



UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA IN VITRO DE MICROALGA
CHLORELLA SPP. A PARTIR DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

AUTOR:

RONNY FABIAN AMAGUAY GOMEZ

SAMANTA AMADA BENAVIDES VILLARREAL

TUTOR:

Barzallo Granizo Diego Geovanny, PhD.

Milagro, 2025

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Ronny Fabian Amaguay Gomez** y **Samanta Amada Benavides Villarreal**, en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **8 de agosto del 2025**



Firmado electrónicamente por:
**RONNY FABIAN
AMAGUAY GOMEZ**

Validar únicamente con FirmaEC



Firmado electrónicamente por:
**SAMANTA AMADA
BENAVIDES
VILLARREAL**

Validar únicamente con FirmaEC

Ronny Fabian Amaguay Gómez

C.I.: 0954510160

Samanta Amada Benavides Villarreal

C.I.: 0942078106

II.

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Diego Geovanny Barzallo Granizo**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Ronny Fabian Amaguay Gómez** y **Samanta Amada Benavides Villarreal**, cuyo tema es **EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA IN VITRO DE MICROALGA CHLORELLA SPP. A PARTIR DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**, que aporta a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 8 de agosto del 2025



Barzallo Granizo Diego Geovanny, PhD.

C.I.: 0603923095

III.

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los veintinueve días del mes de julio del dos mil veinticinco, siendo las 09:30 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. AMAGUAY GOMEZ RONNY FABIAN, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA IN VITRO DE MICROALGA CHLORELLA SPP. A PARTIR DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ, Presidente(a), Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN en calidad de Vocal; y, MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **100.00** equivalente a: **EXCELENTE**.

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 10:30 horas.



Firmado electrónicamente por:
**YESSENIA BEATRIZ
SARANGO ORTEGA**
Validar únicamente con FirmaEC

Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**ALEX EDWIN GUILLEN
BONILLA**
Validar únicamente con FirmaEC

Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**GUSTAVO ELIAS
MARTINEZ VALENZUELA**
Validar únicamente con FirmaEC

MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**RONNY FABIAN
AMAGUAY GOMEZ**
Validar únicamente con FirmaEC

ING. AMAGUAY GOMEZ RONNY FABIAN
MAGÍSTER

IV.

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los veintinueve días del mes de julio del dos mil veinticinco, siendo las 09:30 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. BENAVIDES VILLARREAL SAMANTA AMADA, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA IN VITRO DE MICROALGA CHLORELLA SPP. A PARTIR DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ, Presidente(a), Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN en calidad de Vocal; y, MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **100.00** equivalente a: **EXCELENTE**.

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 10:30 horas.



Firmado digitalmente por:
**YESSENIA BEATRIZ
SARANGO ORTEGA**
Calificado electrónicamente con FirmadOT

Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado digitalmente por:
**ALEX EDWIN GUILLEN
BONILLA**
Calificado electrónicamente con FirmadOT

Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
VOCAL



Firmado digitalmente por:
**GUSTAVO ELIAS
MARTINEZ VALENZUELA**
Calificado electrónicamente con FirmadOT

MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado digitalmente por:
**SAMANTA AMADA
BENAVIDES
VILLARREAL**
Calificado electrónicamente con FirmadOT

ING. BENAVIDES VILLARREAL SAMANTA AMADA
MAGISTER

Dedicatoria

Dedico este aporte de investigación a Dios, mi familia, amigos y personas cercanas que vieron de cerca el proceso de formación tanto personal como profesional.

Samanta Amada Benavides Villarreal

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación a Dios, mi madre, familia y amigos que han estado acompañándome en este proceso.

Ronny Fabian Amaguay Gomez

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por haberme sostenido con su amor, por guiar cada paso de mi vida y por darme la fortaleza para culminar esta etapa tan importante de mi formación profesional. Sin Su presencia, nada de esto habría sido posible. Agradezco profundamente a mi congregación Unidad y Esperanza en Jesús y al grupo de jóvenes G.E.MI, por sus oraciones, palabras de aliento y muestras de cariño en los momentos más desafiantes de este proceso.

A mis padres, Sofía y Jorge, gracias por su amor, apoyo constante y por enseñarme a caminar con fe y determinación. A mis hermanos, Eva y Andrés, por su compañía y por ser parte esencial de mi vida. A mis primos, Camila, Enrique, Eduardo, Steven, Merlina, Hilary, Fabrizio y demás familiares, por su cercanía y respaldo en todo momento.

A mi futuro esposo David, gracias por tu paciencia, ternura y por estar siempre a mi lado en cada paso de este camino. Tu compañía ha sido una bendición invaluable. Con especial cariño, quiero recordar a quienes ya no están físicamente, pero viven en mi corazón: mi abuelita Mami Anita (†), mi tío Ernesto (†) y mi amiga Katherine Arce (†). Sé que desde el cielo celebran conmigo este logro que también les pertenece.

A mi querido amigo Ronny, gracias por tu compromiso y entrega en este proyecto de tesis. Tu esfuerzo fue fundamental, y más allá de ser un gran compañero de trabajo, te has convertido en un partner de risas y aprendizajes. Agradezco profundamente el haber contado con tus conocimientos, tu apoyo y tu buena energía durante todo este proceso.

A mis amigos del trabajo: Valentina, Kevin, Josué, Jaime, Óscar, Raúl, Yessenia y Viviana, gracias por su ayuda, por estar presentes y por sus valiosos aportes que hicieron más llevadera esta etapa.

Este trabajo representa no solo un objetivo académico alcanzado, sino también un testimonio de amor, fe, constancia y gratitud hacia todas las personas que han sido parte de este proceso.

Con cariño,
Samanta Benavides

Agradecimientos

Agradezco a Dios por haberme dado la fuerza necesaria para lograr una meta más en mi vida profesional. Así también, agradezco a mi madre Gioconda Gómez, por estar en cada paso de este proceso y enseñarme que nada es imposible en la vida, aun cuando parezca lo contrario.

A mis amigos de trabajo: Kevin, Valentina, Jaime, Josué, Raúl, Óscar, Yessenia y Viviana, por apoyarme con sus conocimientos cuando más lo necesitaba. A mi querida amiga Samanta, quien no solo ha sido mi compañera en este trabajo de investigación, sino también, mi partner. Así también, a mi segunda familia, Daniela, María, Marahia, Steven, Estefanny, Gisella y Javier, que han estado conmigo en una de las etapas más hermosas de mi vida, la Universidad.

Y por último agradezco a mi padre, Luis Amaguay (†), por cuidarme desde el cielo.

Este y cada uno de mis logros es para ustedes, gracias por ser parte de mi vida.

Con cariño,
Ronny Amaguay

Resumen

Las microalgas como *Chlorella spp.* son organismos clave en biotecnología por su rápido crecimiento, eficiencia fotosintética y producción de metabolitos secundarios. Su escalabilidad enfrenta desafíos como: altos costos, contaminación y sensibilidad a condiciones fisicoquímicas. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación es evaluar *in vitro* medios de cultivos para optimizar la producción de biomasa de *Chlorella spp.* proporcionando datos clave para su implementación industrial eficiente. Para determinar la producción de biomasa de la microalga *Chlorella spp.* se emplearon diferentes medios de cultivo, Murashine Skoog (R1) y tres fertilizantes NPK: dos en presentación líquida (R2 y R3) y uno granular (R4), donde se evaluó el número de células/mL, peso seco y productividad. Por otro lado, para evaluar el contenido de proteínas se empleó el método Hartree-Lowry y se usó un espectrofotómetro UV-visible empleando una absorbancia de 650 nm. Los datos obtenidos fueron analizados usando el software R. Se determinó la fase exponencial entre los días 2 y 5, con estabilización hacia el día 7, especialmente en los reactores R1, R3 y R4, mientras que el reactor R2 mostró un crecimiento continuo más acentuado. Así mismo, se observó una mayor concentración celular para el tratamiento R2 con 1.4×10^7 cel/mL y una productividad de 0.4 g/L/día en comparación a los demás tratamientos que tuvieron valores inferiores. Además, se observó una mayor concentración proteica total de 426.25 mg/L y soluble de 16.59 mg/L para R2 en comparación a los demás tratamientos. El tratamiento R2 se posicionó como el tratamiento más eficiente, tanto en términos de peso seco, productividad y contenido proteico total y soluble, superando consistentemente a los otros tratamientos. Su composición rica en nutrientes promovió una respuesta positiva tanto en el crecimiento como en el metabolismo proteico.

Palabras-clave: *Chlorella spp.*, microalgas, biomasa, optimización de cultivo.

Abstract

Microalgae such as *Chlorella spp.* are key organisms in biotechnology due to their rapid growth, photosynthetic efficiency and production of secondary metabolites. Their scalability faces challenges such as: high costs, contamination and sensitivity to physicochemical conditions. Therefore, the main objective of this research is to evaluate in vitro culture media to optimize biomass production of *Chlorella spp.* providing key data for its efficient industrial implementation. To determine the biomass production of the microalgae *Chlorella spp.* different culture media, Murashine Skoog (R1) and three NPK fertilizers were used: two in liquid form (R2 and R3) and one granular (R4), where the number of cells/mL, dry weight and productivity were evaluated. On the other hand, the Hartree-Lowry method was used to evaluate the protein content, using a UV-visible spectrophotometer with an absorbance of 650 nm. The data obtained were analyzed using R software. The exponential phase was determined between days 2 and 5, with stabilization towards day 7, especially in reactors R1, R3 and R4, while reactor R2 showed a more accentuated continuous growth. Likewise, a higher cell concentration was observed for treatment R2 with 1.4×10^7 cell/mL and a productivity of 0.4 g/L/day compared to the other treatments that had lower values. In addition, a higher total protein concentration of 426.25 mg/L and soluble protein concentration of 16.59 mg/L was observed for R2 compared to the other treatments. Treatment R2 was positioned as the most efficient treatment, both in terms of dry weight, productivity and total and soluble protein content, consistently outperforming the other treatments. Its nutrient-rich composition promoted a positive response in both growth and protein metabolism.

Key-words: *Chlorella spp.*, microalgae, biomass production, culture optimization.

Lista de Figuras

Figura 1 Fotobiorreactor	23
Figura 2 Gráfica de dispersión celular	28
Figura 3 Peso seco x día.....	30

Lista de Tablas

Tabla 1	Operacionalización de variables	5
Tabla 2	Taxonomía de la <i>Chlorella</i> spp.....	8
Tabla 3	Tipos de microalgas	9
Tabla 4	Composición y optimización de los medios de cultivo	11
Tabla 5	Clasificación de biorreactores	14
Tabla 6	Factores que influyen en la tasa de crecimiento específico.....	16
Tabla 7	Condiciones controladas de laboratorio	20
Tabla 8	Composición de cada medio de cultivo	22
Tabla 9	Promedios de crecimiento.....	27
Tabla 10	Correlación de Pearson crecimiento celular	29
Tabla 11	Análisis Pearson aplicada al peso seco	29
Tabla 12	Normalidad Shapiro-Wilk	31
Tabla 13	Prueba de normalidad proteína (Shapiro-Wilk)	31
Tabla 14	Pruebas de normalidad proteína total con base al peso seco (Shapiro-Wilk)	32
Tabla 15	ANOVA	33

Índice / Sumario

Derechos de Autor	ii
Certificación de Defensa	¡Error! Marcador no definido.
Dedicatoria	vi
Dedicatoria	vii
Agradecimientos	viii
Resumen.....	x
Abstract	xi
Lista de Tablas	xiii
Índice / Sumario	xiv
Introducción	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Delimitación del problema.....	3
1.3. Formulación del problema	3
1.4. Preguntas de investigación.....	3
1.5. Objetivos.....	4
1.5.1 Objetivo general	4
1.5.2 Objetivos específicos.....	4
1.6. Hipótesis	4
1.7. Justificación.....	4
1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)	5
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	6
2.1. Antecedentes Referenciales.....	6
2.2. Marco Conceptual	8
2.2.1. Microalgas	8
2.2.1.1. Taxonomía.....	8
2.2.1.2. Clasificación	9
2.2.1.3. Condiciones ambientales	10
2.2.2. Medios de cultivo.....	11

2.2.3.	Componentes esenciales.....	11
2.2.3.1.	Macronutrientes.....	12
2.2.3.2.	Micronutrientes.....	12
2.2.4.	Biorreactores.....	12
2.2.4.1.	Sistemas Abiertos.....	13
2.2.4.2.	Sistemas Cerrados.....	13
2.2.4.3.	Ventajas y desafíos de implementación.....	13
2.2.5.	Fases de crecimiento.....	14
2.2.5.1.	Fase de adaptación.....	14
2.2.5.2.	Fase exponencial.....	14
2.2.5.3.	Fase estacionaria.....	14
2.2.5.4.	Fase de muerte.....	15
2.2.6.	Factores que afectan las fases de crecimiento.....	15
2.2.7.	Estrategias de cultivo.....	15
2.2.8.	Tasa de crecimiento específica.....	15
2.2.9.	Tiempo de duplicación.....	16
2.2.10.	Biomasa.....	17
2.2.10.1.	Características.....	17
2.3.	Marco Teórico.....	17
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....		20
3.1.	Tipo y diseño de investigación.....	20
3.2.	La población y la muestra.....	20
3.3.	Los métodos y las técnicas.....	20
3.3.1.	Preparación del Inóculo.....	20
3.3.2.	Medios de cultivo.....	21
3.3.3.	Diseño de fotobiorreactor.....	22
3.3.4.	Determinación de la concentración celular.....	23
3.3.5.	Determinación del peso seco y productividad.....	24
3.3.6.	Cuantificación de Proteínas.....	24
3.3.7.	Análisis de los Resultados.....	25
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados.....		27
4.1.	Dinámica de crecimiento microbiano.....	27
4.2.	Comportamiento del crecimiento celular en función del tiempo.....	29
4.3.	Evolución del peso seco.....	30
4.4.	Análisis de la Producción de Proteína.....	31

4.4.1. Contenido de Proteína Soluble (mg/L).....	31
4.4.2. Contenido de Proteína total estimada (mg/L)	32
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones	34
5.1. Discusión	34
5.2. Conclusiones.....	36
5.3. Recomendaciones	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS.....	48

Introducción

Las microalgas constituyen un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos unicelulares que, pese a su origen polifilético, poseen la capacidad de realizar procesos mediante la conversión de energía lumínica en energía química (Casanova et al., 2023). Estos organismos presentan una notable diversidad taxonómica, morfológica y fisiológica, su metabolismo permite biosintetizar compuestos bioactivos de alto valor agregado como lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y metabolitos secundarios con propiedades funcionales (Khavari et al., 2021).

El campo investigativo de las microalgas ha experimentado una progresión significativa en áreas claves como la producción de biocombustibles alternativos, suplementos nutricionales y aplicaciones de biorremediación de efluentes (Grama et al., 2022). No obstante, la literatura evidencia una brecha crítica entre los estudios a escala en laboratorios y el conocimiento teórico sobre la producción de biomasa de microalgas, evidenciando la necesidad de trasladar los avances científicos hacia aplicaciones tecnológicas concretas en diversos sectores productivos (Lopes, 2022).

Las microalgas se han consolidado como un recurso estratégico dentro de los modelos de bioeconomía circular. Entre sus aplicaciones, se destaca la síntesis sostenible de biocombustibles incluidos el biodiesel, bioetanol y biohidrógeno. Esta versatilidad metabólica unido a su capacidad de crecimiento, posiciona a los microorganismos fotosintéticos como plataformas celulares de interés industrial (Coronado et al., 2022).

Chlorella spp. es un género de microalgas que destaca por su tasa de crecimiento exponencial, su alta eficiencia fotosintética y una versatilidad para producir metabolitos de interés. Estas propiedades la han posicionado como un organismo modelo en biotecnología (Elisabeth et al., 2021). La producción de *Chlorella spp.* es altamente eficiente, su biomasa es utilizada en varias aplicaciones debido a su capacidad de reproducción rápida y su perfil bioquímico es ideal para las aplicaciones industriales en escala (Múnera Betancourt, 2024).

Sin embargo, la producción de esta microalga enfrenta desafíos críticos que limitan su viabilidad económica. Entre las problemáticas se presentan la optimización de costos operativos de nutrientes, iluminación y contaminación por cepas invasoras que afectan la calidad de biomasa (Dolganyuk et al., 2020).

De acuerdo con Calijuri et al., (2022), el crecimiento y productividad de *Chlorella spp.* están determinados por factores fisicoquímicos como la intensidad lumínica, temperatura óptima, nutrientes, variaciones de concentración de CO₂, pH y condiciones de estrés, reduciendo la eficiencia en la producción de biomasa y perfiles metabólicos de interés.

En un estudio sobre las metodologías experimentales que evalúan el crecimiento de microalgas, Maltsev y Maltseva, (2021), enfatiza que, el crecimiento de las microalgas requiere condiciones fisicoquímicas estrictas utilizando diseños de modelos cinéticos. Entre las técnicas analíticas variadas, la espectrofotometría permite monitorear la densidad celular *in situ*, mientras que la cromatografía permite cuantificar la biomasa y metabolitos.

En este contexto, la presente investigación tiene como enfoque evaluar la producción de biomasa *in vitro* de la microalga *Chlorella spp.* en diferentes medios de cultivo, con el objetivo de comparar los rendimientos de cinética y perfil bioquímico para identificar la mejor producción de biomasa, generando así evidencia científica que contribuya a optimizar su rendimiento.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

En las últimas décadas, la biotecnología de microalgas ha tomado gran interés en la industria, dado que estas son una excelente fuente de biomoléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y otros compuestos bioactivos (Slocombe et al., 2013). Sin embargo, la producción eficiente de microalgas con valor agregado a bajo costo sigue representando un desafío, debido al costo de los medios de cultivos convencionales, indispensables para mantener un correcto metabolismo celular. Estudios previos han demostrado que medios de cultivo usados en la producción de microalgas a escala laboratorio puede llegar a costar 2,6 a 18,3 \$ por cada 1000 L (Colusse et al., 2020). Es por esto, que en el presente estudio se busca implementar fertilizantes foliares como medios de cultivo no convencionales para la producción de la microalga *Chlorella spp.*

1.2. Delimitación del problema

El presente trabajo de investigación se delimita en evaluar la producción de *Chlorella spp.* en fotobiorreactores cerrados a partir de diferentes medios de cultivos a escala laboratorio, con el fin de obtener la mayor concentración de biomasa y determinar la concentración de proteínas generadas. Los ensayos se realizarán en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo, intensidad lumínica y aireación, durante 7.5 días. No se efectúa el escalamiento del cultivo ni el análisis de la composición bioquímica del contenido microalgal, por lo que el alcance de esta investigación tiene a un enfoque experimental y de laboratorio.

1.3. Formulación del problema

¿Cómo implementar un medio de cultivo eficaz para la obtención de biomasa y proteínas de *Chlorella spp.* cultivadas en fotobiorreactores en condiciones controladas a escala laboratorio?

1.4. Preguntas de investigación

¿Qué medio de cultivo será el ideal para obtener una mayor concentración de biomasa y proteínas de *Chlorella spp.*?

¿Existen diferencias significativas de las tasas de crecimiento específicas de *Chlorella spp.* cultivadas en diferentes medios de cultivo?

¿Será ideal las condiciones proporcionadas en los diferentes cultivos de *Chorella spp.*?

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- ❖ Determinar la capacidad de producción de biomasa in vitro de la microalga *Chorella spp.* a partir de diferentes medios de cultivos.

1.5.2 Objetivos específicos

- ❖ Evaluar la eficacia de los diferentes medios de cultivo en el crecimiento de *Chlorella spp.* mediante densidad celular.
- ❖ Cuantificar la tasa de productividad de biomasa de *Chlorella spp.* a partir del peso seco.
- ❖ Establecer la concentración del contenido proteico de la biomasa de *Chlorella spp.* por medio de espectrofotometría.

1.6. Hipótesis

Existen diferencias significativas entre los medios de cultivos usados para la producción de biomasa y proteínas de *Chorella spp.* cultivadas en fotobiorreactores en condiciones controladas a escala laboratorio.

1.7. Justificación

El avance de la ciencia ha ofrecido soluciones innovadoras para la obtención de alimentos, compuestos bioactivos y materias primas de bajo costo (Ru et al., 2020). Entre las biofábricas usadas actualmente para la producción de estos compuestos se encuentran las microalgas, debido a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones, alta tasa de crecimiento y composición celular ya que posee un contenido de biomoléculas variado (Rendón et al., 2021).

Sin embargo, la producción de cultivos microalgales a gran escala genera un costo económico elevado debido a los diferentes nutrientes que requieren las microalgas (Colusse et al., 2020). Por otro lado, se han investigado alternativas para reemplazar estos cultivos tradicionales sin disminuir la calidad y productividad de la biomasa (Acien et al., 2013). Estudios previos han reportado que al usar fertilizantes NPK (nitrógeno-fósforo-potasio) como medio de cultivo en *Chorella vulgaris* se ha producido una concentración de $10,9 \pm 1,6 \times 10^6$ células/mL en comparación con un

el medio tradicional CHU₁₀ donde se generó $2,2 \pm 0,6 \times 10^6$ células/mL (Muñoz et al., 2011).

Es por esto que la presente investigación propone un enfoque experimental donde se busca evaluar el impacto de diferentes medios de cultivos en la producción de biomasa y proteínas de *Chorella spp.* en condiciones controladas de laboratorio. Así también, aprovecha recursos locales y conceptos básicos de la biotecnología para generar una propuesta innovadora y sostenible dando como resultado conocimientos científicos nuevos sobre el campo de la biotecnología de microalgas, que podrá ser usado para capacitar a los investigadores sobre el manejo y optimización del cultivo de microalgas en el contexto ecuatoriano.

1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)

Las variables empleadas en esta investigación para evaluar el impacto de diferentes medios de cultivos en la producción de biomasa de *Chorella spp.* se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Operacionalización de variables

Tipo de variable	Variable	Unidad de medida
Variable independiente	Medio de cultivo	Categorica
	Murashige y skoog: R1	
	Fertilizante NPK líquido: R2	
	Fertilizante NPL granulado: R4	
Variable dependiente	✓ Concentración celular	• Número de células/mL
	✓ Peso seco	• mg/mL
	✓ Productividad	• g/L/d
	✓ Concentración proteínas	• mg/L

Fuente: Autores

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Antecedentes Referenciales

Las microalgas son organismos fotosintéticos con un alto potencial para su uso en la academia y en la industria debido a sus aplicaciones en la generación de nutraceúticos, fármacos, energías limpias entre otras (Zuccaro et al., 2019) . Estos microorganismos se encuentran en diferentes hábitats tales como, mares, ríos y lagos, además de ambientes terrestres (Stoyneva-Gärtner et al., 2020). Es por esto que es de vital importancia determinar los nutrientes necesarios para cada especie, con el fin de potenciar su uso en la industria.

Machado et al. (2020), lograron optimizar la producción eficiente de biomasa de *Chlorella vulgaris* al usar medios de cultivos orgánicos obteniendo una productividad de $0.033 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en comparación con medios convencionales. Este resultado se da debido a que se satisface de manera adecuada las necesidades nutricionales para el crecimiento de microalgas. Así también, los fertilizantes empleados en estos medios pueden proporcionar macronutrientes como Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K) y micronutrientes como Manganeso (Mn), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Calcio (Ca) y Boro (B) importantes para un adecuado desarrollo de la célula (Kuo et al., 2023).

De manera similar, Ortiz et al. (2012) evaluaron medios convencionales, *Sueoka* y *Guillard* con un fertilizante NPK, en concentraciones de 1 a 5 g/L. Los resultados indicaron una concentración celular máxima de $86.5 \pm 0,75 \times 10^7$ células/mL de *Chlorella sorokiniana*, al implementar 1 g/L de fertilizante NPK, lo que muestra un rendimiento superior a los cultivos convencionales. Por consiguiente, estos estudios evidencian la eficiencia de los fertilizantes NPK en cultivos microalgales, incluso a bajas concentraciones.

No obstante, desde el área de la biotecnología ambiental se ha investigado el uso de aguas residuales enriquecida con fertilizantes NPK para el cultivo de microalgas, un ejemplo es el estudio de *C. vulgaris* realizado por Mtaki et al., (2021) donde se obtuvo una concentración máxima de biomasa seca de $2.85 \pm 0.015 \text{ g/L}$.

Por otro lado, se ha demostrado que cultivo que diferentes microalgas tales como *Ankistrodesmus gracilis* ha alcanzado niveles proteicos del 51 al 58 % con respecto al contenido celular, al emplear fertilizantes NPK como medio de cultivo (Sipaúba-Tavares et al., 2017). En contraste, estudios realizados por Silva (2016) en *Chlorella sorokiniana* revelaron que implementando fertilizantes NPK con adición de sulfato de magnesio (MgSO_4) mejoró significativamente, el contenido proteico, clorofila y la

productividad. Los hallazgos actuales indican que las microalgas son una fuente sostenible de proteínas, no solo porque emplea una superficie de cultivo mínima en comparación con fuentes convencionales, sino también, por su alto contenido y diversidad de aminoácidos de alta calidad para la nutrición humana (Sipaúba-Tavares et al., 2017).

Investigadores como García-Encinas et al. (2025) han recopilado información sobre estudios previos en *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris* donde se evidencia que presencia de todos los aminoácidos esenciales en su composición celular. Además, se observaron aminoácidos como metionina, lisina, valina, leucina e isoleucina en su composición lo que aporta un valor agregado como suplemento alimenticio.

En este contexto, se han implementado diferentes sistemas para el crecimiento de microalgas, entre los que se encuentran los abiertos (Raceway) y los cerrados (fotobiorreactores) (Zuccaro et al., 2019). De estos, los Fotobiorreactores son óptimos para el control de diversos parámetros tales como pH, temperatura, intensidad lumínica, fotoperíodo, concentración de nutrientes, suministro de CO₂, entre otros, esenciales para el crecimiento adecuado de cultivos microalgales (Aishvarya et al., 2015). Por otro lado, Maroneze et al. (2021) expresan que entre los modelos de sistemas cerrados se encuentran los modelos tubulares, de placa plana y los verticales, cada uno con sus características y propiedades en particular.

En cuanto a su eficiencia, se han evaluado diferentes estudios donde se ha comparado fotobiorreactores tubulares y de columna de burbujeo, encontrando que los primeros han tenido una mayor productividad de biomasa y eficiencia fotosintética lo que indica una ventaja al momento de elegir un sistema de producción celular (Serri et al., 2025). Sin embargo, los fotobiorreactores tubulares presentan desventajas con respecto a términos de costo, mantenimiento y escalabilidad por lo que se han investigado otros sistemas de cultivo más accesibles (Chanquia et al., 2022). Entre estos, se encuentran los reactores de bolsas de plástico, los cuales son atractivos a escala comercial debido a su costo y esterilidad, además, se han implementado diversos materiales económicos para la fabricación de estos fotobiorreactores, tales como bolsas de polietileno, tubos pvc, paneles de vidrio reutilizado, mangueras transparentes, entre otras (Wang et al., 2012; Yan et al., 2016)

Así también, investigadores como PAIVA et al. (2024) han evaluado la eficiencia de fotobiorreactores planos de vidrio translucido de bajo costo, dando como resultados una productividad de 0.25 g/L/día, por lo que podría significar una alternativa a los fotobiorreactores convencionales.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Microalgas

Son organismos que pertenecen a la familia de las eucariotas, presentan estructura unicelular lo que les permite realizar el proceso biológico conocido como fotosíntesis por tal motivo, su hábitat predominante es en ambientes acuáticos (Thoré et al., 2023).

Diversos estudios biotecnológicos han demostrado que las microalgas han cobrado relevancia por su capacidad de sintetizar compuestos de alto valor añadido como ácidos grasos poliinsaturados (Omega-3), pigmentos naturales (astaxantina, ficocianina), proteínas y biocombustibles (Merz et al., 2023).

Van Lenteren et al., (2020) sostiene que su crecimiento acelerado y eficiencia en relación a la fijación de CO₂ las posicionan como organismos que prometen abordar desafíos globales, brillando así dentro del campo de la seguridad alimentaria, dando en el cambio climático, por consecuente eso permite que exista una producción sostenible de energía.

2.2.1.1. Taxonomía

Las microalgas en su taxonomía presentan varios criterios de acuerdo a su morfología, pigmentos y su estructura celular. Según NCBI dentro de su base de datos, la taxonomía de *Chlorella spp.* se presenta a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Taxonomía de la *Chlorella spp.*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Chlorellaceae</i>
Genero	<i>Chlorella</i>
NCBI BLAST	<i>Algas verdes</i>

Fuente: Schoch y NCBI, (2020)

2.2.1.2. Clasificación

La diversidad taxonómica se ve presente dentro de la actividad metabólica, permitiendo que distintos metabolitos de interés industrial se adapten a condiciones ambientales de forma específica (Galvan y Rozas, 2013).

Diversos estudios comentan que la clasificación de microalgas depende de diversos criterios como la estructuración celular o de acuerdo a su composición pigmentaria (Merz et al., 2023). La diversidad de las microalgas se puede relacionar con una evolución adaptativa a los factores que se pueden presentar, por lo que se puede indicar que está presente en medio de ecosistemas acuáticos. Entre los grupos de microalgas más relevantes dentro de estudios se pueden mencionar en la Tabla 3.

Tabla 3. Tipos de microalgas

Especie	Nombre común	Concepto
<i>Chlorophyta</i>	Algas verdes	Contienen clorofilas a y b como pigmentos, permitiendo el almacenamiento de almidón. Es altamente utilizada en biotecnología.
<i>Bacillariophyta</i>	Diatomeas	Su estructura celular es de sílice o frústula. Contiene pigmentos como la clorofila c y fucoxantina siendo importantes en los ciclos biogeoquímicos.
<i>Cyanobacteria</i>	Cianobacterias	Pertenecen a la familia de las procariotas, producen ficobiliproteínas teniendo como función la fijación de nitrógeno atmosférico.
<i>Isochrysis galbana</i>	Microalga marina	Haptófita rica en ácido docosaheptaenoico por tal motivo son un alimento importante dentro del sector de la Acuicultura para la alimentación de larvas de moluscos.
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	Microalga extrema	Habita en nieves alpinas. Se caracteriza por su pigmentación de color roja debido a los carotenoides protegiéndose contra la radiación UV.

Fuente: Mercado-Reyes y Álvarez-Montero, (2022)

2.2.1.3. Condiciones ambientales

El crecimiento de las microalgas depende de factores abióticos optimizados según la especie que se quiere cultivar y producir mencionar (Van Lenteren et al., 2020). Entre los factores que están involucrados en la productividad de las microalgas se pueden mencionar:

- Luz: Condición fundamental y principal para el crecimiento de microalgas. La intensidad de luz varía entre especies; por ejemplo, *Nannochloropsis* necesita 100-200 μmol fotones/ m^2/s , *Spirulina* soporta hasta 500 μmol fotones/ m^2/s . La relación que puede existir entre la luz y oscuridad también son factores que intervienen en la eficiencia fotosintética.
- Temperatura: Importante para alcanzar la tasa de crecimiento óptima, este factor dependerá de la especie que se está produciendo; por ejemplo, las temperaturas que la especie *Chlorella vulgaris* crece es de 25-30°C, mientras que, si se refiere a las cepas que soportan bajas temperaturas como *Chlamydomonas raudensis*, crecen a 4°C. De forma general, si la temperatura supera los 35°C puede causar estrés térmico obstruyendo su crecimiento.
- Fotoperíodo: Regula procesos de fotosíntesis y circadianos en las microalgas. Pueden aplicarse como ciclos óptimos de 16:8 (luz:oscuridad) permitiendo que se expanda la división celular buscada. Es importante mencionar que los periodos prolongados aumentan la producción de lípidos.
- Intensidad lumínica: Corresponde a la radiación fotosintética que la microalga se somete, la tasa de crecimiento se incrementa cuando es expuesta entre 400 a 700 nm. Sin embargo, cuando la intensidad lumínica sobrepasa los límites se produce un estrés lumínico causando una fotoinhibición.
- Aireación y agitación: Estos factores permiten que la transferencia de gases y la homogenización tenga un papel importante dentro del crecimiento de las microalgas. En procesos como la aireación suministra CO_2 y remueve el O_2 disuelto, en comparación de la Agitación que evita que se produzca una sedimentación celular.

- pH y Salinidad: Las microalgas prefieren crecer en pH neutro a alcalino con una escala entre 7 a 9. Sin embargo, las diatomeas marinas pueden crecer en pH más altos. En relación a la salinidad óptima para aguas dulces van desde 0-5 PSU y en las especies marinas entre los rangos de 30 a 35 PSU.

2.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo deben proporcionar macro y micronutrientes esenciales. Para las microalgas, los medios de cultivo son soluciones acuosas que contienen nutrientes fundamentales para el desarrollo de las microalgas. Cada medio de cultivo dependerá de acuerdo a las necesidades metabólicas de cada microalga y su objetivo para la preparación como la producción de pigmentos, biomasa, lípidos. Entre los más utilizados dentro del campo biotecnológico destacan los mencionados en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición y optimización de los medios de cultivo

Medio de cultivo	Finalidad	Contenido
Medio BG-11	<i>Cyanobacterias (Spirulina)</i>	Nitrato, fosfato y hierro quelado.
Medio F/2	<i>Diatomeas marinas</i>	Silicio para diatomeas.
Medio Zarrouk	<i>Arthrospira</i>	Alta concentración de bicarbonato.
Tap	<i>Chlamydomonas</i>	Acetato y solución Hofner

Fuente: Salbitani y Carfagna, (2021)

2.2.3. Componentes esenciales

Según Thoré et al. (2023) las microalgas son una fuente rica tanto de macronutrientes como de micronutrientes, lo que las hace valiosas para aplicaciones en nutrición humana, biotecnología y agricultura. Su capacidad para sintetizar una amplia gama de nutrientes esenciales las posiciona como un recurso prometedor para el futuro.

2.2.3.1. Macronutrientes

Son elementos esenciales que nutren organismos en grandes cantidades para obtener energía permitiendo que las funciones vitales se efectúen. Son fundamentales para el crecimiento y la producción de biomasa en microalgas. Proveen la energía necesaria y los bloques de construcción para las células. En el contexto de las microalgas, los macronutrientes incluyen carbohidratos, proteínas y lípidos (Matthewman y Costa-Pinto, 2023).

- Carbohidratos: Proveen energía y son componentes estructurales en las microalgas.
- Proteínas: Son esenciales para el crecimiento y la reparación celular. Las microalgas como *Chlorella* y *Arthrospira* son conocidas por su alto contenido proteico.
- Lípidos: Incluyen ácidos grasos esenciales y son importantes para la estructura de las membranas celulares y la producción de energía. Microalgas como *Dunaliella salina* tienen un alto contenido de lípidos.

2.2.3.2. Micronutrientes

Son nutrientes que el organismo requiere en cantidades mucho menores, pero son esenciales para el correcto funcionamiento metabólico y fisiológico. Aunque se necesitan en menores cantidades, son cruciales para la activación de enzimas, la síntesis de ADN y la protección antioxidante. En las microalgas, los micronutrientes incluyen vitaminas y minerales (Bello et al., 2021).

- Vitaminas: Las microalgas pueden sintetizar varias vitaminas, incluyendo B1 (tiamina), B7 (biotina), B12 (cobalamina), C, E y β -carotenos (precursores de la vitamina A).
- Minerales: Incluyen elementos como hierro, zinc, magnesio y potasio, que son esenciales para diversas funciones biológicas y metabólicas.

2.2.4. Biorreactores

Se componen de sistemas fabricados específicamente en el control de microalgas, teniendo presente factores como la iluminación, suministro de nutrientes y la transferencia de gases permitiendo un total control de condiciones ambientales, estos efectos reducen el riesgo de contaminación

cruzada por otros m.o. y aumentan la productividad de la biomasa (Singh y Dhar, 2011).

2.2.4.1. Sistemas Abiertos

- Estanques de carrera: Son económicos y fáciles de mantener, pero tienen baja productividad y son susceptibles a la contaminación (Cadena Ramírez et al., 2024).
- Estanques circulares: Utilizados principalmente para la producción comercial, aunque presentan desafíos en el control de condiciones óptimas de crecimiento (Singh y Dhar, 2011).

2.2.4.2. Sistemas Cerrados

- Tubulares: Ofrecen un control preciso de las condiciones ambientales y minimizan la contaminación, pero son costosos y enfrentan problemas de escalabilidad (Ramachandran et al., 2016).
- Columnas verticales: Son eficientes para la captura de CO₂ y tienen un buen rendimiento en la utilización de gases industriales (Laamanen y Scott, 2020).
- Paneles planos: Permiten una alta productividad de biomasa y un control preciso de las condiciones de cultivo (Santos-Sánchez et al., 2016).

2.2.4.3. Ventajas y desafíos de implementación

Algunas investigaciones mencionan que las ventajas de los fotobiorreactores son varias debido a que puede existir un control ambiental en la luz, temperatura, pH y nutrientes teniendo como resultado una mayor productividad de biomasa (Ramachandran et al., 2016).

Otros comentan que existe una reducción de contaminación en comparación a otros sistemas. Sin embargo, los costos elevados, la escalabilidad, consumo de energía y el mantenimiento constante para poder asegurar condiciones óptimas de crecimiento (V. Singh y Mishra, 2023).

De acuerdo a la clasificación de los biorreactores, en la Tabla 5 se detalla un cuadro comparativo para una mejor comprensión.

Tabla 5. Clasificación de biorreactores

Biorreactor	Ventajas		Desafíos
Estanques de carrera	Bajo costo,	fácil mantenimiento.	Baja productividad, alta contaminación ^a
Tubulares	Alta productividad,	control ambiental	Costosos, problemas de escalabilidad ^b
Columnas verticales	Buen rendimiento en gases industriales		Costosos, mantenimiento ^c

Fuente: Singh y Dhar, (2011)^a; Ramachandran et al., (2016)^b; Zarei et al., (2024)^c

2.2.5. Fases de crecimiento

Las microalgas pasan por diferentes fases de crecimiento esenciales para su óptimo desarrollo y producción de biomasa y metabolitos (Liao et al., 2018). Entre las principales fases de crecimiento para las microalgas se mencionan a la fase de adaptación, exponencial, estacionaria y muerte.

2.2.5.1. Fase de adaptación

Conocida también como fase de retraso, las microalgas se adaptan a las nuevas condiciones del medio de cultivo al cual fueron inoculadas. No presentan crecimiento significativo en relación a la biomasa debido a que las células están ajustando su metabolismo para prepararse en la división celular (Kundu et al., 2018).

2.2.5.2. Fase exponencial

La fase log, experimentan un crecimiento rápido y sobre todo constante. La tasa de división celular alcanza su máximo pico y la biomasa aumenta de forma exponencial. Esta fase es crucial para que la producción de biomasa aumente y su actividad metabólica aumente (Thomas et al., 2023).

2.2.5.3. Fase estacionaria

El crecimiento de las microalgas se estabiliza debido a la limitación de nutrientes o acumulación de productos de secado. Aunque la biomasa no aumenta significativamente, las microalgas pueden acumular metabolitos como lípidos, especialmente bajo condiciones de estrés nutricional (Demir-Yilmaz et al., 2023).

2.2.5.4. Fase de muerte

Finalmente, en la fase de muerte, las células comienzan a morir debido a la falta de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. La biomasa disminuye y la viabilidad celular se reduce (Kundu et al., 2018).

2.2.6. Factores que afectan las fases de crecimiento

En investigaciones se presentan factores que pueden ser la principal causa para impactar el crecimiento de las microalgas, si existe alguna modificación en los nutrientes puede inducir la fase estacionaria y aumentar la producción de lípidos (Tang et al., 2023).

En el caso de la intensidad y la duración de la luz, estos factores afectan significativamente la tasa de crecimiento y la productividad de la biomasa. Diferentes especies de microalgas responden de manera distinta a las condiciones de iluminación (Anyanwu et al., 2022).

2.2.7. Estrategias de cultivo

Dentro de las estrategias para poder optimizar la producción de biomasa y metabolitos, se utilizan diferentes estrategias de cultivos como, por ejemplo, cultivo en dos etapas y cultivo continuo. Aziz et al. (2020) argumentan que, en los cultivos por etapas, la primera etapa, se proporcionan condiciones óptimas para el crecimiento celular. En la segunda etapa, se inducen condiciones de estrés para maximizar la acumulación de metabolitos deseados, como lípidos.

En los cultivos continuos, las microalgas se cultivan continuamente en condiciones controladas, ajustando factores como la luz, el carbono y los nutrientes para mantener un crecimiento equilibrado y maximizar la productividad (Marsullo et al., 2015).

2.2.8. Tasa de crecimiento específica

Es un parámetro crucial para comprender y optimizar los cultivos de microalgas. Puede variar significativamente según la especie y las condiciones ambientales. La tasa de crecimiento se ve influenciada por múltiples factores. A continuación, se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores que influyen en la tasa de crecimiento específico

Tipos	Afectan
Concentración de CO ₂	Las concentraciones óptimas de CO ₂ para un SGR alto oscilan entre el 5% y el 15%.
Intensidad de la luz	La SGR aumenta con la intensidad de la luz, con rangos óptimos de 45 a 480 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$
Columnas verticales	Las concentraciones de nitrógeno más altas (0-700 mg/L) también se correlacionan con un mayor SGR.
Temperatura	Diferentes especies tienen diferentes temperaturas óptimas, pero generalmente, la SGR aumenta con la temperatura hasta cierto punto antes de disminuir.
Salinidad	Para algunas especies como <i>Botryococcus spp.</i> el crecimiento óptimo ocurre a una salinidad de 0 M.

Fuente Darvehei et al., (2018)

2.2.9. Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación, también conocido como tiempo de generación, es el período necesario para que una población de células se duplique en número. En el contexto de las microalgas, este tiempo es crucial para evaluar la eficiencia del crecimiento y la productividad de biomasa (Dasan et al., 2019).

Además, indica que el tiempo de duplicación es un indicador clave de la tasa de crecimiento de las microalgas. Un tiempo de duplicación corto indica un crecimiento rápido, lo que es deseable en aplicaciones industriales y biotecnológicas (Maharani et al., 2020).

El modelado de crecimiento también forma parte fundamental en el crecimiento de las microalgas en diferentes condiciones, esto permitirá predecir la producción de biomasa a escalas industriales. Sin embargo, el modelado de crecimiento dependerá de las diferentes especies de microalgas, algunas pueden duplicarse en menos de 24 horas, mientras que otras pueden tardar varios días (Ning et al., 2014).

2.2.10. Biomasa

Se refiere a la materia orgánica producida por microalgas, que son microorganismos fotosintéticos capaces de convertir dióxido de carbono, nutrientes y energía solar en biomasa y oxígeno. Esta biomasa es de gran interés debido a su potencial para aplicaciones sostenibles en diversas industrias, especialmente en la producción de bioenergía y bioproductos de alto valor añadido (Ilvitskaya y Chistyakova, 2020).

2.2.10.1. Características

Las microalgas tienen una alta tasa de crecimiento y pueden cultivarse en diversas condiciones, incluyendo el uso de aguas residuales y terrenos no fértiles, lo que las hace una fuente de biomasa muy flexible y sostenible (Barla et al., 2023).

Estudios han revelado que la biomasa de microalgas es rica en lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y otros compuestos bioactivos, lo que permite su uso en la producción de biocombustibles (biodiésel, bioetanol, biogás) y productos de alto valor como nutraceuticos, cosméticos y aditivos alimentarios (Singh et al., 2024).

Es importante mencionar que las microalgas son eficientes en la captura de dióxido de carbono, contribuyendo a la mitigación del cambio climático al transformar CO₂ en O₂ (Choi et al., 2019).

2.3. Marco Teórico

Los cultivos microalgales han tomado un interés protagónico en la industria biotecnológica debido al alto contenido de compuestos de valor agregado (Slocombe et al., 2013). Entre los géneros más usados se encuentran *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Tetraselmis*, *Monochrysis*, entre otros, debido a que poseen un alto valor nutricional, eficiencia fotosintética, capacidad para adaptarse a diferentes condiciones y alta tasa de crecimiento (Gamal y Shreadah, 2024).

Medios de cultivos convencionales como BG-11, CHU10, Zarrouk, f/2 (guillard) y Conway proporcionan los nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento microalgal, sin embargo, la implantación de estos medios a gran escala representa un costo económico alto (Madkour et al., 2012; Calvo et al., 2024; Marousek et al., 2024).

Investigadores como Fils et al. (2022) han estudiado el comportamiento del crecimiento de microalgas ante fertilizantes NPK como medios de cultivo, una alternativa económica a los medios convencionales. El fundamento teórico radica en que estos proporcionan tres macronutrientes: Nitrógeno(N), Fósforo(P) y Potasio (K), esenciales para el crecimiento de las células, ya que participan en síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos. Además, dependiendo de su formulación, pueden incluir micronutrientes como manganeso (Mn), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Calcio (Ca) y Boro (B) (Kuo et al., 2023).

Las fuentes de N de estos fertilizantes pueden variar dependiendo la formulación específica del producto (Verma et al., 2023). Entre las fuentes comúnmente empleadas se encuentra: nitratos, amonio y urea, las cuales pueden ser asimiladas por las células, aunque su absorción dependerá del tipo de especie microalgal (Altin et al., 2018; Lathifah et al., 2021). En un estudio realizado por Rosa et al. (2023) se observó que *Chlamydomonas reinhardtii* asimila de forma óptima la urea como fuente de N en comparación al amonio. Así también, investigadores como Ahmad y Hellebust (1984) observaron que existen microalgas como *Chlorella autotrophica* que pueden asimilar diferentes fuentes de nitrógeno, tales como: nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y urea.

A pesar de que el amonio en altas concentraciones es tóxico para diferentes microalgas, existen especies, como *Chlorella vulgaris* que pueden asimilar dichas moléculas, esto puede deberse a que su asimilación requiere menos energía (Salbitani y Carfagna, 2021). Por otro lado, en investigaciones donde se empleó nitritos y nitratos como fuentes de Nitrógeno, *Chlorella vulgaris* mostró una mayor absorción por de NO_3^- (Pozzobon et al., 2021).

Xiang et al. (2021) expresan que la asimilación de esta fuente de nitrógeno se debe por la presencia de la enzima nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato en nitrito para posteriormente ser llevado al cloroplasto y transformarlo en amonio por acción del nitrito reductasa y finalmente el amonio generado se incorpora a través del ciclo GS/GOAT a la célula.

Por lo contrario, la asimilación de urea se puede dar a partir de diferentes enzimas como la ureasa o la urea aminoliasa, las cuales transforman la molécula en amoniaco y dióxido de carbono, para poder ser reincorporado al metabolismo celular (Liang et al., 2024; Veaudor et al., 2019).

En cuanto al Fósforo y Potasio, que también son macronutrientes esenciales para el crecimiento y metabolismo celular, diversos estudios informan que el Fósforo puede ser asimilado en forma de ortofosfato inorgánico (Pi) o como Fósforo orgánico disuelto (Fu et al., 2019; Wu et al., 2021). Así también, las moléculas de Potasio ingresan a la célula mediante iones K^+ que se obtienen a partir de Nitrato de Potasio, Fosfato monopotásico o Fosfato dipotásico (Zuccaro et al., 2019; Calvo et al., 2024).

En este contexto, para determinar la eficiencia de los medios de cultivo en el crecimiento de cultivos microalgales se emplean diversos métodos que evalúan la proliferación celular y la producción de biomasa, entre estos se encuentran la cámara de Neubauer y la citometría de flujo (Carbonell et al., 2024).

Por otro lado, métodos indirectos como la densidad óptica a 680 nm medida mediante espectrofotometría UV-visible y el peso seco también han sido empleados para evaluar la concentración de biomasa generada en cultivos microalgales (Alejos et al., 2023). El uso de un método adecuado dependerá de los objetivos del estudio, precisión requerida y los recursos disponibles.

Investigadores como Sipaúba-Tavares et al. (2017) han determinado que una correcta formulación de nutrientes en diferentes medios de cultivos, no solo favorecen el crecimiento de las células, sino también, la producción de compuestos proteicos. Estudios realizados en *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris* han dado concentraciones de 82 y 72 % de contenido proteico respectivamente, de los cuales se observaron péptidos con alta actividad antioxidantes (Masoumifeshani et al., 2025). Esto se debe a que los genes encargados del metabolismo proteico se expresan al existir una correcta concentración y fuente de nitrógeno (Saini et al., 2020).

Entre los métodos empleados para determinar la concentración proteica se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), métodos espectrofotométricos UV-Vis (Bradford, Lowry), método Kjeldahl, entre otros (Navarro-Tapia et al., 2024). Entre estos, los métodos espectrofotométricos son los más empleados, debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo (Benjamin, 2023).

Investigadores como Arredondo y Voltolina (2007) han empleado el método de Lowry para la cuantificación de proteínas, empleando una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón y midiendo a una absorbancia de muestras a 750 nm. Siendo ideal para una evaluación rápida y efectiva del contenido de proteínas en microalgas.

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias e Ingenierías (FACI) de la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI). Se determinó como un estudio de tipo experimental ya que se evaluó el crecimiento de *Chlorella spp.* proveniente de Cuicocha (Cotachi, Ecuador) sometida a diferentes medios de cultivos.

El diseño experimental fue completamente al azar, con 3 réplicas por cada tratamiento, dando un total de 12 unidades experimentales. Se evaluó las siguientes variables: Concentración Celular (N° células/mL), Peso seco, Productividad y concentración proteica, por fotobiorreactor.

3.2. La población y la muestra

La población del estudio estuvo conformada por cultivos de *Chlorella spp.* sometidas a condiciones controladas de laboratorio durante el tiempo de la fase experimental, como se describe en la Tabla 7. Por otro lado, la muestra estuvo constituida por inóculos de *Chlorella spp.* usados en cada unidad experimental.

Tabla 7. Condiciones controladas de laboratorio

Variables	Valores
Temperatura	28-30 °C
Fotoperíodo	12:12 h (Luz/oscuridad)
pH inicial	7
Intensidad lumínica	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fuente Metsoviti et al., (2020); Suparmaniam et al., (2020); Rendón et al., (2021); Grande et al., (2023)

3.3. Los métodos y las técnicas

3.3.1. Preparación del Inóculo

Para obtener el inóculo de *Chlorella spp.* se hizo un raspado a cuatro cajas Petri con células microalgales. La biomasa obtenida se mezcló con medio Murashige y Skoog (MS) en un fotobiorreactor de 500 mL de capacidad, usando 350 mL del volumen final. Posteriormente, el cultivo se cosechó empleando la metodología de Merz et al (2023) cuando el inoculo alcanza una absorbancia a 680nm de 0.8.

3.3.2. Medios de cultivo

Para determinar cuál es el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Chlorella spp.*, se empleó el medio comercial Murashige y Skoog (MS) como control y como tratamientos se usó tres fertilizantes comerciales NPK: dos en presentación líquida y uno granular.

Para la formulación del control se pesó 4.43 g del MS por 1 L de agua destilada. Así también, se usó un 1 mL de cada fertilizante empleado en el T1 y T2 por litro de agua destilada, en cuanto al T3 se pesó 0.5 g del fertilizante foliar por cada litro de agua destilada. Cada tratamiento fue enriquecido con MgSO_4 , ZnSO_4 y Na_2EDTA , según las formulaciones de cada medio tal como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición de cada medio de cultivo

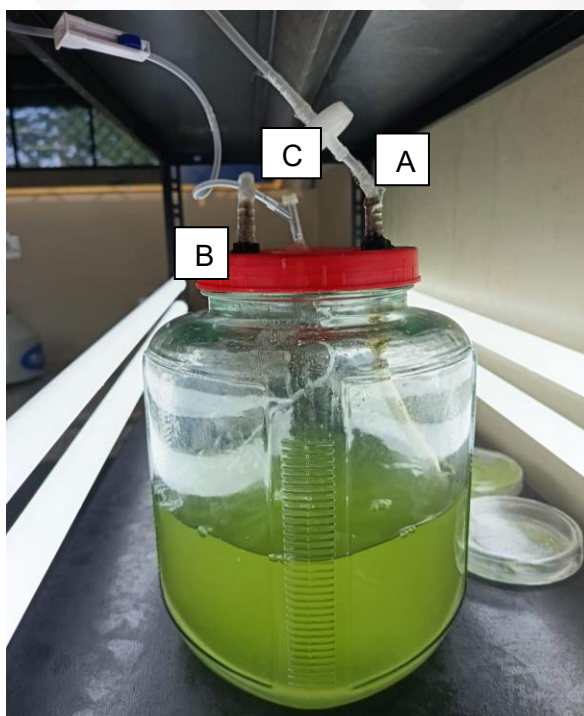
Composición química	R1		R2		R3		R4
	g/L		%		%		%
NH ₄ NO ₃	1.65	N	7.77	N	10	NH ₄ -N	7
KNO ₃	1.9	P ₂ O ₅	9.98	P ₂ O ₅	4	NO ₃ -N	5
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.037	K ₂ O	8.33	K ₂ O	7	P ₂ O ₅	8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.027	Mn	0.01	Fe	0.02	KO	16
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5 x10 ⁻⁵	Zn	0.01	Mn	0.01	MgO	3
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5 x10 ⁻⁵	Acido húmico	0.59	Cu	0.002	S	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.5 x10 ⁻⁴	Auxinas	5.20	B	0.01	B	0.02
			ppm				
MnSO ₄ .H ₂ O	1.69x10 ⁻²	Giberelinas	0.36			Fe	0.02
			ppm				
IK	8.3 x10 ⁻⁴	Citoquininas	210			Zn	0.010
			ppm				
H ₃ BO ₃	6.2 x10 ⁻³						
CaCl ₂ .H ₂ O	0.33		g/L		g/L		g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78 x10 ⁻²	MgSO ₄ .H ₂ O	0.1		0.1		
MgSO ₄ .H ₂ O	0.18	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.037		0.037		0.037
KH ₂ PO ₄	0.17	ZnSO ₄ .7H ₂ O			3.2x10 ⁻³		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6x10 ⁻³						
Glicina	2 x10 ⁻³						
myo-Inositol	0.1						
Acido nicotínico	5 x10 ⁻⁴						
Pyridoxina.HCl	5 x10 ⁻⁴						
Tiamina.HCl	1 x10 ⁻⁴						

Nota. Tratamientos: Murashige Skoog (R1); Fertilizante NPK (R2); Fertilizante NPK (R3); Fertilizante NPK (R4).

3.3.3. Diseño de fotobiorreactor

La unidad experimental estuvo compuesta por frascos de vidrios de 5 L de capacidad (fotobiorreactores) incorporando solo 2 L de medio de cultivo, donde 1.8 L fue el medio y 0.2 L el inóculo de *Chlorella spp.* Cada biorreactor estuvo conformado por tres componentes funcionales: i) una entrada de aire, conectada a un filtro micropore de membrana de 0.22 µm de poro; ii) una salida de aire para el intercambio de gases; iii) y una unidad para la toma de muestra, integrada por un equipo de venoclisis y una válvula de regulación para impedir la salida del medio después de la toma de la muestra, tal como se observa en la Figura 1.

Figura 1.



Nota. Componentes fundamentales del Fotobiorreactor: A) Entrada de aire; B) Salida de aire; C) toma de muestra.

3.3.4. Determinación de la concentración celular

Para determinar la concentración celular se tomó 1 mL de muestra, la cual se agitó vigorosamente de dos a tres veces para su homogenización, posteriormente, se usó 10 μ L para su conteo en la cámara de Neubauer.

El conteo celular se realizó usando un microscopio óptico con el objetivo 40X y se empleó la fórmula descrita por (Arredondo et al., 2017) para determinar el número de células / mL. Cada conteo se realizó dos veces al día por triplicado, por un periodo de 7.5 días.

$$C = N * 10^4 * dil$$

En donde:

C = cel/mL

N = promedio de células presentes en 1 mm²

dil = Factor de dilución (en caso de ser necesario diluir la muestra).

10⁴ = factor de conversión de 0.1 μ L a 1 mL.

3.3.5. Determinación del peso seco y productividad

Se empleo una membrana de fibra de vidrio AP40, previamente tratada con 20 mL de agua destilada usando una bomba al vacío y posteriormente llevada a una estufa a 115 °C por 2 horas. El filtro tratado se llevó a un desecador durante 1.5 horas para ser pesado después en una balanza analítica. A continuación, se procedió a filtrar 1 mL de la muestra a través de la membrana tratada y usando la bomba al vacío. El procedimiento de secado y pesado fue el mismo de la membrana sin muestra. Finalmente, el peso seco se determinó usando la siguiente ecuación:

$$PST \left(\mu \frac{g}{mL} \right) = \frac{(PSFM - PSF)}{VF}$$

En donde:

PST = peso seco total

PSFM = peso seco del filtro con muestra

PSF = peso seco del filtro sin muestra

VF = volumen de la muestra filtrada

Cada toma de muestra se realizó dos veces al día (en la mañana y en la tarde) y cada una fue procesada por triplicado. Por otro lado, la productividad se determinará usando la siguiente fórmula empleada por Aguilar et al., (2020).

$$P_b = \frac{X_f - X_i}{\Delta T}$$

Donde:

P_b = Productividad de biomasa (generalmente expresada en g/L/día o mg/L/día).

X_f = Peso seco final de la biomasa (g/L o mg/L).

X_i = Peso seco inicial de la biomasa (g/L o mg/L).

Δt = Tiempo de cultivo transcurrido (en días o en horas).

3.3.6. Cuantificación de Proteínas

Se siguió la metodología empleada por Flores y Ruiz, (2017) donde se usó 5 mg de microalga seca y pulverizada y se le añadió 5 mL de NaOH a 0.1 N, para posteriormente ser llevado a un baño térmico por 30 min a 80 °C, seguido de la

centrifugación a 3500 rpm a 4°C. Una vez terminado este proceso se extrajo 200 µL del sobrenadante para su posterior análisis proteico.

Para la cuantificación de proteína total y soluble se empleó el método de Hartree-Lowry donde añadió al extracto alcalino (sobrenadante) 0.9 mL del reactivo A (hidróxido de sodio 0,5 N, carbonato de sodio Anhidro 10 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,2 %), para después ser llevado a un baño térmico por 10 minutos a 50 °C. Posteriormente, se añadió 0.1 mL del reactivo B (Hidróxido de Sodio 0,1 N, sulfato de cobre pentahidratado 1 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2 %) y 3 mL del reactivo C (Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteau: Agua 2:15 v/v) (Flores y Ruiz, 2017).

Finalmente se realizó la lectura en un espectrofotómetro UV-Visible (Jenway 6705 UV/Vis) a una absorbancia de 650 nm. Para la curva de calibración se pesó 30 mg de albúmina de suero bovino (BSA) y se aforó con agua ultrapura, hasta llegar a una concentración de 600 µg/mL. A partir de esta solución se generaron varios analitos con las siguientes concentraciones: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 µg/mL para su posterior lectura a 650 nm y así generar la curva de calibración.

Finalmente, para determinar el porcentaje de recuperación se empleó la siguiente ecuación (Arredondo et al., (2017).

$$\%Proteinas = \frac{\left[\frac{m * A_{650nm}}{Vm} \right] * Ve}{Ps} * 100$$

Donde:

m = pendiente de la recta

Vm = volumen de la alícuota calculada

Ve = volumen del extracto alcalino

A650nm = Absorbancia

Ps = peso seco

3.3.7. Análisis de los Resultados

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el Software estadístico R (versión 4.3.2). En primera instancia, se evaluó la distribución de normalidad de las variables cuantitativas (peso seco, proteína soluble y proteína total) mediante la prueba de Shapiro-Wilk, tomando como criterio un valor de $p < 0.05$ para rechazar la hipótesis de normalidad. Para aquellas variables que no presentaron una distribución normal,

se aplicaron pruebas no paramétricas como la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de identificar diferencias significativas entre tratamientos.

En cambio, cuando los datos cumplieron con los supuestos de normalidad, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba post hoc de comparación de medias para determinar las diferencias entre grupos. Asimismo, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para establecer la relación entre el tiempo de cultivo y la acumulación de biomasa en cada reactor.

Finalmente, los resultados fueron representados gráficamente mediante diagramas de dispersión y curvas de crecimiento, lo que permitió una interpretación integral de los patrones observados en los tratamientos evaluados.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Dinámica de crecimiento microbiano

En cumplimiento del primer objetivo, que consistió en evaluar la cinética de crecimiento microbiano en condiciones controladas de laboratorio, se establecieron cuatro tratamientos (R1, R2, R3 y R4) en sistemas de reactor, y se monitoreó el crecimiento celular mediante conteo directo a lo largo de 7.5 días. Tal como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. *Promedios de crecimiento*

	R1	R 2	R 3	R 4
Time	Average	Average	Average	Average
0,00	8,00E+05	9,00E+05	1,00E+06	1,0E+06
0,50	1,03E+06	1,17E+06	1,20E+06	1,4E+06
1,00	1,13E+06	1,30E+06	1,37E+06	1,5E+06
1,50	1,37E+06	1,43E+06	1,43E+06	1,7E+06
2,00	1,51E+06	1,83E+06	1,77E+06	1,8E+06
2,50	2,42E+06	2,39E+06	2,44E+06	2,4E+06
3,00	3,62E+06	3,65E+06	3,62E+06	3,7E+06
3,50	5,11E+06	5,12E+06	5,09E+06	5,1E+06
4,00	6,51E+06	6,55E+06	6,55E+06	6,5E+06
4,50	7,78E+06	7,76E+06	7,76E+06	7,8E+06
5,50	8,67E+06	8,69E+06	8,70E+06	8,7E+06
5,00	9,31E+06	9,77E+06	9,28E+06	9,3E+06
6,50	9,62E+06	1,08E+07	9,65E+06	9,7E+06
6,00	9,83E+06	1,19E+07	9,87E+06	9,7E+06
7,00	9,91E+06	1,30E+07	9,92E+06	1,0E+07
7,50	1,01E+07	1,40E+07	1,01E+07	1,35E+07

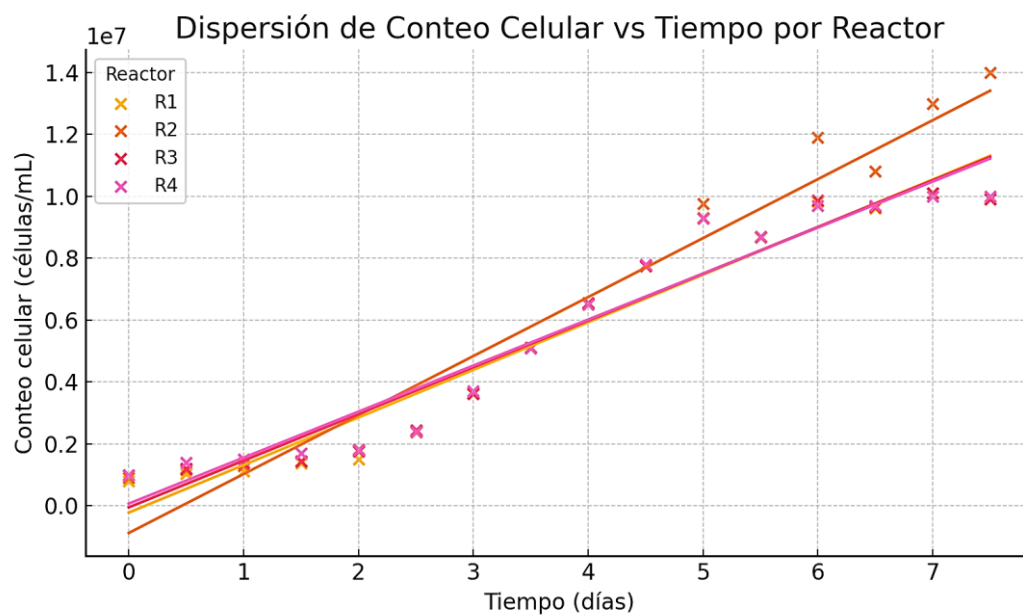
Nota. Los valores expresados corresponden al promedio del conteo celular (células/mL) obtenido en cada reactor durante el periodo experimental de 7,5 días. El conteo fue realizado mediante métodos estándar de hemocitometría directa a intervalos de 12 horas.

Los datos obtenidos mostraron un comportamiento sigmoideal característico, con fases lag, logarítmica y estacionaria claramente diferenciadas. Los tratamientos R2 y R4 presentaron una mayor tasa de crecimiento, alcanzando valores superiores a 1.3×10^7 cel/mL al final del experimento y una productividad de 0.4 y 0.36 g/L/día. En contraste, el tratamiento R1 mostró un crecimiento más lento, con una población máxima de 1.0×10^7 cel/mL y una productividad de 0.16 g/L/día. La Figura 2 correspondiente evidencia las diferencias en las tasas de crecimiento por tratamiento.

Este comportamiento es consistente con las tasas de crecimiento estimadas, que se encuentran entre 0,34 y 0,40 d^{-1} . Las diferencias observadas entre tratamientos sugieren una posible influencia de las condiciones de cultivo específicas de cada sistema.

El siguiente gráfico representa la evolución del conteo celular en cada reactor a lo largo del tiempo. Se observa una tendencia creciente con pequeñas variaciones entre tratamientos.

Figura 2. Gráfica de dispersión celular



Nota. Las cifras están redondeadas a dos cifras significativas en notación científica para facilitar la comparación entre tratamientos. Se observa un comportamiento exponencial en la fase de crecimiento entre los días 2 y 5, con estabilización hacia el día 7, especialmente en los reactores 1, 3 y 4, mientras que el reactor 2 mostró un crecimiento continuo más acentuado.

4.2. Comportamiento del crecimiento celular en función del tiempo

El conteo celular promedio (células/mL) fue evaluado en cuatro reactores (R1 a R4) durante un periodo de 7.5 días. La evolución del crecimiento mostró una tendencia exponencial hasta alcanzar una fase estacionaria cercana al día 7.

El conteo celular y el peso seco por reactor reveló una alta correlación positiva significativa ($p < 0.001$) tal como se observa en la Tabla 10 y en la Tabla 11.

Tabla 10. *Correlación de Pearson crecimiento celular*

Reactor	Coefficiente r	Valor-p
R1	0.9677	0.0000
R2	0.9763	0.0000
R3	0.9673	0.0000
R4	0.9678	0.0000

Nota. Esto indica que el crecimiento celular fue progresivo y fuertemente dependiente del tiempo en todos los tratamientos.

Tabla 11. *Análisis Pearson aplicada al peso seco*

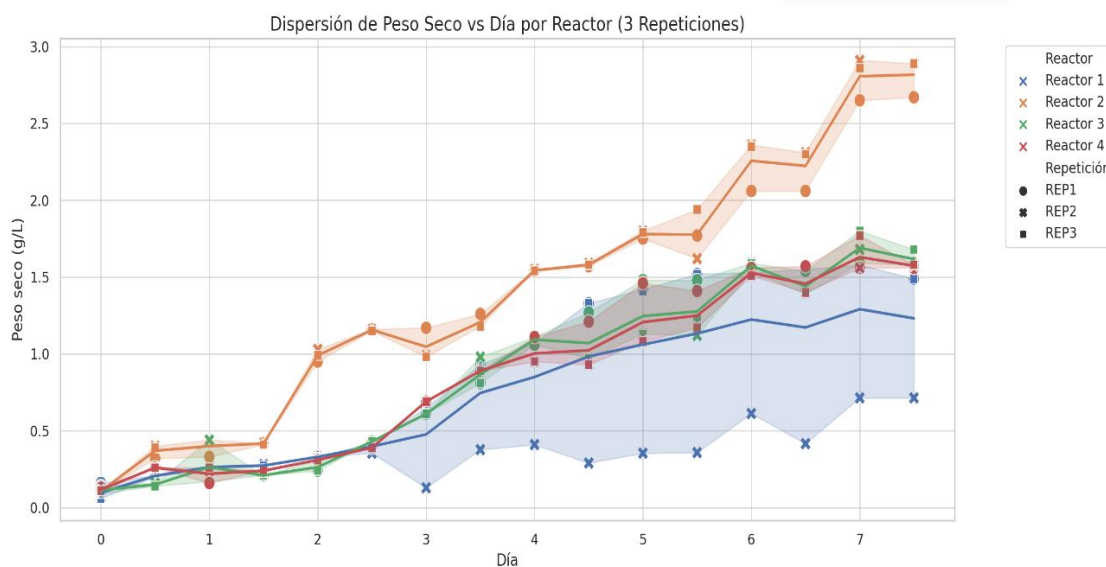
Reactor	r (Peso seco vs Día)	Valor-p
R1	0.7628	0.0000
R2	0.9809	0.0000
R3	0.9693	0.0000
R4	0.9721	0.0000

Nota. Los resultados sugieren una correlación alta entre tiempo y producción de biomasa, lo que valida la metodología experimental.

4.3. Evolución del peso seco

El peso seco (g/L) fue determinado en tres repeticiones experimentales por cada reactor y cada día de muestreo. Se observó un patrón de incremento del peso en concordancia con el aumento del conteo celular, aunque con variabilidad entre repeticiones como se observa en la figura 3.

Figura 3. *Peso seco x día*



Nota. Tasa de crecimiento, generación de biomasa congruente con el peso seco

La prueba de *Kruskal-Wallis* aplicada al peso seco entre los cuatro reactores arrojó los siguientes resultados:

Estadístico H (Kruskal-Wallis): 29.46

Valor-p: 1.79×10^{-6}

El valor-p es significativamente menor que 0.05, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de peso seco entre al menos dos de los reactores. Dado que los datos no cumplían con la normalidad (según la prueba de Shapiro-Wilk), este análisis no paramétrico es el más adecuado, como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Normalidad Shapiro-Wilk

Reactor	Estadístico W	Valor-p
R1	0.8361	0.0000
R2	0.9489	0.0362
R3	0.8963	0.0005
R4	0.8936	0.0004

Nota. Esto sugiere que la mayoría de las distribuciones del peso seco no siguen una normalidad estadística, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas

4.4. Análisis de la Producción de Proteína

Como parte del objetivo de evaluar la capacidad biosintética de las microalgas en función de los tratamientos aplicados, se procedió al análisis de proteína tanto soluble como total, utilizando muestras tomadas en el día 5, correspondiente a la fase logarítmica del cultivo. Se empleó el método colorimétrico de Lowry para cuantificar la proteína soluble en el sobrenadante, mientras que la proteína total fue estimada con base en el peso seco de las biomásas.

4.4.1. Contenido de Proteína Soluble (mg/L)

Los resultados obtenidos del análisis de proteína soluble evidenciaron diferencias en los valores entre tratamientos. El tratamiento **R2** presentó el mayor valor promedio (16,59 mg/L), seguido de **R3** (12,81 mg/L), **R4** (12,76 mg/L) y **R1** (11,07 mg/L). Sin embargo, la prueba de normalidad Shapiro-Wilk reveló que no todos los grupos presentaban una distribución normal ($W = 0.7528$, $p = 0.0061$ para MS), por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual no mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($H = 4.876$, $p = 0.1811$) Tabla 13.

Tabla 13. Prueba de normalidad proteína (Shapiro-Wilk)

Tratamiento	Estadístico W	Valor p
R1	0.7528	0.0061
R2	0.9726	0.6825
R3	0.9953	0.8696
R4	0.9740	0.6909

Nota. El tratamiento **R1** no presenta una distribución normal ($p < 0.05$), por lo tanto, no se cumple el supuesto de normalidad en todos los grupos. Se descarta el uso de pruebas paramétricas como ANOVA.

4.4.2. Contenido de Proteína total estimada (mg/L)

En cuanto a la proteína total, estimada a partir del peso seco, los valores también variaron entre tratamientos. El tratamiento **R2** alcanzó el valor más alto (426,25 mg/L), seguido de **R3** (342,40 mg/L), **R4** (342,17 mg/L) y **R1** (187,86 mg/L). A diferencia de la proteína soluble, los datos de proteína total cumplieron con los supuestos de normalidad en todos los tratamientos, lo que permitirá aplicar análisis paramétricos en las siguientes secciones para confirmar si las diferencias son estadísticamente significativas.

La prueba de normalidad Shapiro-Wilk evaluó si los datos de proteína total estimada (mg/L) presentan una distribución normal en cada tratamiento Tabla 14.

Tabla 14. Pruebas de normalidad proteína total con base al peso seco (Shapiro-Wilk)

Tratamiento	Estadístico W	Valor p
R1	0.9189	0.2825
R2	0.9365	0.4544
R3	0.9426	0.5215
R4	0.8806	0.1439

Nota. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk aplicada individualmente para cada tratamiento con $n = 3$. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

Dado que todos los valores de p son mayores a 0.05, se acepta la hipótesis nula de normalidad. Esto indica que los datos presentan una distribución compatible con la normal, lo que permite aplicar pruebas estadísticas paramétricas como ANOVA Tabla 15.

Se muestra un valor de $F = 1.20$ y un valor p de 0.3708, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (R1, R2, R3 y R4) en cuanto a la proteína total estimada. Esto significa que, a pesar de observarse diferencias numéricas entre medias, estas no son suficientes para ser consideradas estadísticamente distintas con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 15. ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	F	Valor p
Tratamiento	30170.17	3	1.20	0.3708
Error (Residual)	67186.74	8	—	—

Nota. Análisis de varianza realizado sobre los datos de proteína total estimada (mg/L), obtenidos a partir del peso seco al día 5 de cultivo. Los datos cumplen con el supuesto de normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk.

El análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk confirmó que los datos de crecimiento presentan una distribución normal en todos los tratamientos ($p > 0.05$). Se utilizó ANOVA para comparar los tratamientos, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), siendo R2 el tratamiento con mayor crecimiento medio, en concordancia con estudios previos como López et al. (2020), quienes también reportaron un aumento significativo en la biomasa en presencia de extractos ricos en nitrógeno orgánico.

Estos resultados coinciden con los hallazgos de Kim et al. (2021), quienes reportaron una correlación positiva entre la suplementación con fertilizantes orgánicos ricos en nitrógeno y la producción de proteína celular.

CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1. Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian una clara influencia del tipo de tratamiento en el crecimiento microalgal, así como en la producción de proteína soluble y total en condiciones controladas de laboratorio. La cinética de crecimiento mostró una tendencia logarítmica ascendente en todos los reactores hasta alcanzar una fase estacionaria alrededor de los 5 días, lo que es consistente con patrones de crecimiento microbiano reportados en estudios previos como los de Montes-de-Oca et al. (2021), donde se destaca la rapidez de adaptación de cultivos microbianos ante condiciones nutritivas favorables. En este contexto, los tratamientos con fertilizantes, especialmente R2 y R3, generaron una mayor biomasa, correlacionándose con niveles elevados de proteína.

En cuanto a los niveles de proteína soluble, se observó una variabilidad significativa entre los tratamientos. El tratamiento R2 alcanzó la mayor concentración (16.59 mg/L en promedio), seguido por R3 y R4. Estos resultados se alinean con los reportes de Rodríguez et al. (2019), quienes señalaron que la adición de fuentes nitrogenadas puede inducir una respuesta proteica elevada en las primeras fases del crecimiento celular.

Asimismo, los hallazgos coinciden con lo expuesto por Alvarado y Morales (2018), quienes observaron que fertilizantes foliares aumentan la producción de metabolitos solubles y proteínas en medios acuosos controlados. Además, el perfil de proteínas solubles mostró una buena consistencia entre las repeticiones, lo que sugiere la estabilidad del tratamiento aplicado y su replicabilidad experimental.

En contraste, los valores de proteína total, estimada a partir del peso seco, presentaron diferencias aún más marcadas. R2 nuevamente fue el tratamiento con mejores resultados (promedio de 426.25 mg/L), confirmando su eficacia en la estimulación de rutas biosintéticas celulares. Estos datos concuerdan con lo descrito por Jiménez-Hernández et al. (2020), quienes destacaron que fertilizantes con alta proporción de nitrógeno favorecen la acumulación de biomasa y proteínas estructurales.

Además, estudios como el de Lascano et al. (2022) han demostrado que ciertos bioestimulantes generan un efecto sinérgico que potencia la expresión génica asociada a síntesis proteica. A diferencia de la proteína soluble, los datos de proteína

total cumplieron con los supuestos de normalidad ($p > 0.05$), lo cual permitió la aplicación de pruebas paramétricas como ANOVA, evidenciando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Respecto a la biomasa expresada como peso seco, se identificó que los datos no se ajustaban a una distribución normal en los reactores evaluados (Shapiro-Wilk $p < 0.05$ en la mayoría de los casos), por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba confirmó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, especialmente en favor de los fertilizantes con mayor contenido de nitrógeno y microelementos. Lo anterior coincide con los hallazgos de Ruiz-Castillo et al. (2020), quienes indicaron que los tratamientos ricos en elementos esenciales incrementan la velocidad de multiplicación celular y la acumulación de biomasa seca en cultivos microbianos.

Finalmente, estos hallazgos reafirman la necesidad de utilizar herramientas estadísticas apropiadas según el comportamiento de los datos, evitando así inferencias erróneas. La evaluación simultánea de proteína soluble y total ofrece una visión integral del rendimiento biotecnológico de cada tratamiento, permitiendo identificar los mecanismos fisiológicos y metabólicos que explican el desempeño diferencial de cada fórmula evaluada. Asimismo, se respalda la hipótesis de trabajo al evidenciar que la aplicación de diferentes fertilizantes genera una respuesta diferencial a nivel celular y bioquímico en los cultivos en condiciones controladas.

5.2. Conclusiones

Los tratamientos evaluados demostraron una influencia significativa en el crecimiento celular y la producción de proteínas. R2 se posicionó como el tratamiento más eficiente, tanto en términos de peso seco como de contenido proteico total y soluble, superando consistentemente a los otros tratamientos. Su composición rica en nutrientes promovió una respuesta positiva tanto en el crecimiento como en el metabolismo proteico.

Se comprobó que la cinética de crecimiento presentó una fase logarítmica activa hasta las 7.5 horas, siendo este el periodo óptimo de evaluación de parámetros bioquímicos como la proteína. La normalidad estadística se confirmó únicamente para los datos de proteína total, lo cual permitió el uso de ANOVA, mientras que los demás análisis requirieron pruebas no paramétricas como Kruskal-Wallis, reafirmando la variabilidad.

Este estudio demuestra que el análisis integral de la biomasa microbiana, mediante parámetros cuantitativos y estadísticos robustos, es crucial para seleccionar condiciones de cultivo óptimas y tratamientos eficaces en procesos biotecnológicos.

5.3. Recomendaciones

Se recomienda profundizar en la caracterización de proteínas producidas en cada tratamiento mediante técnicas de electroforesis SDS-PAGE, que permitirían discriminar perfiles de expresión proteica según el fertilizante aplicado. Esta técnica aportaría información cualitativa relevante sobre el tipo de proteínas inducidas. También se sugiere extender el periodo de seguimiento más allá de las 7.5 días para identificar con mayor precisión el inicio de la fase estacionaria y posible declive celular, lo que puede aportar datos relevantes sobre estabilidad metabólica. Este análisis temporal más detallado puede mejorar la planificación de futuras estrategias de cosecha. Además, se plantea como futura línea de investigación explorar otros compuestos bioestimulantes no comerciales, como extractos vegetales o residuos agroindustriales, para comparar su eficacia con los fertilizantes evaluados. Esta exploración puede ampliar el abanico de herramientas sostenibles para la producción de biomasa y proteínas.

Finalmente, se considera necesario realizar estudios de escalado del sistema y ensayos piloto que permitan validar estos hallazgos en contextos de aplicación industrial y garantizar su reproducibilidad y sostenibilidad. Estas validaciones

contribuirán a la transferencia efectiva de tecnologías hacia sectores agroindustriales o farmacéuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acién, F. G., Fernández, J. M., y Molina, E. (2013). Economics of Microalgae Biomass Production. In A. Pandey, Y. Chisti, D. Lee, y C. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae* (pp. 313–325). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00014-0>
- Aguilar, R., Del, M., Martínez, R., Sánchez, D., López, J., Dévora, G., y Nateras, O. (2020). Removal of copper improves the lipid content in *Nannochloropsis oculata* culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(1), 44195–44204. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10283-4>/Published
- Ahmad, I., y Hellebust, J. A. (1984). Nitrogen Metabolism of the Marine Microalga *Chlorella autotrophica*1. *Plant Physiol*, 76(1), 658–663.
- Aishvarya, V., Jena, J., Pradhan, N., Panda, P. K., y Sukla, L. B. (2015). Microalgae: Cultivation and Application. In L. Sukla, N. Pradhan, S. Panda, & B. Mishra (Eds.), *Environmental Microbial Biotechnology*, 45(1), pp. 289–311. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19018-1>
- Alejos, Ruth., Ynga, G., y Gaspar, W. A. (2023). Uso del método espectrofotométrico para la cuantificación celular de microalgas marinas de uso en la acuicultura. *Revista ION*, 36(3). <https://doi.org/10.18273/revion.v36n3-2023007>
- Altın, N., Kutluk, T., Uyar, B., y Kapucu, N. (2018). Effect of Different Nitrogen Sources on the Growth and Lipid Accumulation of *Chlorella variabilis*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 12(1), 38–40.
- Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A., y Olabi, A. G. (2022). Evaluation of Growth Rate and Biomass Productivity of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* under Different LED Wavelengths and Photoperiods. *Sustainability (Switzerland)*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/su14106108>
- Arredondo, B., y Voltolina, D. (2007). *Determinacion de proteínas por métodos espectrofotométricos*.
- Arredondo, B., Voltolina, D., Savín, T., Montoya, M., y Gómez, G. (2017). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluacion de la biomasa microalgal*.
- Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Lieu, H. Y., Zaini, N., Tan, L. S., Islam, S., y Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous

- increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(1). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>
- Barla, F., Lega, M., y Kumar, S. (2023). Process integration opportunities applied to microalgae biomass production. In *Microalgae-Based Systems: Process Integration and Process Intensification Approaches*, 1(1), 271–298. <https://doi.org/10.1515/9783110781267-014>
- Bello, A. S., Saadaoui, I., y Ben-Hamadou, R. (2021). “Beyond the Source of Bioenergy”: Microalgae in Modern Agriculture as a Biostimulant, Biofertilizer, and Anti-Abiotic Stress. *Agronomy*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081610>
- Benjamin, A. (2023). Protein quantification methods: Advantages and limitations. *J Clin Bioanal Chem*, 7(2), 142. <https://doi.org/10.35841/aacbc-7.2.142>
- Cadena Ramírez, A., Baños Orozco, M. A., y Anducho Reyes, M. A. (2024). Raceway ponds for microalgae production. In *Algal Bioreactors: Science, Engineering and Technology of Upstream Processes*, 1(1), 305–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-14058-7.00036-1>
- Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, y Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. In *Chemosphere* 305(1), 23-26. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135508>
- Calvo, O., Mora, A., y Muñoz, W. (2024). Posibles factores que afectan el costo y la rentabilidad de la producción de microalgas: una revisión bibliográfica. *Agronegocios* 1(2), 1–21. <https://doi.org/10.18845/ea.v9i1.6657>
- Carbonell, L., Garciga, J. P., Carbonell, N., y López, E. (2024). Growth Performance and Nutrient Removal Efficiency of *Chlorella Vulgaris* in Fish Wastewater for the Cuban Agro-Industrial Sector. *Research Square*, 1(4). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5319794/v1>
- Casanova, L. M., Mendes, L. B. B., Corrêa, T. de S., da Silva, R. B., Joao, R. R., Macrae, A., y Vermelho, A. B. (2023). Development of Microalgae Biodiesel: Current Status and Perspectives. In *Microorganisms*, 11(1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010034>
- Chanquia, S. N., Vernet, G., y Kara, S. (2022). Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. In *Engineering in Life Sciences* 22(12), 712–724. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100070>

- Choi, Y. Y., Patel, A. K., Hong, M. E., Chang, W. S., y Sim, S. J. (2019). Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): An emerging sustainable bioprocess for reduced CO₂ emission and biofuel production. *Bioresource Technology Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100270>
- Colusse, G. A., Borges, C. R., Rabello, M. E., de Carvalho, J. C., y Nosedá, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27(1). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508>
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., y González-Hernández, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. In *Food Science and Technology (Brazil)*, 42(1). <https://doi.org/10.1590/fst.37320>
- Darvehei, P., Bahri, P. A., y Moheimani, N. R. (2018). Modeling the Effect of Temperature on Microalgal Growth under Outdoor Conditions. In *Computer Aided Chemical Engineering*, 43(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64235-6.50012-7>
- Dasan, Y. K., Lam, M. K., Yusup, S., Lim, J. W., y Lee, K. T. (2019). Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. *Science of the Total Environment*, 688(1), 112–128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.181>
- Demir-Yilmaz, I., Schiavone, M., Esvan, J., Guiraud, P., y Formosa-Dague, C. (2023). Combining AFM, XPS and chemical hydrolysis to understand the complexity and dynamics of *C. vulgaris* cell wall composition and architecture. *Algal Research*, 72(1), <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103102>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., y Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. In *Biomolecules*, 10(8), 1–24. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Elisabeth, B., Rayen, F., y Behnam, T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. In *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 457–473. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Fils, M., Nadjimbayel, N., Emile, M., Marie-Frédéric, T., Fotsop Oscar, W., Djoudjeu, T., Momo, M., Fofou, M., Emile, M., y Léopold, L. (2022). Fertilizer on the Biomass and Phycobiliproteins Production of *Spirulina platensis*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 11(3), 45–55. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20221103.11>

- Flores, L., y Ruiz, A. (2017). Implementación De Una Metodología Analítica Para La Cuantificación De Proteínas En La Microalga *Arthrospira platensis*. *Rev Soc Quím Perú*, 83(4), 371–381.
- Fu, L., Li, Q., Yan, G., Zhou, D., y Crittenden, J. C. (2019). Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1458-z>
- Galvan, K., y Rozas, H. (2013). *Remoción de Arsénico de efluentes industriales mediante bioabsorción con Chlorella vulgaris a escala de laboratorio*. Universidad Católica de Santa María.
- Gamal, R., y Shreadah, M. A. (2024). Marine microalgae and their industrial biotechnological applications: A review. In *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 22(4). <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2024.100407>
- García-Encinas, J. P., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Ornelas-Paz, J. de J., Del Toro-Sánchez, C. L., y Márquez-Ríos, E. (2025). Proteins from Microalgae: Nutritional, Functional and Bioactive Properties. In *Foods, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/foods14060921>
- Grama, S. B., Liu, Z., y Li, J. (2022). Emerging Trends in Genetic Engineering of Microalgae for Commercial Applications. In *Marine Drugs*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/md20050285>
- Grande, T., Vornoli, A., Lubrano, V., Vizzarri, F., Raffaelli, A., Gabriele, M., Novoa, J., Sandoval, C., Longo, V., Echeverria, M. C., y Pozzo, L. (2023). *Chlamydomonas agloeformis* from the Ecuadorian Highlands: Nutrients and Bioactive Compounds Profiling and In Vitro Antioxidant Activity. *Foods*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/foods12173147>
- Ilvitskaya, S. V, y Chistyakova, A. G. (2020). Microalgae in architecture as an energy source. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 944(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/944/1/012010>
- Jacob Lopes, E. , Z. L. Q. , S. I. A. , y M. M. M. (2022). *3rd Generation biofuels: disruptive technologies to enable commercial production*. (Woodhead Publishing).
- Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M., y Nouri, F. (2021). Microalgae: therapeutic potentials and applications. In *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4757–4765. Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>

- Kundu, S., Mukherjee, J., Yeasmin, F., Basu, S., Chattopadhyay, J., Ray, S., y Bhattacharya, S. (2018). Growth profile of *Chaetoceros* sp. and its steady state behaviour with change in initial inoculum size: A modelling approach. *Current Science*, 115(12), 2275–2286. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i12/2275-2286>
- Kuo, C. M., Yang, Y. C., Zhang, W. X., Wu, J. X., Chen, Y. T., Lin, C. H., Lin, M. W., y Lin, C. S. (2023). A Low-Cost Fertilizer Medium Supplemented with Urea for the Lutein Production of *Chlorella* sp. and the Ability of the Lutein to Protect Cells against Blue Light Irradiation. *Bioengineering*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050594>
- Laamanen, C. A., y Scott, J. A. (2020). Microalgae biofuel bioreactors for mitigation of industrial CO₂ emissions. In *Bioreactors: Sustainable Design and Industrial Applications in Mitigation of GHG Emissions*, 1(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00001-2>
- Lathifah, W., Fikri, R. A., Hidayati, N. A., Anggraini, I. D., Putri, N., Prabowo, B., y Marno, S. (2021). Effect of commercial NPK fertilizer on growth and biomass of *Navicula* sp. And *Nannochloropsis* sp. *Earth and Environmental Science*, 762(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/762/1/012060>
- Liang, H., Lin, S., Chen, Y., Wang, J., Aslam, M., Chen, J., Du, H., y Li, T. (2024). Urea amidolyase as the enzyme for urea utilization in algae: functional display in *Chlamydomonas reinhardtii* and evolution in algae. *Biorxiv*, 2(1). <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.594469>
- Liao, Q., Chang, H.-X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., y Zhong, N. (2018). Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresource Technology*, 250(1), 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.086>
- Machado, A., Pereira, H., Costa, M., Santos, T., Carvalho, B., Soares, M., Quelhas, P., Silva, J. T., Trovão, M., Barros, A., Varela, J., Vicente, A. A., y Silva, J. (2020). Development of an organic culture medium for autotrophic production of *Chlorella vulgaris* biomass. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/app10062156>
- Madkour, F. F., Kamil, A. E. W., y Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.003>
- Maharani, D. K., Ardi, A., Syahrin, A. A., Samudra, T. T., Pradana, Y. S., Budiman, A., y Suyono, E. A. (2020). The effect of photoperiod on lipid production of mixed culture

- Arthrospira maxima Setchell et Gardner and microalgae consortium of glagah isolate. *AIP Conference Proceedings*, 2260. <https://doi.org/10.1063/5.0016187>
- Maltsev, Y., y Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: diversity and applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 20(2), 515–547. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>
- Maroneze, M. M., Montenegro, C., y Martínez, A. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica. *BioTecnología*, 25(5), 11–34.
- Marousek, J., Gavurova, B., y Marouskova, A. (2024). Cost breakdown indicates that biochar production from microalgae in Central Europe requires innovative cultivation procedures. *Energy Nexus*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2024.100335>
- Marsullo, M., Mian, A., Ensinas, A. V, Manente, G., Lazzaretto, A., y Marechal, F. (2015). Dynamic modeling of the microalgae cultivation phase for energy production in open raceway ponds and flat panel photobioreactors. *Frontiers in Energy Research*, 3(1). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00041>
- Masoumifeshani, B., Abedian Kenari, A., Sottorff, I., Crüsemann, M., y Amiri Moghaddam, J. (2025). Identification and Evaluation of Antioxidant and Anti-Aging Peptide Fractions from Enzymatically Hydrolyzed Proteins of Spirulina platensis and Chlorella vulgaris. *Marine Drugs*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/md23040162>
- Matthewman, M. C., y Costa-Pinto, R. (2023). Macronutrients, minerals, vitamins and energy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 24(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2022.12.009>
- Metsoviti, M., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I., y Katsoulas, N. (2020). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of Chlorella vulgaris. *Plants*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010031>
- Mercado-Reyes, I., y Álvarez-Montero, X. (2022). *Catálogo de Microalgas y Cianobacterias* (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, Ed.).
- Merz, Clifford., Arora, N., Welch, M., Lo, E., y Philippidis, G. P. (2023). Microalgal cultivation characteristics using commercially available air-cushion packaging material as a photobioreactor. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30080-6>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., y Mtolera, M. S. P. (2021). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (*Chlorella vulgaris*). *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0>

- Múnera Betancourt, A. (2024). *Evaluación del medio de cultivo sobre la producción de macromoléculas funcionales en la cepa Chlorella sorokiniana UTEX 1230 como posible suplemento alimenticio para gallinas ponedoras.*
- Muñoz, M., Ramírez, J., Otero, A., Medina, V., Cruz, P., y Velasco, Y. (2011). Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(1), 438–449.
- Navarro-Tapia, E., Herranz Barbero, A., Marquina, M., Borràs-Novell, C., Pleguezuelos, V., Vila-Candel, R., García-Algar, Ó., y Andreu-Fernández, V. (2024). Comparative analysis of different methods for protein quantification in donated human milk. *Frontiers in Pediatrics*, 12(1). <https://doi.org/10.3389/fped.2024.1436885>
- Ning, L., Pang, A., Ji, F., Li, G., Liu, Y., Zhou, Y., y Dong, R. (2014). The investigation of two stage cultivation on biomass, lipid content and FAME profiles composition capacity of microalgae: *Desmodesmus* sp. EJ 8-10 in anaerobic digestion wastewater. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2014, ASABE 2014*, 4(1), 2799–2807. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84911446338&partnerID=40&md5=53f0efc387dad3d062ad11a5b6bef37b>
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., y Otero, A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *ORINOQUIA*, 16(1), 11–20.
- Paiva, R. J., De Oliveira, D. T., Mescouto, V. A. De, Santos, A. V., Gonçalves, E. C., Noronha, R. C. R., Y Do Nascimento, L. A. (2024). Development and evaluation of low-cost flat plate photobioreactors for microalgae and cyanobacteria cultivation with biotechnological potential. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 96(1), 1–10. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230273>
- Pozzobon, V., Cui, N., Moreaud, A., Michiels, E., y Levasseur, W. (2021). Nitrate and nitrite as mixed source of nitrogen for *Chlorella vulgaris*: Growth, nitrogen uptake and pigment contents. *Bioresource Technology*, 330(1). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124995>
- Ramachandran, S., Ganesh, P. S., Sivasubramanian, V., y Kumar, B. G. P. (2016). Current developments in mass production of microalgae for industrial applications. In *Environmental Sustainability Using Green Technologies*, 1(1), 147–172. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85049863105&partnerID=40&md5=6b8295d78e2dd0851087aeef5e8ca5ca>

- Rendón, L., Ramírez, M., Ocampo, C., y Giraldo, R. (2021). Evaluation of the operational conditions in the production and morphology of chlorella sp. *Brazilian Journal of Biology*, 81(1), 202–209. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228874>
- Rosa, R., Machado, M., Vieira, M. G. M., Lopes-Santos, R., do Nascimento, A. G., Araújo, W. L., y Nunes-Nesi, A. (2023). Urea as a source of nitrogen and carbon leads to increased photosynthesis rates in *Chlamydomonas reinhardtii* under mixotrophy. *Journal of Biotechnology*, 367(1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.03.009>
- Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., y Nagappan, T. (2020). Chlorella vulgaris: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *In Applied Phycology*, 1(1), 2–11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Saini, D. K., Chakdar, H., Pabbi, S., y Shukla, P. (2020). Enhancing production of microalgal biopigments through metabolic and genetic engineering. *Food Science and Nutrition*, 60(3), 391–405. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1533518>
- Salbitani, G., y Carfagna, S. (2021). Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability (Switzerland)*, 13(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/su13020956>
- Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., Guadarrama-Mendoza, P. C., y Salas-Coronado, R. (2016). Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8667–8684. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7818-8>
- Schoch, C. L., y NCBI. (2020). *Taxonomía del NCBI: una actualización completa sobre curación, recursos y herramientas*. Base de Datos (Oxford).
- Serri, N. A., Halmi, N. H., Kassim, M. A., y Mansor, M. S. A. (2025). A Comparative Study Using Two Types of Photobioreactor for Cultivation of Chlorella vulgaris Microalgae. *The 8th Mechanical Engineering, Science and Technology International Conference*, 6(1), 23-29. <https://doi.org/10.3390/engproc2025084006>
- Silva, A. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga Chlorella sorokiniana. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Singh, A. K., Srivastava, R. K., Pal, P., Mandal, S., Sahoo, U. K., Prakash, A., Sridhar, K., Sharma, M., Sarangi, P. K., y Inbaraj, B. S. (2024). Microalgal biorefinery as a sustainable and cost-effective platform for co-production of high-value-added products/metabolites: An insight into emerging trends, challenges, and opportunities.

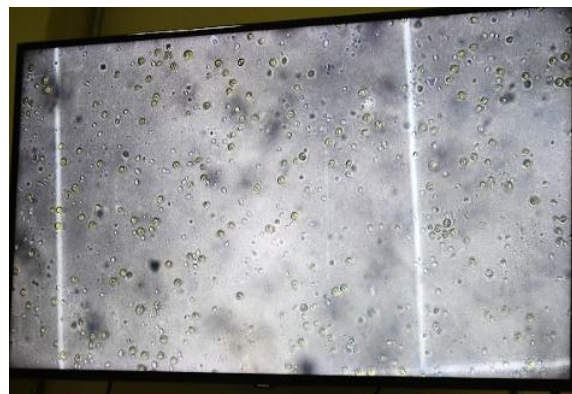
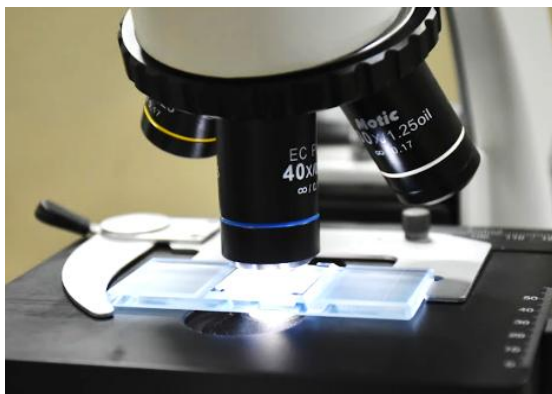
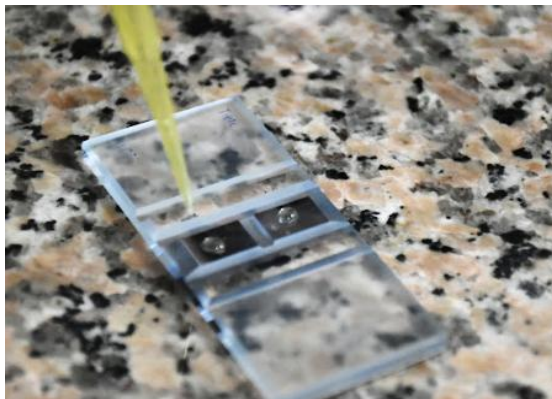
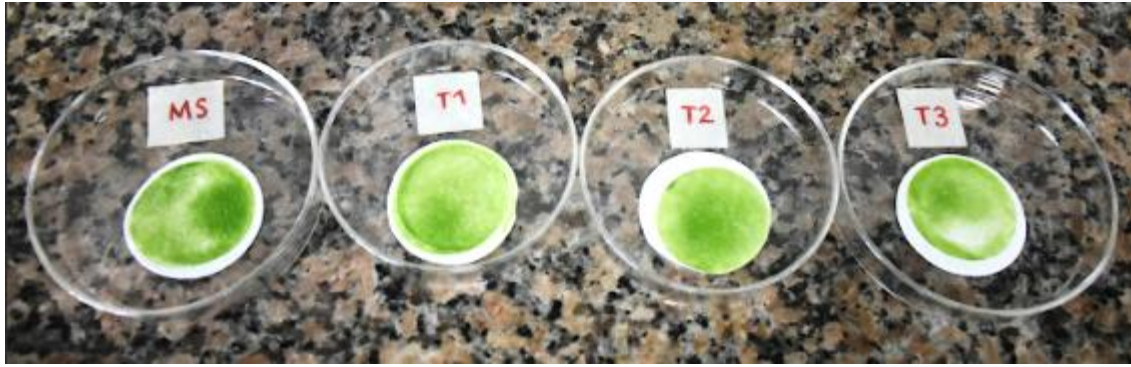
- Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58(1), 39-46.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103192>
- Singh, N. K., y Dhar, D. W. (2011). Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4), 605–629.
<https://doi.org/10.1007/s13593-011-0018-0>
- Singh, V., y Mishra, V. (2023). A review on the current application of light-emitting diodes for microalgae cultivation and its fiscal analysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(5), 665–679. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2057274>
- Sipaúba-Tavares, L. H., Lusser Segali, A. M. D., Berchielli-Morais, F. A., y Scardoeli-Truzzi, B. (2017). Desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo para *Ankistrodesmus gracilis* à base de fertilizante inorgânico e macrófita. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29(1), 39-49. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X3916>
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., y Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>
- Stoyneva-Gärtner, M., Uzunov, B., y Gärtner, G. (2020). Enigmatic microalgae from aeroterrestrial and extreme habitats in cosmetics: The potential of the untapped natural sources. *Cosmetics*, 7(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020027>
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Shuit, S. H., Lim, J. W., Show, P. L., Lee, K. T., Matsumura, Y., y Le, P. T. K. (2020). Flocculation of *Chlorella vulgaris* by shell waste-derived bioflocculants for biodiesel production: Process optimization, characterization and kinetic studies. *Science of the Total Environment*, 702, 134995. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134995>
- Tang, C., Dai, D., Li, S., Qv, M., Liu, D., Li, Z., Huang, L.-Z., y Zhu, L. (2023). Responses of microalgae under different physiological phases to struvite as a buffering nutrient source for biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, 384(1), 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129352>
- Thomas, L. C., Sathish, T., y Padmakumar, K. B. (2023). Harmful Algal Blooms: An Ecological Perspective and Its Implications to Productivity Patterns in Tropical Oceans. In *Dynamics of Planktonic Primary Productivity in the Indian Ocean*, 1(1), 301–341. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85184159487&partnerID=40&md5=6ad6ae52cc0b68b9f0f5963cfc380ace>

- Thoré, E. S. J., Muylaert, K., Bertram, M. G., y Brodin, T. (2023). Microalgae. *Current Biology*, 33(2), 91–95. <https://doi.org/10.1111/pbi.13943>
- Van Lenteren, J. C., Bueno, V. H. P., Luna, M. G., y Colmenarez, Y. C. (2020). Biological Control in Latin America and the Caribbean: Information Sources, Organizations, Types and Approaches in Biological Control. In *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*, 1(1), 1–20. <https://doi.org/10.1079/9781789242430.0001>
- Veaudor, T., Cassier-Chauvat, C., y Chauvat, F. (2019). Genomics of Urea Transport and Catabolism in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 30-45. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02052>
- Verma, K. K., Song, X. P., Degu, H. D., Guo, D. J., Joshi, A., Huang, H. R., Xu, L., Singh, M., Huang, D. L., Rajput, V. D., y Li, Y. R. (2023). Recent advances in nitrogen and nano-nitrogen fertilizers for sustainable crop production: a mini-review. In *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00488-3>
- Wang, B., Lan, C. Q., y Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. In *Biotechnology Advances*, 30(4), 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- Wu, Q., Guo, L., Wang, Y., Zhao, Y., Jin, C., Gao, M., y She, Z. (2021). Phosphorus uptake, distribution and transformation with *Chlorella vulgaris* under different trophic modes. *Chemosphere*, 285(2), 24-39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131366>
- Xiang, Q., Wei, X., Yang, Z., Xie, T., Zhang, Y., Li, D., Pan, X., Liu, X., Zhang, X., y Yao, C. (2021). Acclimation to a broad range of nitrate strength on a euryhaline marine microalga *Tetraselmis subcordiformis* for photosynthetic nitrate removal and high-quality biomass production. *Science of the Total Environment*, 781(2), 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146687>
- Yan, C., Zhang, Q., Xue, S., Sun, Z., Wu, X., Wang, Z., Lu, Y., y Cong, W. (2016). A novel low-cost thin-film flat plate photobioreactor for microalgae cultivation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(1), 103–109. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0327-2>
- Zarei, Z., Malekshahi, P., Morowvat, M. H., y Trzcinski, A. P. (2024). Hydrodynamic performance of algal bioreactors. In *Algal Bioreactors: Science, Engineering and Technology of Upstream Processes*, 1(2), 121–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-14058-7.00043-9>

Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., y Steyer, J. (2019). Microalgae cultivation systems. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production. Elsevier Inc*, 1(3), 239-250.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>

ANEXOS







UNEMI



