenido de triglicéridos en la biomasa recuperada, encontrando un rendimiento de 9,3%. Por tanto, el presente proyecto determinó el comportamiento de crecimiento y producción de aceites, empleando fuentes de nitrógeno económicas, con cepas del género *Scenedesmus*.

2.3. Marco Conceptual

Las Micro algas son microorganismos unicelulares que tienen la capacidad de generar biomasa orgánica a partir del alimentarse de luz y CO_2 , usando al agua como donador de electrones, oxidándola a O_2 , otra de características de este micro organismo es que tiene un alto nivel de producción de lípidos y biomas por lo tanto son consideradas como una de las mejores fuentes productoras de aceite para la producción de biodiesel. Además estos microorganismos se cultivan en fotobiorreactores cerrados o abiertos, por esta razón no disputan uso del suelos con cultivos agrícolas (Fernandez, 2004).

Las microalgas pueden proveer diferentes tipos de combustibles energéticos renovables; entre estos se incluyen metano producto de la digestión anaeróbica de la biomasa del alga, biohidrógeno producido fotobiológicamente y biodiesel a partir del aceite de las microalgas (Olmedo, 2009)

Los biocombustible también son conocido como biocarburante, es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa (es decir, obtenido a partir de las plantas y sus derivados) también se definen como insumos producidos especialmente para sustituir y/o mezclar total o parcialmente en gasolina o ACPM, producidos a partir de plantaciones industriales con predominancia del monocultivo (Di Donato, 2008).

No hay un consenso acerca de cómo clasificar a los biocombustibles. En algunos casos se habla de primera, segunda y tercera generación (hasta cuarta) dependiendo de la madurez tecnológica, la reducción de emisiones de Gases Efecto Invernadero –GEI- y la materia prima que se utiliza, se emplean, también los términos "convencional" y "avanzado" para la clasificación (Salinas, 2009).

El biodiesel es un biocombustible sintético líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, nuevos o usados, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenidos del petróleo. El biodiesel puede mezclarse con gasóleo procedente del crudo del petróleo en diferentes cantidades. Se utilizan notaciones abreviadas según el porcentaje por volumen de biodiesel en la mezcla: B100 en caso de utilizar sólo biodiesel, u otras notaciones como B5, B15, B30 o B50, donde la numeración indica el porcentaje por volumen de biodiesel en la mezcla (“Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible,” 2011).

Para la producción de estos biocombustibles, es necesario diferentes tipos de materia prima, entre las cuales estas se encuentra la biomasa, que es aquella materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente. (Herrera, 2009).

La Biomasa se clasifica en:

- Biomasa natural: se produce en ecosistemas naturales.
- Biomasa residual: son los residuos forestales y agrícolas, los residuos sólidos urbanos y los residuos biodegradables.
- Cultivos energéticos: se realizan con el único objetivo de aprovechar la energía que contienen, ya que producen grandes cantidades de materia viva por unidad de tiempo.
- Excedentes agrícolas: están constituidos por los productos agrícolas que no emplea el hombre

Entre las ventajas de las micro-algas se encuentra que pueden crecer fotosintéticamente, convirtiéndose además en grandes sumideros de CO₂(Tupiñon,2016).

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, además son hidrofóbicas (insolubles en agua) pero solubles en solventes orgánicos como el benceno y el cloroformo, por otra parte no todos los lípidos son grasas, las grasas son sólo un tipo de lípidos procedentes de animales (Salinas, 2009).

Para la producción de un biocombustible es necesario un espacio con las condiciones climáticas, ambientales y estructurales adecuadas, para esto es necesario el uso de un fotorreactor. Este es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz. Sin embargo, el término utilizado más comúnmente para definir un sistema cerrado, en contraposición a un tanque abierto o estanque. Los fotorreactores son utilizados para el cultivo de pequeños organismos fototróficos como las cianobacterias, algas o plantas de musgo. Estos organismos utilizan la luz a través de la fotosíntesis como fuente de energía y no requieren de azúcares o lípidos como fuente de energía (Lara, 2013).

2.4. Marco Legal

La normatividad ambiental nacional e internacional vigente aplicada al presente proyecto se basa en torno a un marco legal comprendido por resoluciones, decretos, acuerdos y leyes pertenecientes a biocombustibles.

El Gobierno Nacional ha promovido el desarrollo de los biocombustibles a través de diferentes medidas orientadas a fomentar su producción y uso.

En primer lugar, el Congreso de la República expidió la Ley 693 de 2001, de origen parlamentario y, posteriormente, el Gobierno Nacional tramitó ante el Congreso de la República la Ley 939 de 2004, las cuales definen el marco legal para el uso de biocombustibles. Estas leyes fueron reglamentadas por las siguientes resoluciones: 18 0687 de 2003, modificada por la Resolución 18 1069 de 2005; 1289 de 2005, modificada por las Resoluciones 18 0782 y 18 2087

de 2007; y 18 2142 de 2007, modificada por la Resolución 18 0243 de 2008; expedidas por el MME y el MAVDT, estableciendo la obligación de utilizar mezclas de combustibles fósiles y biocombustibles (Minambiente, 2008) (Tabla 2).

En segundo lugar, las Leyes 788 de 2002 y 939 de 2004 establecen exenciones tributarias con el propósito de fomentar la producción y el consumo de biocombustibles. Adicionalmente, el Decreto 383 de 2007, modificado parcialmente por el Decreto 4051 de 2007, establece estímulos para la implementación de zonas francas para proyectos agroindustriales en materia de biocombustibles. Como complemento de lo anterior, la Ley 1111 de 2006 establece una deducción del impuesto de renta del 40% de las inversiones en activos fijos reales productivos en proyectos agroindustriales, incluyendo leasing financiero (Minambiente, 2008) (Tabla 2).

Según la constitución de Colombia en el artículo 80. El cual dice “que el estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados” (Colombia, 1991).

Otro de los apoyos legales que fundamentan este trabajo de investigación son las normas americanas como las ASTM D6751-08, las cuales especifican que, para la existencia de mezclas de combustible Biodiesel para combustibles de destilación intermedia, al igual que las normas europeas EN 14214, rigen los criterios para la producción del biodiesel y cuanto contenido de ácido graso debe contener las algas para la instauración de aceite para la elaboración de biocombustible (Sanabria, 2014).

Tabla 2.
Normatividad Colombiana para Biodiesel

Normatividad biodiesel en Colombia				
Tipo de norma	Entidad	Número	Fecha	Tema
Decreto	MME	4892	Diciembre 23 de 2011	Por el cual se dictan disposiciones del uso de alcoholes carburantes y biocombustibles para vehículos automotores.
Decreto	MME	1881556	Agosto 31 de 2010	Por la cual se modifica la resolución 8 2439 de 23 de diciembre de 1998 y se establecen disposiciones relacionadas con la estructura de precios del ACPM y de su mezcla con el biocombustible en motores diésel.
Conpes	MME	3510	Marzo 31 de 2008	Lineamiento de política para promover la producción sostenible de biocombustibles para Colombia.
Resolución	MME	180134	Enero 29 de 2009	Por la cual se modifica el artículo 2° de la Resolución 18 1780 del 29 de diciembre de 2005, en relación con el ingreso al productor del biocombustible para uso en motores diésel.

Tabla 2. Continuación.

Resolución	MME	181109	Julio 25 de 2007	Por la cual se adiciona el artículo 3 de la Resolución 181780 de 2005, en el sentido de fijar algunas tarifas de transporte del biocombustible para uso en motores diésel. TRANSPORTE (BIODIESEL).
Decreto	MME	2629	Julio 10 de 2007	Por medio del cual se dictan disposiciones para promover el uso de biocombustibles en el país, así como medidas aplicables a los vehículos y demás artefactos a motor que utilicen combustibles para su funcionamiento. (CARBURANTE Y BIODIESEL).

Nota: Se describe la norma técnica colombiana de Biodiesel. por (Herrera, 2009).

3. Capítulo III

3.1. Metodología

En este proyecto investigativo de carácter experimental, con enfoque cualitativo y cuantitativo se llevó a cabo una medición y registro de la variación del recuento celular, producción de lípidos y cantidad de biomasa de las microalgas *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus sp* (nativa) a partir de la modificación de la fuente de nitrógeno y de condiciones lumínicas (luz natural, luz artificial).

3.1.1. Diseño Metodológico

• Fase I. Obtención de la cepa.

La microalga *Scenedesmus acutus*, se adquirió del banco de cepas del laboratorio de algas del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de los Llanos.

Las muestras fueron concentradas mediante sedimentación y por transferencias cuantitativas; así mismo se empleó la clave taxonómica para la identificación de la cepa de estudio. A partir de esto, los cultivos de *Scenedesmus acutus* certificados fueron distribuidos en matraces de 500 mL con un volumen de medio de 150 ml de caldo Alga (Sharlau®), el inóculo, se realizó con 20 ml de microalgas (extraídas durante la fase estacionaria), logrando así una densidad inicial promedio de $2,6 \times 10^6$ cél·mL⁻¹, obtenido a partir de recuento en Cámara de Neubauer.

Para la microalga endémica se realizó la búsqueda mediante muestreos en dos sectores durante los meses de estudio a partir de una muestra (1 Litro) de agua del Caño Aguas Claras ubicado en el campus Aguas Claras de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio, empleando la metodología propuesta en el Standart Methodos (10200B) para fitoplancton.



Figura 1. Localización de la toma de muestreos adaptado de “Google earth, 2018”. Por autores

Identificación de algas presentes en la muestra de agua del Caño Aguas Claras

Se realizó la identificación de las algas presentes en la muestra de 1 litro de agua proveniente del Caño Aguas Claras, ubicado en el campus Aguas Claras de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio, durante los meses de estudio, para la identificación de la cepa, la muestra fue concentrada mediante sedimentación, transferencia cuantitativa y analizada a través de la clave taxonómica con la asesoría del Biólogo Julián Barreto de la Universidad de los Llanos (DBBE, 2018).

Composición del caldo de alga – formula típica en g/l

El caldo de alga está conformado por 1,000 g/l de Nitrato de sodio, 0,250 g/l de Fosfato de potasio, 0,513 g/l de Sulfato de magnesio, 0,050 g/l de Cloruro de amonio, 0,058 g/l de Cloruro de calcio y 0,003 g/l de Cloruro de hierro.

• **Fase II. Diseño Experimental.**

Se desarrollaron cuatro medios de cultivo por duplicados en reactores de 500 ml, tanto para exponerlos a luz artificial (bombillas fluorescentes de 5000 a 5500 lux) (30w) como a luz natural, durante periodos de 12 horas, así, uno con caldo alga, y los tres otros con base caldo de alga y adicionando diferentes fuentes de nitrógeno: Gallinaza, Harina de pescado, Harina de soja (Tabla 3), los cuales fueron adicionados después de haber sido tinalizados, cada uno se expuso durante tres días consecutivos en ciclos de 100°C durante 20 minutos, los reactores fueron sometidos a agitación manual para la resuspensión de las células tres veces al día.

Tipo 1. Caldo alga con la micro alga

Tipo 2. Caldo con gallinaza como fuente de nitrógeno igual concentración que el caldo alga.

Tipo 3. Caldo con harina de pescado como fuente de nitrógeno.

Tipo 4. Caldo con harina de soja como fuente de nitrógeno.

Tabla 3.
Diseño Experimental

Condiciones lumínicas	Cepas <i>Scenedesmus</i> sp	Fuentes de nitrógeno	Cantidad a usada g/l (16%)
Luz natura y luz artificial (60w)	CC*	Gallinaza	4
	CN**	Gallinaza	4
	CC	Harina de pescado	3,2
	CN	Harina de pescado	3,2
	CC	Harina de Soja	2,2
	CN	Harina de Soja	2,2
	CC	NaNO ₃	1
	CN	NaNO ₃	1

Nota: se describe los procedimientos del diseño experimentales a realizar en el proyecto de investigación. Por autores, 2018

*CC: Cepa certificada

**CN: Cepa nativa



Figura 2. Medio de cultivo en fotobiorreactores. Por, autores 2018

Tiempos de Ensayo

El tiempo de ensayo de los cultivos, fue determinado a partir del lapso de tiempo que tardaron las microalgas en terminar la fase estacionaria en su curva de crecimiento (Figura 3).

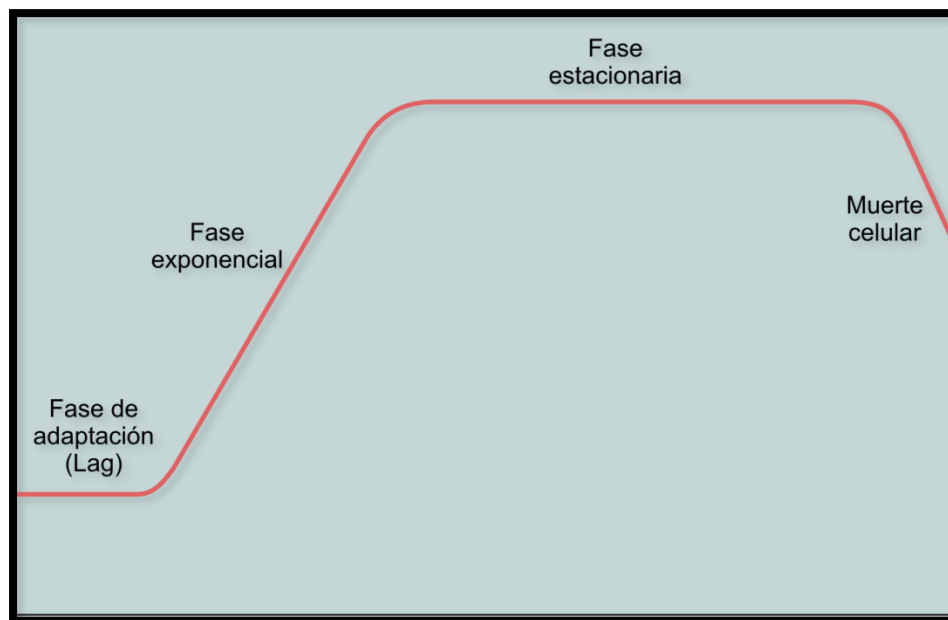


Figura 3. Curva de Crecimiento. Por autores, 2018

Muestreos

Se tomaron alícuotas de 5 ml en cada medio de cultivo, para realizar el recuento de células viables mediante Cámara de Neubauer; adicionalmente se tomó otra alícuota de 5 ml para la medición de la densidad óptica mediante espectrofotometría realizando así, la curva de crecimiento.

Al alcanzar la fase de crecimiento o exponencial, se realizó el muestreo para la extracción de grasas mediante el método SM-5520D, durante los 4 meses de estudio.

- **Fase III. Obtención de Datos cuantitativos.**

Recuento Celular

La metodología, empleada para el recuento celular, esta descrita en el artículo “Concentración recuento celular y tasa de crecimiento”, realizado por “B.O Arredondo Vega” publicado en la revista del Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, empleando una Cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad con reglilla de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm²), correspondiente a un volumen de 0.1 µL. Posee los cuatro extremos subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm² (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Arredondo & Voltolina, 2014)

El recuento se realizó en los cuadros A, B, C, D, ver Figura 4, debido a que el tamaño de las células es mayor a 6 mm, luego se reemplazó en la ecuación para obtener el número de células por mililitro.

Ecuación 1. Fórmula SM10200F para el recuento celular

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

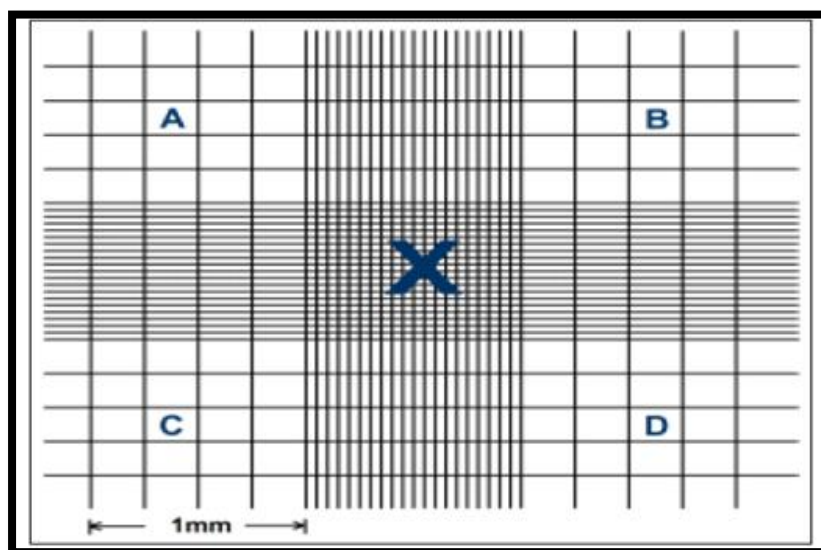


Figura 4. Reglilla de Neubauer de 9 mm². Por (Arredondo & Voltolina, 2014)

Densidad Óptica

Se halló la densidad por medio de la metodología descrita en el artículo “Concentración recuento celular y tasa de crecimiento”, realizado por “B.O Arredondo Vega” publicado en la revista del Centro de investigaciones biológicas a partir de alícuotas de 5 ml de cada medio de cultivo con los diferentes tratamientos; posteriormente fueron llevadas a un espectrofotómetro a 550 nm de longitud de onda recomendada para organismos fotosintéticos, buscando informar la curva de crecimiento y determinar con precisión la fase exponencial, durante la cual el alga aumenta la producción de grasas intracelulares.

Concentración de la Biomasa

Se empleó la técnica de secado por aspersión para obtención de la biomasa descrita por” A.P Martínez en el proyecto de extracción de aceite de microalgas”, se tomó un litro de muestra para cada uno de los cultivos con sus respectivas fuentes de nitrógeno y posteriormente se llevaron al horno Thermo Scientific® (Heratherm) a una temperatura de 60°C durante 24 horas.

Método de Extracción de aceite.

Extracción de grasas mediante Soxhlet

Se utilizó el método de extracción de grasas Soxhlet, aplicando el SM5520D, empleando como solvente orgánico, hexano, el cual permite una mayor adsorción de ácidos grasos saturados.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó por el método de correlación de Pearson, técnica que permite detectar la existencia o inexistencia de diferencias significativas entre muestras diferentes, demostrando la relación entre las variables (luz, concentración celular, biomasa, alimento), determinadas para evaluar el comportamiento de la microalga *Scenedesmus acutus*.

Conservación del cultivo por transferencia periódica

Se realizó el método de conservación por transferencia periódica descrito en el documento “Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira”. para conservar el cultivo de la microalga *scenedesmus acutus* en óptimas condiciones para futuras investigaciones. Este paso metodológico consiste en la transferencia de células a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo, la cual se realizó cada vez que el cultivo entraba a fase estacionaria.

4. Capítulo IV

4.1. Resultados y Análisis de Resultados

Atendiendo al objetivo general de esta investigación, así como considerando los objetivos específicos, en este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de la segunda y tercera fase metodológica.

A continuación, los resultados obtenidos en el montaje y seguimiento del diseño experimental, seguido de los resultados de crecimiento celular y análisis estadístico de correlación para la microalga *Scenedesmus acutus*, sin poder realizar esta evaluación para la micro-alga *Scenedesmus* sp nativa debido que no se aisló de las muestras del Caño Aguas Claras a su paso por el campus Aguas Claras de la Universidad Santo Tomás.

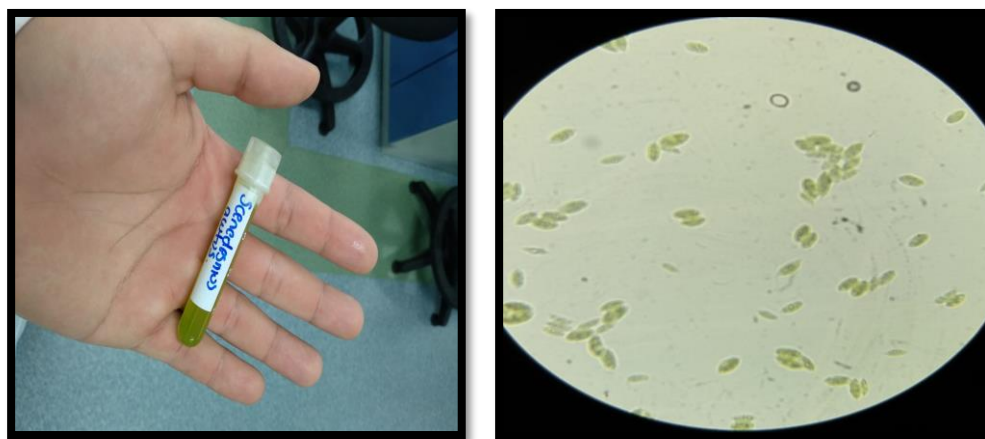


Figura 5. Obtención e inoculación de la cepa certificada y nativa de la microalga *Scenedesmus acutus*. Por Autores, 2018.

4.1.1. Identificación de algas presentes en la muestra de agua del Caño Aguas Claras

Se realizó una identificación de las algas presentes en la muestra de 1 litro de agua proveniente del Caño Aguas Claras, ubicado en el campus Aguas Claras de la Universidad Santo Tomás sede

Villavicencio, se concentró mediante sedimentación y transferencia cuantitativa, a continuación bajo la asesoría del biólogo Julián Barreto, mediante uso de clave taxonómica se identificó la presencia de la microalga *Chlorella* sp, y no se reportó crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp, durante los meses de estudio.

4.1.2. Análisis del crecimiento de *Chlorella* sp y de la ausencia de *Scenedesmus* sp Caño Aguas Claras

Tabla 4.
Muestreos en el humedal Aguas Claras

Muestreos en el Caño Aguas Claras (sector 1)			
Fechas de muestreo	Lugar de muestreo	Presencia o ausencia de alguna especie de microalga	Número y tamaño de las muestras
11/09/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa roscas de 1L
26/09/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa rosca de 1L
10/10/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa rosca de 1L
25/10/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa rosca de 1L
8/11/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa rosca de 1L
29/11/2018	Sector 1	Ausencia	4 vasos tapa rosca de 1L

Nota: Descripción de la toma de muestras en diferentes tiempos con sus respectivos resultados. Por autores 2019.

Teniendo en cuenta la metodología del Standart Methodos (10200B) para fitoplancton se realizaron 6 muestreos en el Caño aguas claras durante las fechas descritas en la tabla 4, donde se tomaron de a 4 muestras por muestreo. Se tomó de a 1L de agua en cada una de las orillas con profundidades de 0,5cm, igualmente se tomó de a 1L de agua en el centro con profundidades 1cm y 1,5cm, conviene subrayar que en ninguno de estos muestreos se identificó crecimiento de alguna especie de microalga.

Tabla 5.*Muestreos en el humedal Aguas Claras*

Muestreos en el Caño Aguas Claras (Sector 2)				
Fechas de muestreo	Lugar de muestreo	Presencia o ausencia de alguna especie de microalga	Número y tamaño de las muestras	
6/02/2019	Brazo hídrico del Caño Aguas claras	Presencia	4 vasos tapa roscas de 1L	
27/09/2019	Brazo hídrico del Caño Aguas claras	Presencia	4 vasos tapa rosca de 1L	

Nota: Descripción de la toma de muestras en diferentes tiempos con sus respectivos resultados. Por autores 2019.

Teniendo en cuenta la metodología del Standart Methodos (10200B) para fitoplancton se realizaron 2 muestreos en un brazo hídrico del Caño Aguas claras durante las fechas descritas en la tabla 5, de igual modo se realizó el mismo procedimiento descrito para la toma de muestras en el humedal aguas claras, puesto que en estos muestreos si se reportó crecimiento de una micro alga de especie *chlorella* sp.

El Caño Aguas Claras, dada su localización estratégica en el corredor urbano industrial vía a Puerto López, ha sido muy afectado por el crecimiento no planeado de la ciudad, de acuerdo con el estudio de la “Evaluación ecológica y ambiental del humedal aguas claras, barrio la alborada, Villavicencio meta” de “la Universidad Nacional”, se infiere que el humedal en los últimos 5 años ha disminuido su tamaño y oferta ambiental, debido a la afectación en su área de influencia de asaderos, universidades, casas, canchas deportivas, parqueaderos, entre otros, causando cambios que afectan negativamente, tales como: deforestación acelerada, contaminación por residuos sólidos, pérdida de especies de flora y fauna, disminución de la zonas de amortiguación, cambios en la calidad y cantidad del agua, inseguridad, pérdida del paisajismo, cambio en el uso del suelo, invasión de ronda hídrica y zona de protección por construcciones dentro del humedal.

Tabla 6.
Caracterización del Caño Aguas Claras

Análisis fisicoquímico			
Parámetro	Unidad	Metodo	Resultado
DBO ₋₅	mg O ₂ /L	SM 5210 SM 4500 O G	< 5
pH	UN	SM 4500 H B	6.27
Sólidos totales	Mg/L	SM 2540	352
Análisis microbiológico			
Coliformes totales	NMP/100ml	SM 9223 B	24196
	NMP/100ml	SM 9223 B	165

Nota: se presenta en detalle los análisis fisicoquímicos y microbiológicos del Caño Aguas Claras. Por (Hurtado, 2013)

Tabla 7.
Caracterización de nitratos

Caracterización de nitratos en el Caño Aguas claras (Sector dos)	
Nitratos	1 mg/l

Nota: se muestra en detalle los resultados obtenidos en la caracterización de nitratos en el Caño Aguas Claras. Por autores, 2019

Las micro algas del género *Scenedesmus* constituyen la micro biota de una gran variedad de ambientes de agua dulce, en especial, cuando estas presentan altas concentraciones de nutrientes. Son organismos que rara vez se presentan como dominantes en ambientes oligotróficos; sin embargo, en cuerpos acuáticos en proceso de eutrofización o altamente eutrofizados (Zaragoza, Boada, Barrera, & McCall, 2009), *Scenedesmus* constituye el género dominante, exhibiendo una gran plasticidad fenotípica conforme el organismo se adapta a las condiciones ambientales. Esta condición evidencia la capacidad cosmopolita de la microalga, siendo descritas 100 especies y variedades, muchos de los cuales crecen fácilmente en condiciones de cultivo. Aunque el género *Scenedesmus*, está compuesto de algas coloniales de amplia distribución, encontrada en ambientes naturales como en artificiales. Durante los meses de estudio y muestreo no se logró el aislamiento de la microalga, a causa de que no se identificó la presencia de esta en los muestreos

que se realizaron en el Caño aguas claras, en donde si hubo presencia de la microalga *Chlorella* sp, esto sucede debido a que se identifica que el agua del Caño aguas claras del “sector dos” donde se determinó el crecimiento de la microalga *Chlorella* sp, es una fuente con bajas concentraciones de nitratos, lo cual no es una condición favorable para el crecimiento de la microalga *scenedesmus* sp debido a que crece y es dominante en aguas eutrofizadas como se mencionó anteriormente.

La micro alga identificada a partir de las muestras de agua del caño Aguas Claras, y que resultaron ser apropiadas para su crecimiento fue *Chlorella* sp, es un género de alga verde unicelular, perteneciente al reino protista, que es aquel en el cuál se agrupan todos aquellos organismos, que no pueden categorizarse dentro de los animales plantas u hongos. Por medio de la fotólisis del agua (fotosíntesis) generan oxígeno; proceso que llevan a cabo gracias a los cloroplastos; reportada en diversos cuerpos de agua dulce y diferentes condiciones de aguas con altos contenidos de nitratos, fosfatos, pequeñas cantidades de minerales y una alta incidencia de luz solar directa; se reproduce de forma acelerada y de forma asexual. Para eso es necesario el carbono que obtiene de la fotosíntesis, contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitaminas B (B1, B2, B6 y B12); además de ser un microorganismo resistente a múltiples cambios de temperatura, llegando a resistir hasta 36°C . (Malo, Cartagena, & Sandoval, 2018) Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cuál su crecimiento es óptimo. *Chlorella* sp fue empleada en diversos estudios realizados para realizar procesos de biorremediación de aguas con presencia de metales pesados y alta cantidad de materia orgánica, como se puede evidenciar en los siguientes documentos según los diferentes autores ;Julián Camilo Cartagena en el estudio “evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR el salitre a nivel laboratorio” haciendo énfasis en la remoción por la demanda química de oxígeno (DQO) y por los sólidos suspendidos totales (SST), los cuales son los parámetros en los que se basa la PTAR El Salitre para evaluar la remoción de materia orgánica en su proceso, con el fin de poder comparar los resultados del tratamiento químico realizado por la PTAR El Salitre donde se obtuvo una remoción por DQO de 35,30% y 57,51% por SST y el biotratamiento realizado por la microalga *Chlorella vulgaris* siendo el cultivo realizado con microalga la que mejores resultados reportó (81,80% por DQO y 89,91% por SST). Sirviendo como tratamiento complementario. (Malo,

Cartagena, & Sandoval, 2018). Otro estudio fue el realizado por Edward Andrés Olarte Gómez en el estudio “evaluación del uso del microalga *Chlorella vulgaris* en el tratamiento de aguas residuales industriales vinazas” que tuvo como finalidad valorar la posibilidad del empleo de la microalga *Chlorella vulgaris*, en el tratamiento de las vinazas y la suficiencia en la remoción de nutrientes como el nitrógeno, fósforo, así como de la carga orgánica presente en este tipo de residuos líquidos. Este estudio demostró la obtención de porcentajes de remoción de Fósforo, Nitrógeno, DQO y DBO5 de 75,7%, 84,93%, y 30,92%, respectivamente, lo que argumenta la viabilidad de emplear la microalga *Chlorella vulgaris* en la realización de procesos de biorremediación. (Olarte Gómez, Valencia Giraldo). También en el estudio realizado por Víctor A. Vacca-Jimeno en el estudio “Uso de la microalga *Chlorella* sp. Viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil” investigación que evaluó la capacidad de la microalga *Chlorella* sp viva en suspensión para remover el color del efluente de una empresa textil en el departamento del Atlántico (Colombia) y que como resultado mostro que el bioensayo en absorbancia removió el 97,2% del colorante presente y disminuyó en un 94,6% la DQO y 95,4% la DBO5 , entre otros parámetros de caracterización antes y después del tratamiento, mostrando la mejor bioremoción en este estudio. Estos resultados permiten sugerir que el tratamiento biológico con la microalga *Chlorella* sp del agua residual es un método eficiente. (Vacca Jimeno et al., 2017). Todo esto confirma que la micro alga *Chlorella* sp. es una especie que crece y se adapta en condiciones ambiental con altos niveles de contaminación.

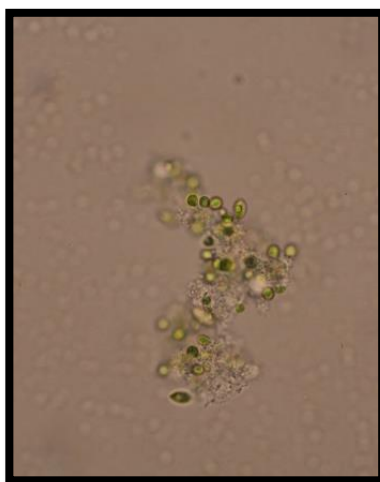


Figura 6. Muestra de la microalga *Chlorella* sp. Por Autores, 2018

Tabla 8.*Características de la microalga Chlorella sp*

Nombre científico	<i>Chlorella</i>
Reino:	Bacteria
Filo:	Chlorophyta
Clase:	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden:	Chlorellales
Familia:	<i>Chlorellaceae</i>
Género:	<i>Chlorella</i>

Nota: Descripción de las características de la microalga *Chlorella* sp. Por (EcuRed.cu., 2018)

4.1.3. Diseño Experimental

4.1.3.1. Montaje de los medios de cultivo

A continuación, se presenta las concentraciones de nitrógeno en las diferentes fuentes de cultivo administradas a la microalga (Tabla 5).

Tabla 9.*Porcentajes de nitrógeno*

Tipo de Fuente	N(% ad p/p)
Caldo alga	16
Gallinaza	3,8
Harina de pescado	5
Harina de Soja	6,5

Nota: presentación de los porcentajes de nitrógeno en diferentes fuentes. Autores, 2018



Figura 7. Medios de Cultivo en luz natural y en luz artificial. Por Autores, 2018

4.1.4. Recuento celular

4.1.4.1. Recuento del Crecimiento celular a Luz Natural

Tabla 10.

*Recuento de crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus acutus* expuesta a luz natural*

Recuento celular (células/ml) - Luz Natural				
Fecha	Caldo	Gallinaza	Soja	Pescado
24/10/2018	2.64×10^5	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$
26/10/2018	$2,8 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$
30/10/2018	$9,6 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$1,14 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
6/11/2018	$1,2 \times 10^6$	$7,85 \times 10^5$	$2,77 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
8/11/2018	$1,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
13/11/2018	$1,76 \times 10^6$	4×10^5	$3,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
16/11/2018	$1,49 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	2×10^6
20/11/2018	$1,2 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$2,34 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
23/11/2018	$9,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	1×10^6
26/11/2018	$8,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,27 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$
28/11/2018	9×10^5	$10,5 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	5×10^5

Nota: Se muestran las diferentes concentraciones de células obtenidas por la cámara de Neubauer en condiciones de luz natural. Por Autores, 2109

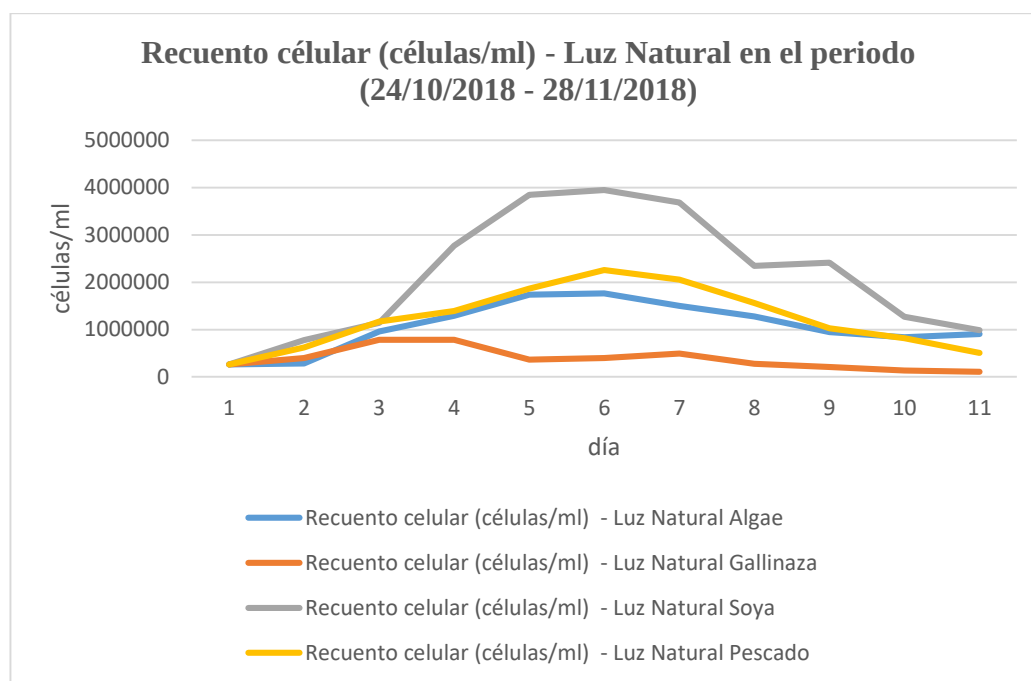


Figura 8. Recuento del crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus acutus* expuesta a luz natural. Por Autores, 2019

La Figura 8 muestra la curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus acutus* en luz natural y con las tres fuentes de nitrógeno (gallinaza, harina de soja, harina de pescado), y con el medio de cultivo caldo alga. Para lograr obtener esta curva de crecimiento se tomaron 11 muestras aproximadamente durante 2 meses, observando las fases de la curva de crecimiento (adaptación, crecimiento exponencial, estacionaria, y declive).

4.1.4.2. Recuento del Crecimiento celular a Luz Artificial

Tabla 11.

Recuento de crecimiento celular de la microalga Scenedesmus acutus expuesta a luz artificial

Recuento celular - Luz Artificial				
Fecha	Caldo	Gallinaza	Soja	Pescado
24/10/2018	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$
26/10/2018	$6,1 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$
30/10/2018	$1,1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	2×10^6

Tabla 11. Continuación

6/11/2018	$1,3 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
8/11/2018	$1,8 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
13/11/2018	$2,2 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$4,45 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
16/11/2018	2×10^6	$5,7 \times 10^5$	$4,64 \times 10^6$	3×10^6
20/11/2018	$1,5 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$2,89 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6$
23/11/2018	1×10^6	$2,5 \times 10^5$	$2,24 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$
26/11/2018	$8,2 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	$1,18 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$
28/11/2018	5×10^5	$9,5 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$

Nota: Se muestran las diferentes concentraciones de células obtenidas por la cámara de Neubauer en condiciones de luz artificial. Por Autores, 2109 Autores, 2019

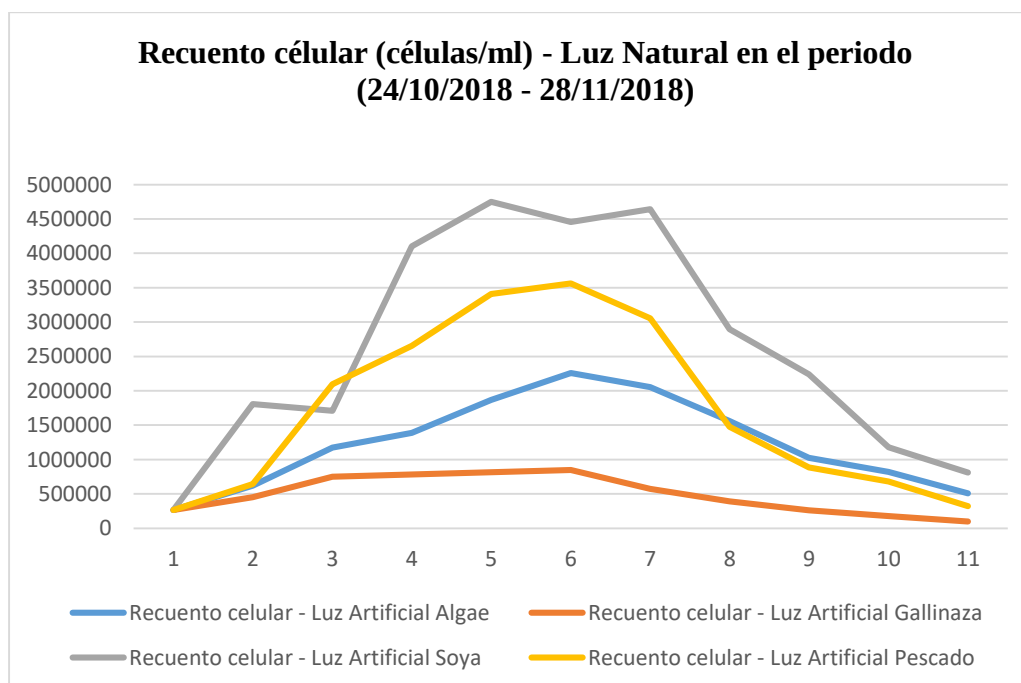


Figura 9. Recuento de crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus acutus* expuesta a luz artificial. Por Autores, 2019

La Figura 9 muestra las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus acutus* en luz artificial y variando las fuentes de nitrógeno (gallinaza, harina de soja, harina de pescado), y con el medio de cultivo caldo alga.

La micro alga *Scenedemu acutus* presentó curvas de crecimiento similares en las diferentes condiciones lumínicas, aunque con una mayor concentración celular en los cultivos con presencia de luz artificial, esto se da debido a causa de que estos cultivos tuvieron una intensidad lumínica de 5500 lux la cual es mayor a la intensidad lumínica en la que se expusieron los cultivos en luz natural con un promedio de 1200 lux a 1600 lux considerando las variaciones climáticas de la ciudad de Villavicencio. Al mismo tiempo se evidencio que el cultivo con presencia de la fuente de nitrógeno (harina de soja) fue el que alcanzo mayor concentración celular en ambas condiciones lumínicas, con concentraciones de $4,7 \times 10^6$ cel/ml para luz artificial y $3,9 \times 10^6$ cel/ml para luz natural. Así mismo se observó que el cultivo con presencia de la fuente de nitrógeno (gallinaza) mostro la menor concentración celular en ambas condiciones lumínicas, con $8,4 \times 10^5$ cel/ml para luz artificial y $7,85 \times 10^5$ cel/ml para luz natural.

4.1.5. Análisis con énfasis a las fases de la curva de crecimiento y fuentes nitrógeno

4.1.5.1. Adaptación o latencia

La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición (Arredondo & Voltolina, 2014)

Se puede observar en la Figura 8 que en las curvas de crecimiento se presentaron unos periodos de adaptación de 6 a 7 días para los cultivos con presencia de harina de soja, harina de pescado, y gallinaza, excepto para el cultivo con única presencia de caldo de alga el cual presenta periodo de adaptación de 2 días, teniendo en cuenta que la concentración inicial fue de $2,64 \times 10^5$ cel/ml para cada uno de los cultivos tanto en luz natural como en luz artificial. Esto sucede debido a que el inóculo de donde se tomó la muestra inicial proviene de un cultivo con única presencia de caldo de alga.

En la Figura 9 el comportamiento de la microalga *Scenedesmus acutus* en condiciones de luz artificial presentó una adaptación en un tiempo de 2 a 3 días para cada uno de los cultivos, el cual es menor al tiempo en el que se adaptaron en comparación con las condiciones de luz natural debido a que el tiempo en el que estuvieron expuestos los cultivos a la luz nunca fue interferido por cambios climatológicos como la nubosidad. En esta fase el crecimiento celular es mínimo, donde se producen las enzimas necesarias para que puedan crecer en un nuevo medio, donde hay gran actividad metabólica, aumentando en el tamaño y el peso seco de las células (MORALES V, 2008)

4.1.5.2. Crecimiento exponencial

Es el periodo de la curva de crecimiento en el cual sucede un incremento exponencial del número de células bajo las condiciones expuestas (MORALES V, 2008)

La Figura 8 en condiciones con luz natural, muestra la variedad de comportamientos que presentó la microalga *Scenedesmus acutus* en la fase exponencial con una máxima concentración de $3,9 \times 10^6$ cel/ml en el cultivo con harina de soja y con un mínimo de concentración de aproximadamente de $7,8 \times 10^5$ cel/ml en el cultivo con gallinaza. Algo semejante ocurre en condiciones de luz artificial como se logra observar en la Figura 9, sin embargo, reporta concentraciones diferentes con $4,9 \times 10^6$ cel/ml para el cultivo con presencia de harina de soja y $8,5 \times 10^6$ cel/ml en el cultivo con presencal de gallinaza.

Con respecto a lo anterior esto sucede debido a que la harina de soja tiene una composición que presenta mayor compatibilidad con la microalga *Scenedesmus acutus*. La harina de soja contiene lisina, además cantidades importantes de otros nutrientes esenciales, tales como ácido linoleico y colina, cuya disponibilidad es alta, con un porcentaje alto de proteína (47-48% PB) se obtiene tras un proceso de extracción de la grasa del haba con disolvente. (FEDNA - Fundación Española para el desarrollo de la nutrición animal, 2015)

Tabla 12.*Composición de la gallinaza por “BIORGANICOS E.U”.*

Composición de la gallinaza		
Nitrógeno total (N)	39.10	g/l
Calcio soluble en el agua (CaO)	2.0	g/l
Magnesio soluble en el agua (MgO)	1.8	g/l
Azufre soluble en agua (S)	2.7	g/l
Boro soluble en agua (B)	0.30	g/l
Cobre soluble en agua (Cu)	0.31	g/l
Hierro soluble en agua (Fe)	0.22	g/l
Manganeso soluble en agua (Mn)	0.33	g/l
Zinc soluble en agua (Zn)	0.18	g/l
Sodio soluble en agua (Na)	1.40	g/l
Carbono orgánico oxidable total	14.0	g/l
pH en solución al 10%	7.68	
Densidad a 20°C	1.04	g/ml

Nota: Se muestra la composición de la gallinaza. Por “BIORGANICOS E.U”.

En relación con la tabla 12, cabe resaltar que la microalga *Scenedesmus acutus* no presento compatibilidad con la gallinaza, como se logra ver en las curvas de crecimiento expuestas anteriormente tanto en condiciones de luz natural y artificial.

Todas estas observaciones se relacionan también con lo dicho en la tesis “**Cultivo de la microalga *Scenedesmus oliquus* var. *dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos**” realizada por “Mercado Tupiñon Stefania” en la universidad “Ricardo de Palma”. Los nutrientes proporcionan los materiales necesarios para el crecimiento de las algas. El nitrógeno y fósforo, especialmente el nitrógeno, es el factor más importante que regula su crecimiento y esto influye en gran medida en el rendimiento de lípidos. En situaciones limitadas de nitrógeno, el

contenido de lípidos de las algas generalmente aumenta como mecanismo de supervivencia, inhibiendo la formación de biomasa y almacenando energía intracelularmente en forma de lípidos. y empiezan a almacenar energía en forma de lípidos. En el presente estudio, *Scenedesmus acutus*, se demostró con datos experimentales que es pertinente el empleo de harina de soja, como fuente de nitrógeno para el crecimiento en condiciones de luz natural y artificial (Tupiñon, 2016).

En este trabajo de investigación no se logró comprobar lo dicho por Estefanía Tupiñon sobre la relación de nitrógeno - lípidos debido a que se trabajó con diferentes fuentes de nitrógeno pero con el mismo porcentaje de este nutriente como se especifica en la metodología “fase 2” diseño experimental (Tupiñon, 2016)

4.1.5.3. Estacionaria

Durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes (MORALES V, 2008).

Para la fase estacionaria en el cultivo con presencia de harina de soja como se muestra en la figura 8, la cual empieza desde el 11/08/2018 hasta el 11/17/2018 finalizando con una concentración de $3,5 \times 10^6$ cel/ml, y en el siguiente muestreo se empieza a notar la fase de muerte o declive.

En la harina de pescado se logra ver una fase estacionaria más corta debido a que tuvo una fase exponencial de largo tiempo y entro rápidamente a una fase declive, la Figura 8 muestra una fase estacionaria de 3 días entre el 11/13/2018 al 11/16/2018 con una concentración entre $2,3 \times 10^6$ cel/ml a 2×10^6 cel/ml

La curva de crecimiento del cultivo con presencia de gallinaza muestra que es el primer cultivo en comenzar la fase estacionaria desde el 10/30/2018 hasta el 11/06/2018 mostrando las concentraciones más bajas entre los cultivos con concentraciones entre 5×10^5 cel/ml a 6×10^5 cel/ml

La fase estacionaria en el cultivo con única presencia del medio de cultivo caldo de alga para el Figura 8 finaliza su fase exponencial el día 11/08/2018 hasta el día 11/13/2018 con concentraciones de $1,8 \times 10^6$ cl/ml a $1,7 \times 10^6$ aproximadamente.

En condiciones de luz artificial la Figura 9 muestra que el cultivo con presencia de gallinaza fue el que presentó un mayor tiempo en fase estacionaria, la cual empezó desde el 10/30/2018 hasta el 11/13/2018 una fase estacionaria de 13 días con concentraciones de 7×10^5 cel/ml a 6×10^5 cel/ml.

El cultivo con única presencia de caldo alga en la Figura 9 se logra observar una fase estacionaria con un tiempo mínimo de 3 días la cual empezó desde el 11/13/2018 hasta el 11/16/2018 con concentraciones de $2,5 \times 10^6$ cel/ml a 2×10^6 cel/ml

La harina de pescado en la Figura 9 se observa una fase de estacionaria de aproximadamente de 8 días la cual empieza desde el 11/08/2018 hasta el 11/16/2018 con una concentración de $2,5 \times 10^6$ cel/ml a 2×10^6 cel/ml

La harina de soja en la Figura 9 muestra una fase estacionaria de 8 días desde el 11/08/2018 hasta el 11/16/2018 con una concentración de $4,7 \times 10^6$ cel/ml hasta $4,5 \times 10^6$ cel/ml.

La concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de auto sombreado). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo.

4.1.5.4. Declive o fase de muerte

Se puede observar en la Figura 8 y en la tabla 10 que ninguno de los cultivos en el tiempo de muestreo llegó a una concentración de 0 cel/ml, se observan los diferentes tiempos en los cuales comienzan su fase de declive, el cultivo con presencia de gallinaza fue el primero en entrar a la

fase de muerte luego de 12 días de empezar el cultivo finalizando con una concentración de $10500_{\text{cel/ml}}$. La harina de pescado fue la que presentó una menor concentración en la fase de declive con $5 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$, para el cultivo con única presencia de caldo alga, finalizó con una concentración de $9 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$ y por último la harina de soja muestra una concentración final de $9,8 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$.

En la Figura 9 el comportamiento en fase de declive o de muerte es muy similar al de la Figura 8, debido a que ningún cultivo llegó a una concentración de $0_{\text{cel/ml}}$, igualmente el primer cultivo que entro a la fase de declive fue el de gallinaza luego de 13 días de empezar el cultivo finalizando con una concentración de $9 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$, la harina de pescado fue el cultivo que mostró una menor concentración al finalizar las etapas de muestreo en la fase de muerte celular con $3,2 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$ es una concentración menor con respecto al comportamiento en luz natural, los demás cultivo finalizaron con las siguientes concentraciones, harina de soja con $8,1 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$ y Caldo de alga con $5 \times 10^5_{\text{cel/ml}}$.

En esta fase la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular (MORALES V, 2008).

4.1.6. Análisis con énfasis en intensidad lumínica y climatología

Tabla 13.

Tabla comparativa del medio de cultivo con presencia de Harina de Soja

	Luz natural	Luz artificial
Fecha	Soja	Soja
24/10/2018	$2,64 \times 10^5$	$2,64 \times 10^5$
26/10/2018	$7,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$
30/10/2018	$1,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
6/11/2018	$2,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$
8/11/2018	$3,8 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$

Tabla 14. Continuación

13/11/2018	$3,9 \times 10^6$	$4,45 \times 10^6$
16/11/2018	$3,6 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$
20/11/2018	$2,3 \times 10^6$	$2,89 \times 10^6$
23/11/2018	$2,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
26/11/2018	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
28/11/2018	$9,8 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$

Nota: Concentración celular de los cultivos con presencia de harina de soja en ambas condiciones. Por Autores, 2018

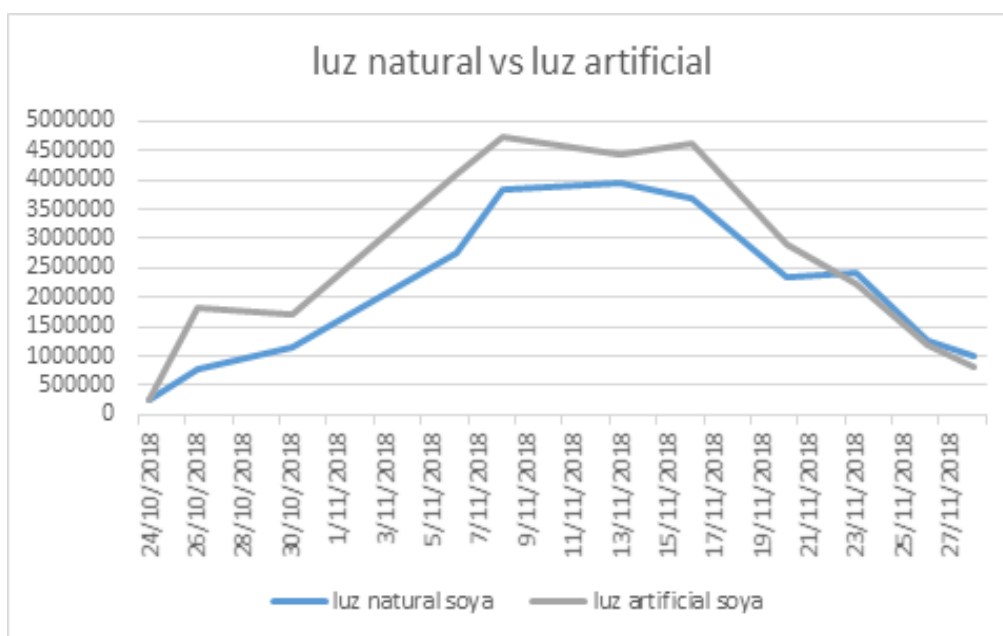


Figura 10. Comparación del crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus acutus* entre condiciones de luz natural y luz artificial en el cultivo con presencia de harina de soja. Por autores, 2018

Otra de las variables que se optó por medir fue la iluminancia. La iluminancia es un término que describe la medición de la cantidad de luz cayendo (iluminando) y expandiéndose en una superficie determinada la cual su unidad de medida son los lux.

Tabla 15.*Valores de intensidad lumínica en condiciones de luz natural y luz artificial*

Intensidad de iluminancia		
Fecha	Luz natural (lux)	Luz artificial (lux)
26/10/2018	1300	5500
30/10/2018	1200	5500
6/11/2018	1310	5500
11/11/2018	1270	5500
23/11/2018	1600	5500

Notas: Presentación de las diferentes intensidades lumínicas en ambos montajes. por Autores, 2018

El crecimiento celular fue mayor en el montaje de luz artificial con respecto al montaje de luz natural como se muestra en la Figura 10, esto sucede debido a que la intensidad lumínica es constante y con valores de 5500 lux en el montaje de luz artificial, en luz natural la intensidad lumínica es baja con un valor máximo de 1600 lux, debido a la presencia de nubosidad, y la lluvia, afectando en los rendimientos de producción de biomasa de la microalga.

4.1.7. Nubosidad en Villavicencio

En Villavicencio, el promedio del porcentaje del cielo cubierto con nubes varía considerablemente en el transcurso del año. Siendo la de menor presencia, aproximadamente desde el 1 de junio y culminando alrededor del 11 de octubre, es decir, mayormente despejado o parcialmente nublado el 38 % del tiempo y nublado o mayormente nublado el 62 % del tiempo (Weather Spark, n.d.)

Tabla 16.
*días de muestreados**Climatología de los*

Estación climatológica Vanguardia									
Día	T	TM	Tm	SLP	H	PP	VV	V	RA
24/10/2018	26	29	21	1009	80	2.03	9.7	7.4	°
26/10/2018	27	31	20	1007	70	0.51	10.6	6.3	°
30/10/2018	27	30	21	1009	66	3.05	10.5	6.9	°
6/11/2018	26	30	21	1008	73	17.02	10.1	7	°
8/11/2018	27	31	21	1008	60	13.97	10.6	7	
13/11/2018	28	32	21	1008	64	10.08	10.8	7	
16/11/2018	27	30	21	-	61	10.08	10.8	0	
20/11/2018	-								
23/11/2018	26	30	22	1009	87	8.89	9.8	7.2	°
26/11/2018	27	32	20	1008	63	0	10.6	8	

Notas: Descripción climatológica en los días de muestreo obtenido de la (Estación Meteorológica Vanguardia Villavicencio, 2018) Por autores 2018

T	Temperatura media (°C)
TM	Temperatura máxima (°C)
Tm	Temperatura mínima (°C)
SLP	Presión atmosférica a nivel del mar (hPa)
H	Humedad relativa media (%)
PP	Precipitación total de lluvia y/o nieve derretida (mm)
VV	Visibilidad media (Km)
V	Velocidad media del viento (Km/h)
VM	Velocidad máxima sostenida del viento (Km/h)
VG	Velocidad de ráfagas máximas de viento (Km/h)
RA	Indica si hubo lluvia o llovizna (En la media mensual, total días que llovió)
SN	Indicador de nieve (En la media mensual, total días que nevó)
TS	Indica si hubo tormenta (En la media mensual, total días con tormenta)
FG	Indica si hubo niebla (En la media mensual, total días con niebla)

Se obtuvieron los datos climatológicos en las fechas de muestreo, las cuales coincidían con la menor presencia de nubes teórica, sin embargo al realizar los conteos celulares y mediciones espectrofotométricas, se evidenció una merma, durante las etapas de muestreo, en la producción de biomasa en condiciones de luz natural, debido a la disminución de la intensidad lumínica como consecuencia a lloviznas y el aumento de nubosidad, en relación con esto conviene subrayar, que debido a la actividad fotosintética, la penetración de la luz, es vital en el suministro de la energía necesaria para la división y crecimiento celular (Mora, A. Ramos, K. Sanchez, A. & Camacho, 2015). Confirmando lo anteriormente expuesto en la Figura 10, donde el comportamiento de la microalga *Scenedesmus acutus* en luz artificial presente mayor crecimiento con respecto a los cultivos en condiciones de luz natural.

4.1.8. Recuento microbiano de densidad celular de la microalga *Scenedesmus acutus*.

*4.1.8.1. Densidad óptica de *Scenedesmus acutus* certificada por recuento celular en espectrofotómetro para Luz Natural.*

Tabla 17.
Densidad Óptica a luz natural

Densidad Óptica -Luz natural				
Fechas	H. Pescado	Gallinaza	H. Soja	Algae
24/10/2018	1,48	0,23	1,26	0,13
26/10/2018	1,74	0,40	1,64	0,37
30/10/2018	2,17	0,86	2,00	0,66
6/11/2018	2,57	0,58	2,39	0,98
8/11/2018	2,43	0,37	2,43	0,47
13/11/2018	2,62	0,87	2,58	1,22
16/11/2018	3,02	0,52	2,92	0,72
20/11/2018	2,32	0,52	1,76	0,52

Tablas 16. Continuación

23/11/2018	1,93	0,47	1,27	0,47
26/11/2018	1,70	0,37	1,70	0,37
28/11/2018	1,38	0,40	1,38	0,37

Notas: Descripción de los resultados obtenidos en el espectrofotómetro representados en densidad óptica. Por autores, 2018

Tabla 18.
Densidad Óptica a luz artificial

Densidad Óptica -Luz artificial				
Fechas	H. Pescado	Gallinaza	H. Soja	Algae
24/10/2018	1,89	1,10	1,88	0,66
26/10/2018	1,97	1,27	1,94	1,04
30/10/2018	2,35	1,53	2,34	1,30
6/11/2018	2,53	1,45	2,49	2,22
8/11/2018	2,64	1,23	2,55	2,00
13/11/2018	2,93	1,73	2,66	2,50
16/11/2018	3,52	1,39	2,86	2,16
20/11/2018	1,66	1,33	2,26	2,12
23/11/2018	1,40	1,29	1,93	2,10
26/11/2018	1,67	1,23	1,82	2,00
28/11/2018	1,45	1,26	1,37	1,73

Nota: Descripción de los resultados obtenidos en el espectrofotómetro representados en densidad óptica. Por autores, 2018

Las siguientes gráficas denominadas curvas de crecimiento fueron realizadas en base a las Tablas 9 y 10, en las cuales se presentan los valores obtenidos mediante el equipo de medición espectrofotómetro, para el índice de densidad óptica en las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas (gallinaza, harina de pescado, harina de soja y el medio de cultivo caldo de alga) y en

dos diferentes condiciones de iluminación (luz natural y luz artificial) durante el periodo de estudio, el cual se llevó a cabo a partir del día 24 de octubre del 2018 hasta el día 28 de noviembre del mismo año, en los cuales se realizaron diferentes mediciones. Los resultados representados se representaron gráficamente, siendo el eje vertical izquierdo los valores en porcentaje para índice de densidad óptica y en el eje horizontal se establecen las fechas.

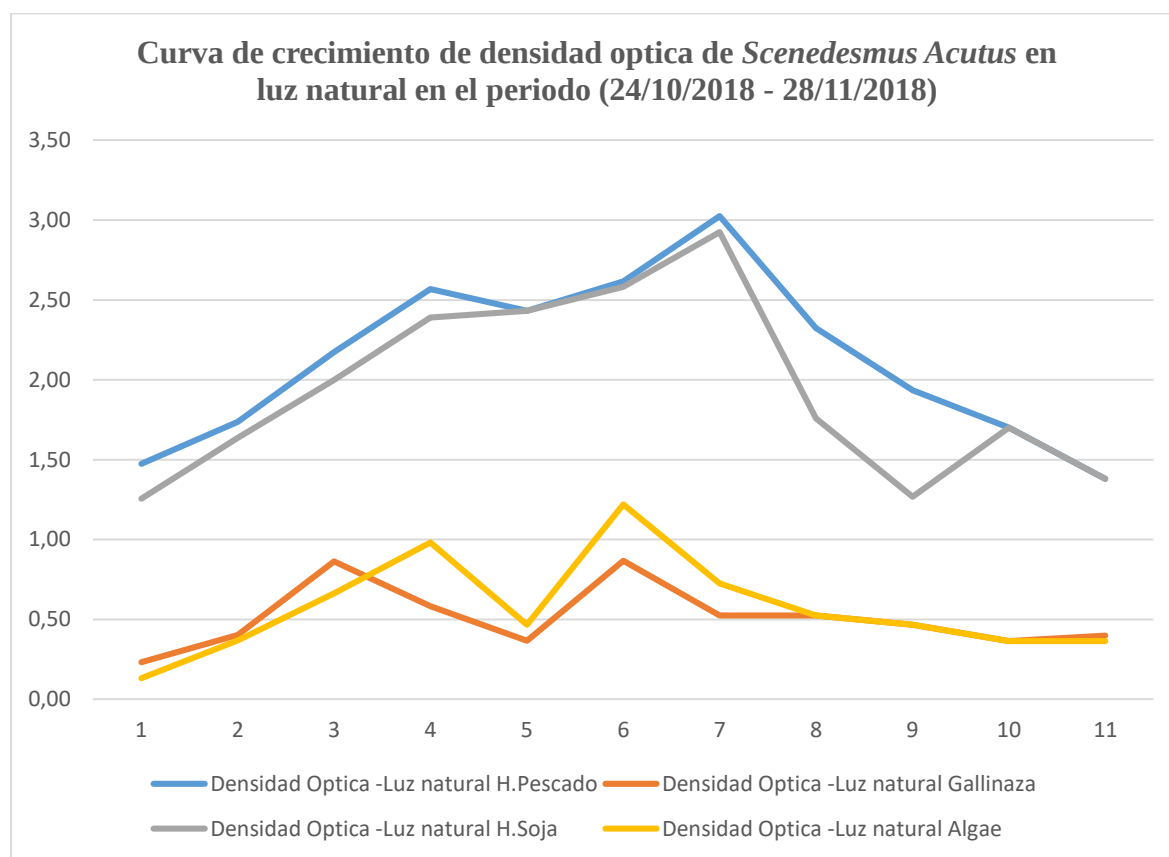


Figura 11. Curva de crecimiento de densidad óptica de *Scenedesmus acutus* en luz natural. Por Autores, 2018

En la figura 11 se muestra las curvas de crecimiento para densidad óptica en las diferentes fuentes de nitrógeno (gallinaza, harina de pescado, harina de soja, medio de cultivo caldo de alga) en presencia de luz natural.

Al comparar los diferentes crecimientos se observó que para el día 24 de octubre de 2018 se reportó que los valores para el índice de densidad óptica son bajos (harina de pescado 1,48 gallinaza 0,23 harina de soja 1,26, caldo de alga 0,13)comparado con los valores obtenidos en el

resto del estudio se identificó que para dicha fecha se presentó la menor concentración de algas en las fuentes de nitrógeno gallinaza, caldo de alga y harina de soja no obstante la harina de pescado reporta uno de sus menores valores en el estudio esto se debió a la poca densidad de algas presentes en los foto-birreactores que al ser sometidos al equipo espectrofotómetro permitieron que el haz de luz atravesara las muestras

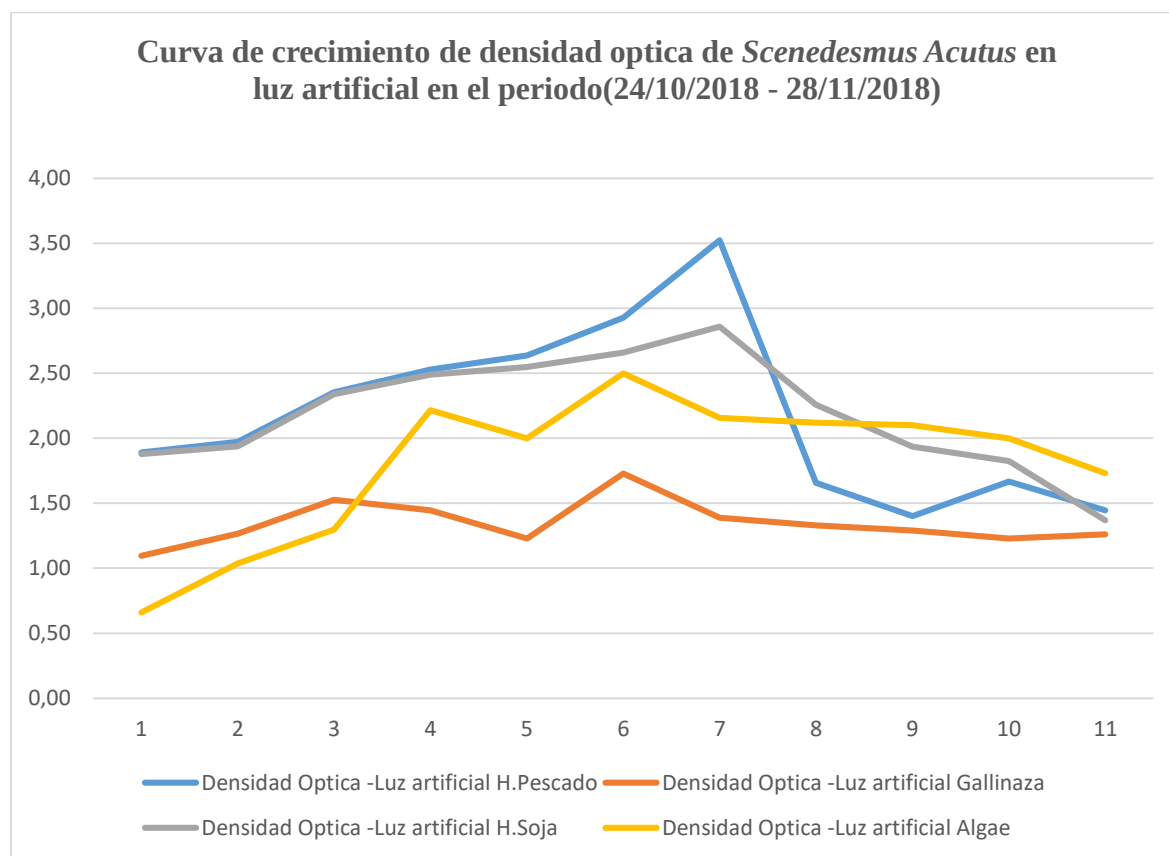


Figura 12. Curva de crecimiento de densidad óptica de *Scenedesmus Acutus* en luz artificial. Por Autores, 2018

En la figura 11 y 12 se muestra las curvas de crecimiento para densidad óptica en las diferentes fuentes de nitrógeno (gallinaza, harina de pescado, harina de soja, medio de cultivo caldo de alga) en presencia de luz natural y artificial.

Al comparar los diferentes crecimientos se observó que para el día 24 de octubre de 2018 se reportó que los valores para el índice de densidad óptica son bajos (harina de pescado 1,48 gallinaza 0,23 harina de soja 1,26, caldo de alga 0,13)para luz natural (harina de pescado 1,89

gallinaza 1,10 harina de soja 1,88, caldo de alga 0,66)para luz artificial y comparado con los valores obtenidos en el resto del estudio se identificó que para dicha fecha se presentó la menor concentración de algas en las fuentes de nitrógeno gallinaza , caldo de alga y harina de soja no obstante la harina de pescado reporta uno de sus menores valores en el estudio en la gráfica de luz natural igualmente ocurre en la gráfica correspondiente a luz artificial donde se muestran los valores más bajos para gallinaza y medio de cultivo caldo de alga, la harina de pescado y harina de soja esto se debió a la poca densidad de algas presentes en los fotobiorreactores, al ser sometidos al equipo espectrofotómetro permitieron que el haz de luz atravessara las muestras.

Se identificó, un periodo de adaptación no superior a 4 días, en los cuales el crecimiento de los fotobiorreactores fue paulatino, esto se puede denotar con la leve coloración verde que presentaron los diferentes fotobiorreactores con las diversas fuentes de nitrógeno, ya que la tonalidad de los fotobiorreactores tuvo una tendencia progresiva con el paso del tiempo.

También se evidencio que durante las curvas de crecimiento referentes a la fuente de nitrógeno gallinaza y al medio de cultivo caldo de alga, presentaron comportamientos muy irregulares respecto a densidad óptica, aunque semejantes con relación a la forma de las curvas, se pudo concluir que la gallinaza tuvo mayor concentración de células y además que fueron las que menor concentración de algas mostraron durante el periodo de estudio llegando a sus máximas valores (0,87 para gallinaza y 1,22 para el medio de cultivo caldo de alga) para luz natural en la fecha 13 de noviembre de 2018 y (1,73 para gallinaza y 1,50 para el medio de cultivo caldo de alga) para luz artificial en comparación entre las dos Figuras, reportando mejor crecimiento las curvas de luz artificial mostrando mayores valores de concentración de células.

A partir de la harina de pescado y la harina de soja, se reportan óptimos crecimientos, en cuanto a los índices de densidad óptica. Llegando a mostrar valores de(2,92 para harina de soja y 3,02 para la harina de pescado) para luz natural el día 16 de noviembre de 2018 y (2,86 para harina de soja y 3,52 para la harina de pescado), para luz artificial ,donde se pudo deducir que era el fin de la fase exponencial y el inicio de la fase de declive o muerte, ya que a partir de la fecha las curvas comenzaron a descender hasta tomar sus valores mínimos, a causa de esto se pudo concluir que el índice de densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de

células, es decir a mayor número de densidad óptica, mayor es la concentración de algas en la muestra (Bermeo, 2011)

Aunque la espectrofotometría es una técnica menos precisa que el recuento directo, permite una evaluación rápida de la concentración microalgal, en especial si se cuenta con una curva de calibración entre la concentración celular de una especie determinada, evaluada directamente, y las lecturas de densidad óptica de uno o más cultivos de esa especie. Uno de sus inconvenientes es que la contaminación bacteriana y/o de otro tipo (basura, residuos), dará lecturas erróneas, por lo que hay una tendencia a evitarla, razón por la cual se denota una leve variación en algunas de ellas esto es debido a que el equipo está haciendo una medición errada por lectura de concentración de materia, al encontrarse el alga en fase de declive.

Un claro ejemplo se da con la harina de soja que al final de la curva registró un aumento y posterior disminución, ya que en este punto las concentraciones de algas estaban en su etapa de muerte, por tal motivo al realizar la medición en el equipo espectrofotométrico se notó que la muestra adquirió una coloración diferente a la que tuvo en las diferentes etapas de crecimiento del alga, pérdida de viabilidad que el espectrofotómetro no detecta. Adicionalmente la harina de pescado no logra una adecuada homogenización en el medio, produciendo grumos, que fueron registrados con mayor densidad que en los obtenidos con harina de soja.

4.1.9. Producción de biomasa

Tabla 19.

Producción de biomasa en luz natural

Biomasa (luz natural)		
Fuentes	Cantidad	Tamaño de la muestra
Harina de pescado	0,8	1L
Harina de soja	1	1L
Gallinaza	0,3	1L
Caldo alga	0,6	1L

Nota: En la tabla anterior se describe la biomasa obtenida en los diferentes cultivos. Autores, 2018

Tabla 20.*Producción de biomasa en luz artificial*

Biomasa (luz artificial)		
Fuentes	Cantidad	Tamaño de la muestra
Harina de pescado	1	1L
Harina de soja	1,3	1L
Gallinaza	0,5	1L
Caldo alga	0,8	1L

Nota: En la tabla anterior se describe la biomasa obtenida en los diferentes cultivos. Autores, 2018

Las concentraciones de biomasa alcanzadas en condiciones de luz natural fueron menores a las de luz artificial con una concentración máxima de 1g/l en el medio de cultivo con harina de soja y una mínima de 0,3g/l en el cultivo con gallinaza como se puede observar en la tabla (12), en condiciones de luz artificial se presentó una concentración máxima de biomasa 1,3 g/l igualmente en el cultivo con soja y una concentración mínima de 0,5g/l en el cultivo con gallinaza.

La producción de biomasa a partir de *Scenedesmus acutus* presentó un comportamiento similar al del crecimiento celular, en el cual se puede decir que la concentración de biomasa es una variable dependiente de las condiciones de cultivo, debido a que entre más concentración celular se presente, mayor será la biomasa producida.

Se reporta en el documento (Rodríguez-Castillo, Amarelo-Santos, Guerrero-Barrantes, & Delgado dos Reis, 2016) el 50 % de la productividad de la biomasa depende del carbono, sin embargo en el presente proyecto se trabajó sin la presencia de este micronutriente para poder evaluar principalmente la asimilación del nitrógeno por la micro alga *Scenedesmus acutus*

4.1.10. Producción de aceite

En cuanto a la etapa de extracción de aceite, se realizó el método de selección por adecuado comportamiento en crecimiento celular y obtención de biomasa, por esta razón se eligió el cultivo con presencia de harina de soja para la realización de esta prueba.

Tabla 21.
Producción de aceite

Producción de aceite	
Biomasa	aceite
2,3 g	0,7 g/l

Nota: Descripción del aceite obtenido del cultivo con presencia de harina de soja. Autores, 2018

Se obtuvo 0,7g/l de aceite de 6,2g de biomasa del microalga *Scenedesmus acutus* por medio de la metodología propuesta, seleccionando el hexano para realizar el proceso de extracción de aceites por el método Soxhlet, debido a que es un disolvente, relativamente económico, volátil, no polar, y que tiene gran capacidad de absorción de grasas orgánicas.

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 y la producción de aceite, en este proyecto se demostró que en las condiciones expuestas se logró un rendimiento del 30%.

Tabla 22.

Análisis Correlacional entre las variables (luz implementada, alimentos implementados, número de células, biomasa de las muestras).

Correlaciones				
		Luz implementada	Alimentos Implementados	Número de Células
Luz implementada	Correlación de Pearson	1	,062	,337**
	Sig. (bilateral)		,569	,001
	N	88	88	88
Alimentos Implementados	Correlación de Pearson	,062	1	,364**
	Sig. (bilateral)	,569		,000
	N	88	88	88
Número de Células	Correlación de Pearson	,337**	,364**	1
	Sig. (bilateral)	,001	,000	
	N	88	88	88
Biomasa de las muestras	Correlación de Pearson	,480**	,432**	,572**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000
	N	88	88	88

**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Nota: Descripción de los resultados obtenidos luego de realizar la correlación de Pearson en el programa spss. Por Autores, 2018.

Tabla 24.

Análisis Correlacional entre las variables (luz implementada, alimentos implementados, número de células, biomasa de las muestras).

Correlaciones		
		Biomasa de las muestras
Luz implementada	Correlación de Pearson	,480**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	88
Alimentos Implementados	Correlación de Pearson	,432**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	88
Número de Células	Correlación de Pearson	,572**

Tabla 25.Continuación

	Sig. (bilateral)	,000
	N	88
Biomasa de las muestras	Correlación de Pearson	1
	Sig. (bilateral)	
	N	88

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Nota: Descripción de los resultados obtenidos luego de realizar la correlación de Pearson en el programa spss. Por Autores, 2018.

El análisis estadístico realizado usando el método de correlación de Pearson, técnica que permite detectar la existencia o inexistencia de diferencias significativas entre muestras diferentes, se verifica la relación entre las variables (luz, concentración celular, biomasa, alimento) que se tomaron para evaluar el comportamiento de la microalga *Scenedesmus acutus*.

4.1.11. Correlación luz – concentración celular según correlación Pearson

En la tabla anterior se determinó que las variables luz y concentración celular no están fuertemente relacionadas debido a que existe una correlación de tan solo del 33% ya que el crecimiento celular también depende de otros factores como lo son los nutrientes y el CO₂, aunque es una relación perfecta positiva debido a que al aumentar la intensidad lumínica aumenta la concentración celular.

La luz es el nutriente que proporciona la energía a las microalgas para que puedan llevar a cabo la generación de nueva biomasa y es por tanto el motor del crecimiento.(Vásquez, n.d.) Para que exista crecimiento no basta con que se haya producido división celular, dado que la simple división de una célula no constituye un aumento de volumen o masa, lo que posteriormente causa un aumento en la densidad celular.(Vásquez, n.d.) con esto se puede aclarar la razón por la cual la microalga no aprovecha el 100% de la intensidad lumínica para su crecimiento celular y presenta una correlación del 33% entre concentración celular y luz. A pesar de que se demostró una diferencia de 800.000 cel/ml entre las condiciones de luz natural y artificial, por lo tanto, habría que agregar también que todavía cabe señalar que el conteo celular por Cámara de Neubaur tiene un error entre el 20 al 30 % así mismo podría variar los resultados.

4.1.12. Correlación alimento – Concentración celular

La correlación de Pearson nos muestra una relación de tan solo el 36% debido a que también depende de otras variables como lo es la intensidad lumínica entre alimento y concentración celular, dado que es una correlación perfecta positiva por causa de que el crecimiento celular de las microalgas es una variable que depende del alimento (nutrientes). Los cuales pueden aumentar su crecimiento exponencialmente.

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺).(Gabriel Rodríguez-Castillo¹, 2016). Considerando que en esta investigación solo se realizaron estudios evaluando el comportamiento

con alimentos con alto contenido en nitrógeno y de muy bajo costo, se representa una correlación del 36% con respecto a la concentración celular. sin embargo, en los resultados obtenidos se logra ver una alta diferencia de crecimiento celular entre las diferentes fuentes de nitrógeno con una máxima concentración celular de $4,7 \times 10^6$ para el cultivo que consumió harina de soja como fuente de nitrógeno y una mínima concentración de $8,4 \times 10^6$ en el cultivo que consumió gallinaza. El porcentaje de correlación podría aumentar alimentando la microalga con nutrientes con el fósforo y el carbono.

4.1.13. Correlación Biomasa – Concentración celular.

La tabla anterior nos muestra los resultados obtenidos de la correlación de Pearson la cual nos reporta una correlación del 57% entre concentración celular y biomasa en donde se puede ver una relación significativa ya que es mayor al 50%, igualmente es una relación perfecta positiva debido a que la producción de biomasa depende de la concentración celular.

En el proceso de relación entre la biomasa (peso seco celular de la microalga) y la concentración celular de la microalga (Hernández-Pérez, 2014), presenta una correlación del 57%; Teniendo en cuenta que la biomasa es el subproducto o residuo de las microalgas en fase estacionaria del crecimiento celular, los resultados muestran una alta relación entre concentración celular y producción de biomasa en los cuales se obtuvo una máxima producción de 1,3g en 1L para el cultivo con presencia de harina de soja el cual presta el máximo valor de concentración celular. En el que al ser contrastado con la literatura nos evidencia que metodológicamente se presenta un error inherente entre el 20 – 30% entre el número de células (Arredondo & Voltolina, 2014).

Conclusiones

➤ Con respecto a los estudios realizados y a los resultados obtenidos por las fases metodológicas de conteo celular, obtención de biomasa, y extracción de aceites se logra concluir que los cambios son representativos entre las diferentes fuentes de nitrógeno (gallinaza, harina de pescado, y harina de soja) donde varían los valores de concentración celular, y peso seco de biomasa, entre gallinaza que fue la fuente con menor crecimiento celular y de biomasa y harina de soja con el máximo, presentando una diferencia de 3×10^6 cel/ml de concentración celular, y de 0,7 g en biomasa para luz natural algo semejante se concluye para luz artificial donde se reporta una diferencia entre gallinaza y soja de 4×10^6 cel/ml de concentración celular y de 0,8 g en biomasa.

➤ Debido al alto porcentaje de proteína que contiene la harina de soja y los componentes de lisina, además cantidades importantes de otros nutrientes esenciales, tales como ácido linoleico y colina, cuya disponibilidad es alta, con un porcentaje alto de proteína del (47-48% PB), debido a esto la harina de soja fue la fuente de nitrógeno de bajo costo para la producción de biodiesel, en la cual la microalga *Scenedesmus acutus* presento mejor rendimiento en cada uno de los parámetros medidos (crecimiento celular, obtención de biomasa, y producción de aceite).

➤ En relación a los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, se puede concluir que las condiciones ya sean microbiológicas, físicas, químicas y dado el carácter cosmopolita de la microalga *Scenedesmus* sp, la ausencia de su aislamiento en el tramo muestreado del caño Aguas Claras, requiere ampliar los puntos de muestreo.

Recomendaciones

Se recomienda caracterizar el cuerpo de agua caño Aguas Claras donde se determine parámetros microbiológicos, físicos, químicos e hidrobiológicos con el fin de conocer las condiciones actuales de este cuerpo hídrico.

Se recomienda realizar más estudios con diferentes concentraciones de harina de soja para determinar la mejor condición de crecimiento celular y optimizar la producción de lípidos obtenida en el estudio realizado; así mismo, incluir una fuente de Carbono orgánico que permita el incremento de la biomasa.

Se recomienda implementar foto birreactores con mayor capacidad para realizar, el escalamiento del proceso, buscando los volúmenes apropiados, que permitan evaluar experimentalmente las propiedades de aceite de *Scenedesmus acutus*, tales como densidad, viscosidad, índice ácido entre otras, aumento de biomasa a mayor escala y poder saber si es factible para su comercialización.

Referencias bibliográficas

- Altieri, m. (2009). Los impactos ecológicos de los sistemas de producción de biocombustibles a base de monocultivos a gran escala en américa. Retrieved from <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/23841/1/117191-464771-1-pb.pdf>
- An insight on algal cell disruption for biodiesel production. (2018). *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 11, 26. Retrieved from https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85041694455&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=micro+algae&st2=scenedesmus+dimorphus+&searchterms=biodiesel%3f%21%22*%24&sid=141f70680cbc326cdf7d5844d567c4a4&sot=b&sdt=b&s
- Arredondo, b., & voltolina, d. (2014). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, (january), 21–29. <https://doi.org/artn d05301\ndoi 10.1029/2009jd012399>
- Bendeck, j. (2017). Los biocombustibles en colombia en palabras de jorge bendeck o. - presidente fedebiocombustibles. *Fedebiocombustibles*. Retrieved from <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-2822.htm>
- Bermeo, l. (2011). *Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado*; autora. Cádiz españa. Retrieved from <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/342>
- Biocombustibles. (2010). *National geographic*. Retrieved from <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/biocombustibles>
- Bohórquez, j. A. (2013). Caracterización de la contaminación atmosférica en colombia. *University college london – universidad de los andes*, <https://prosperityfund.uniandes.edu.co/site/wp-con>
- Borja. (2017). La electricidad frente al combustible. *Twenergy*. Retrieved from <https://twenergy.com/a/la-electricidad-frente-al-combustible-2734>
- Cárdenas, a. G. (2016). Oil palm agro-industry in america. *Revista palmas*, 37(0121–2923), 215–228. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas>
- Colombia, c. De. (1991). Constitución política de colombia. *Presidencia de la república*, 139.

<https://doi.org/42867930>

Dbbe. (2018). *Introducción a la botánica 2018 - las algas*. Buenos Aires Argentina. Retrieved from <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Gui769aTPBota769nica2019PrimerapartecoonHS.pdf>

Di Donato, M. (2008). Agro(bio)combustibles por qué no nos salvarán. *Dossier*. Retrieved from https://www.fuhem.es/media/cdv/file/biblioteca/dossier/dossier_agrobiocombustibles.pdf

Ecured.cu. (2018). *Chlorella vulgaris* - ecured. Retrieved from <https://www.ecured.cu/index.php?>

Effect of light intensity for optimum biomass and lipid production from *Scenedesmus dimorphus*

(Turpin) Kützing. (2016). *Earth and environmental science*, 75. Retrieved from [https://www-](https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85036476150&origin=resultslist&sort=plf-)

[scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-](https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85036476150&origin=resultslist&sort=plf-)

[85036476150&origin=resultslist&sort=plf-](https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85036476150&origin=resultslist&sort=plf-)

[f&src=s&st1=micro+algae&st2=scenedesmus+dimorphus+&searchterms=biodiesel%3f%2](https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85036476150&origin=resultslist&sort=plf-)

[1%22*%24&sid=141f70680cbc326cdf7d5844d567c4a4&sot=b&sdt=b&s](https://www-scopus-com.bdatos.usantotomas.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85036476150&origin=resultslist&sort=plf-)

El-haggag, S. (2010). Sustainability and innovation. Retrieved from

[https://books.google.com.co/books?id=7x89daaaqbaj&printsec=frontcover&dq=sustainabili](https://books.google.com.co/books?id=7x89daaaqbaj&printsec=frontcover&dq=sustainability+and+innovation&hl=es-419&sa=x&ved=0ahukewj74ehx4u3aahuj7lmkhsckcheq6aeijja#v=onepage&q=sustainability)

[ty+and+innovation&hl=es-](https://books.google.com.co/books?id=7x89daaaqbaj&printsec=frontcover&dq=sustainability+and+innovation&hl=es-419&sa=x&ved=0ahukewj74ehx4u3aahuj7lmkhsckcheq6aeijja#v=onepage&q=sustainability)

[419&sa=x&ved=0ahukewj74ehx4u3aahuj7lmkhsckcheq6aeijja#v=onepage&q=sustainabil](https://books.google.com.co/books?id=7x89daaaqbaj&printsec=frontcover&dq=sustainability+and+innovation&hl=es-419&sa=x&ved=0ahukewj74ehx4u3aahuj7lmkhsckcheq6aeijja#v=onepage&q=sustainability)

[ity and innovation&f=false](https://books.google.com.co/books?id=7x89daaaqbaj&printsec=frontcover&dq=sustainability+and+innovation&hl=es-419&sa=x&ved=0ahukewj74ehx4u3aahuj7lmkhsckcheq6aeijja#v=onepage&q=sustainability)

Estación meteorológica Vanguardia Villavicencio. (2018). Clima en Villavicencio - Vanguardia.

Retrieved from [https://www.tutempo.net/clima/ws-](https://www.tutempo.net/clima/ws-802340.html?fbclid=iwar1cjsutcx78lwmgwki4edzd31vt8gdj9anbosm4gb2wygvqq1orstxtfy)

[802340.html?fbclid=iwar1cjsutcx78lwmgwki4edzd31vt8gdj9anbosm4gb2wygvqq1orstxtfy](https://www.tutempo.net/clima/ws-802340.html?fbclid=iwar1cjsutcx78lwmgwki4edzd31vt8gdj9anbosm4gb2wygvqq1orstxtfy)

[e](https://www.tutempo.net/clima/ws-802340.html?fbclid=iwar1cjsutcx78lwmgwki4edzd31vt8gdj9anbosm4gb2wygvqq1orstxtfy)

Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible. (2011).

Retrieved from [https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/9403/3.3.](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/9403/3.3.Biodiesel.pdf?sequence=5&isallowed=y)

[Biodiesel.pdf?sequence=5&isallowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/9403/3.3.Biodiesel.pdf?sequence=5&isallowed=y)

Fao. (2008). *Efectos de los biocombustibles en el medio ambiente*. Retrieved from

<http://www.fao.org/3/i0100s/i0100s05.pdf>

Fedpalma. (2017). El palmicultor. *Fedpalma*. Retrieved from

[http://web.fedpalma.org/sites/default/files/files/fedpalma/semanario palmero/16 de](http://web.fedpalma.org/sites/default/files/files/fedpalma/semanario_palmero/16_de_marzo/palmicultor_marzo_2017.pdf)

[marzo/palmicultor_marzo 2017.pdf](http://web.fedpalma.org/sites/default/files/files/fedpalma/semanario_palmero/16_de_marzo/palmicultor_marzo_2017.pdf)

Fedna - fundación española para el desarrollo de la nutrición animal. (2015). Harina de soja -

- fedna. Retrieved from http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-soja-47-pb
- Fernandez, j. (2004). Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Retrieved from <https://w3.ual.es/~jfernand/procmicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>
- Gabriel rodríguez-castillo1. (2016). Study of morphological and physiological characteristics of *chlorella protothecoides* oriented to lipid production for biofuel. Retrieved from https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s0379-39822016000800003&script=sci_arttext
- Garcia, e. (2010). Perspectiva de los biocombustibles en el departamento del meta. Retrieved from http://observatorio.unillanos.edu.co/portal/archivos/94perspectivadelosbiocombustibles_meta.pdf
- Hernández-pérez, a. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Scielo*. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- Herrera, b. (2009). Biocombustibles en colombia. *Upme*. Retrieved from http://www.upme.gov.co/docs/biocombustibles_colombia.pdf
- Hobsbawm, e. (1998). Historia del siglo xx. Retrieved from <https://uhphistoria.files.wordpress.com/2011/02/hobsbawn-historia-del-siglo-xx.pdf>
- Hurtado, n. (2013). Evaluacion ecologica y ambiental del humedal aguas claras, barrio la alborada, villavicencio, meta. *Universidad nacional*. Retrieved from https://stadium.unad.edu.co/preview/unad.php?url=/bitstream/10596/1420/1/humedad_40394150.pdf
- Instituto amazónico de investigaciones científicas sinchi. (2008). *Microalgas acuáticas: la otra escala de la biodiversidad en la amazonia colombiana*. Colombia. Retrieved from <https://www.sinchi.org.co/>
- Jesus, a. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra ximhai*, 8. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>
- La hora del planeta 2009 marca nuevos récords en la lucha contra el cambio climático. (2009). *Wwf*. Retrieved from <http://www.wwf.org.co/?155921/la-hora-del-planeta-2009-marca-nuevos-records-en-la-lucha-contra-el>
- Lara. (2013). Fotobiorreactores. Retrieved from <http://biofermt.blogspot.com.co/2013/11/fotobiorreactor.html>

- Maciel, c. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. Retrieved from <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlosalvarez.pdf>
- Minambiente. (2008). Lineamientos de política para promover la producción sostenible de biocombustibles en Colombia. *Conpes*. Retrieved from <http://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article/372-plantilla-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-sin-galeria-38>
- Mora, a. Ramos, k. Sanchez, a. & camacho, r. (2015). Efecto de la salinidad y la luminosidad sobre el tamaño de *neochloris cohaerens*. *Rstudio*. Retrieved from <https://rpubs.com/veronica113/124294>
- Morales v, s. P. (2008). Crecimiento de *scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la *scenedesmus* sp growth in different culture mediums. *Vitae revista de la facultad de química farmaceutica*, 15(0121–4004), 25–31. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v15n1/v15n1a04.pdf>
- Olmedo, f. (2009). Biodiésel de algas. Producción de biodiésel utilizando algas. *Biodisol*. Retrieved from <http://www.biodisol.com/biocombustibles/biodiesel-de-algas-proceso-de-produccion-de-biodiesel-utilizando-algas-energias-renovables-biocombustibles-cultivos-energeticos/>
- Rodríguez-castillo, g., amarelo-santos, c., guerrero-barrantes, m., & delgado dos reis, a. (2016). Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Revista tecnología en marcha*, 29(6), 3. <https://doi.org/10.18845/tm.v29i6.2897>
- Salinas, e. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*, 157, 9. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/325/32512739009.pdf>
- Salinas callejas, e., & gasca quezada, v. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*, 157(0186–1840), 75–82. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/325/32512739009.pdf>
- Sanabria, j. (2014). Caracterización de las microalgas para la producción de biodiesel a través de medios químicos. *Universidad autónoma del caribe*. Retrieved from http://repositorio.uac.edu.co/jspui/bitstream/1/780/1/tmec_1095.pdf
- Scidev.net América latina y el Caribe. (2007). Biocombustibles: beneficios y riesgos del tercer mundo. Retrieved from <https://www.scidev.net/america-latina/desarrollo-de->

- capacidades/opinion/biocombustibles-beneficios-y-riesgos-del-tercer-m.html
- Towards sustainable production of biofuels from microalgae. (2008). *International journal of molecular sciences*, 9(7), 1188–1195. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>
- Triana, m., martínez, a., & cañizares, r. (2013). *Acta biológica colombiana*, 18(1900–1649), 43–68. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-548x
- Triana, r. (2014). La industria biodiesel en colombia - aneia - universidad de los andes. Retrieved from <https://agronegocios.uniandes.edu.co/2014/03/10/la-industria-biodiesel-en-colombia/>
- Tupiñón, e. (2016). Cultivo de la microalga *scenedesmus obliquus* var. *Dimorphus* (turpin) para la obtención de biomasa y lípidos. *Universidad ricardo palma*. Retrieved from http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/973/ega_mercado_te.pdf?sequence=3&isallowed=y
- Vásquez, j. A. (n.d.). Fotosíntesis, productividad y algas marinas chapter (pdf available) · january 2006 with 18,685 reads. *Universidad catolica de chile*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/236980779_fotosintesis_productividad_y_algas_marinas
- Virviescas, martha; aponte, j. (2016). Advances on microalgae strains bank at centro internacional náutico fluvial y portuario of sena. *Sennova colombia*, 2(1), 30–41. Retrieved from <http://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/536>
- Weather spark. (n.d.). Clima promedio en villavicencio-weather spark. Retrieved from <https://es.weatherspark.com/>
- Zaragoza, r., boada, m., barrera, n., & mcall, m. (2009). Percepciones socioambientales infantiles y adolescentes. Propuestas de educación ambiental. La huacana méxico. *Utopía y praxis latinoamericana*, 44, 14. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/41805434_percepciones_socioambientales_infantiles_y_adolescentes_propuestas_de_educacion_ambiental_la_huacana_michoacan_mexico