



FACULTAD DE POSGRADOS

EFFECTO DEL ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO (AIA) EXÓGENO EN PRESENCIA DE
LUZ AZUL Y BLANCA EN LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DE TRES
BIOTIPOS DE *Chlorella sp.* EN EL ALTO ANDINO ECUATORIANO.

AUTORA

MÓNICA ELIZABETH ALMEIDA PORTERO

AÑO

2020



FACULTAD DE POSGRADOS

EFFECTO DEL ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO (AIA) EXÓGENO EN PRESENCIA DE
LUZ AZUL Y BLANCA EN LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DE TRES
BIOTIPOS DE *Chlorella sp.* EN EL ALTO ANDINO ECUATORIANO.

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Magíster en Agroindustria con
mención en Calidad y seguridad Alimentaria.

Profesor Guía

Ph.D. Tamayo Gutiérrez Evelin Alexandra

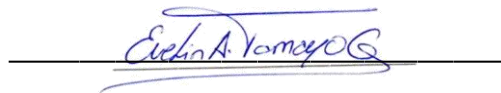
Autora

Mónica Elizabeth Almeida Portero

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Efecto del ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en presencia de luz azul y blanca en la productividad de biomasa de tres biotipos de *Chlorella sp.* en el alto andino ecuatoriano, a través de reuniones periódicas con el estudiante Mónica Elizabeth Almeida Portero, en el período 202000, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación.”



Tamayo Gutiérrez Evelin Alexandra

Ph.D. Ingeniería Industrial

C.C. 1713985198

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Efecto del ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en presencia de luz azul y blanca en la productividad de biomasa de tres biotipos de *Chlorella sp.* en el alto andino ecuatoriano, de la estudiante Mónica Elizabeth Almeida Portero, en el período 202000, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”



Pablo Santiago Moncayo M.
Ph.D. Ingeniería Industrial
1712367505

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.



Mónica Elizabeth Almeida Portero

C.I. 1804114724

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las fuerzas Armadas ESPE-IASA, al Laboratorio de Acuicultura.

Al Dr. Juan Ortiz, Dra. Evelin Tamayo e Ing. Esteban Auz gracias por compartir conmigo su conocimiento y ser mis guías.

Ing. Daysi Muñoz, Andrés Changuán y José Luis Espinosa por su toda su ayuda y apoyo.

DEDICATORIA

A mi pequeño Liam por ser la luz de mis ojos, mi alegría y mi fuerza.

A mi familia gracias por su apoyo.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1	Antecedentes	1
1.2	Planteamiento del problema	2
1.3	Objetivos	3
1.3.1	Objetivo general	3
1.3.2	Objetivos específico	3
1.4	Justificación.....	3
1.5	Hipòtesis	4

2. CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1	Microalgas	5
2.2	<i>Chlorella sp.</i>	5
2.2.1	Clasificación taxonómica <i>Chlorella sp.</i>	6
2.2.2	Morfología de <i>Chlorella sp.</i>	6
2.2.3	Reproducción de <i>Chlorella sp.</i>	7
2.2.4	<i>Chlorella sp.</i> porcentaje de peso seco total	8
2.2.5	Nutrición de microalgas	8
2.2.6	Reproducción en microalgas	8
2.2.7	Procesos fisiológicos	9
2.2.7.1	Fotosíntesis en microalgas	9
2.2.7.1.1	Fase luminosa de la fotosíntesis	9

2.2.7.1.2	Fase oscura (Ciclo de Calvin).....	10
2.2.7.1.3	Foto-respiración	11
2.2.7.1.4	Pigmentos fotosintéticos.....	11
2.3	Parámetros para el cultivo de microalgas	12
2.3.1	Nutrientes (Medio de cultivo)	12
2.3.1.1	Carbono	12
2.3.1.2	Nitrógeno.....	12
2.3.1.3	Fósforo	12
2.3.1.4	Macro y micro nutrientes	13
2.3.2	Luz	13
2.3.3	Potencial de hidrógeno (pH)	14
2.3.4	Aireación	14
2.3.5	Salinidad	15
2.3.6	Temperatura.....	15
2.4	Fases de crecimiento	15
2.4.1	Fase de adaptación (1).....	15
2.4.2	Fase de aceleramiento (2).....	15
2.4.3	Fase exponencial (3)	15
2.4.4	Fase de desaceleración (4)	16
2.4.5	Fase estacionaria (5).....	16
2.4.6	Fase de muerte (6)	16
2.5	Manejo del cultivo.....	17
2.5.1	Control de contaminación	17
2.6	Promotores de crecimiento vegetales.....	17
2.7	Ácido indol 3-acético (AIA)	18

2.7.1	Efecto de Auxinas en microalgas	18
2.7.2	Rutas biosintéticas de las auxinas en microalgas.....	19

3. CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Ubicación del lugar de investigación.....	19
3.1.1	Ubicación Geográfica	19
3.1.2	Condiciones ambientales	20
3.2	Materiales.....	20
3.2.1	Materiales de laboratorio	20
3.2.2	Materiales Biológicos.....	21
3.2.3	Equipos y programas.....	21
3.2.4	Reactivos	22
3.3	Métodos	22
3.3.1	Crecimiento de microalgas	22
3.3.2	Masificación de microalgas.....	22
3.3.3	Preparación del ácido indol 3- acético	23
3.3.4	Aplicación de las soluciones de trabajo de AIA	23
3.3.5	Variables del estudio	24
3.3.5.1	Potencial de hidrógeno (pH):	24
3.3.5.2	Concentración celular y densidad óptica	25
3.3.5.3	Cosecha de la biomasa	25
3.3.6	Diseño Experimental	26
3.3.6.1	Factores	26
3.3.6.2	Tratamientos	26

3.3.6.3	Tipo de diseño.....	26
3.3.6.4	Características de las unidades experimentales.....	27
3.3.7	Análisis estadístico	27
3.3.8	Análisis funcional	27

4. CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Construcción de las ecuaciones lineales	27
4.1.1	Evaluación de Parámetros productivos (densidad celular)	28
4.1.2	Evaluación de Parámetros productivos (absorbancia)	29
4.1.2.1	Curva de desarrollo	30

5. CAPÍTULO V

IMPACTO DEL ESTUDIO

5.1	Impacto del estudio	34
-----	---------------------------	----

6. CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1	Conclusiones.....	36
6.2	Recomendaciones.....	37
6.3	REFERENCIAS.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Chlorella sp</i>	6
Tabla 2 Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3.....	26
Tabla 3 Ecuaciones lineales para determinar densidad celular.....	28
Tabla 4 Resultados de la prueba ANOVA para densidad celular	29
Tabla 5 Resultados de la prueba ANOVA para absorbancia.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Célula procariota, B) Célula eucariota (<i>Chlorella</i> Biotipo 3).....	5
Figura 2. Estructura celular de <i>Chlorella</i> sp.	7
Figura 3. Fase Luminosa y oscura de la fotosíntesis.	9
Figura 4. Fases del Ciclo de Calvin	10
Figura 5. Fases del crecimiento celular en microalgas.	16
Figura 6. Ubicación laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos IASA 1	20
Figura 7. Cultivos de <i>Chlorella</i> sp.a diferentes volúmenes bajo luz blanca	23
Figura 8. Cultivos de <i>Chlorella</i> sp. a diferentes volúmenes bajo luz azul	23
Figura 9. Inoculación de Auxinas al cultivo	24
Figura 10. Cultivos de <i>Chlorella</i> sp. a diferentes volúmenes bajo luz blanca	24
Figura 11. Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 1	31
Figura 12. Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 2	31
Figura 13. Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 3.....	32

RESUMEN

Las microalgas son de gran importancia en la producción de sustancias de interés alimentario, industrial, energético, agronómico, químico y farmacéutico y la purificación de aguas residuales. Estos cultivos son importantes por su versatilidad; sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado procesos que reduzcan los costos de producción, lo cual reduce el interés en producirlas a nivel industrial para la obtención de metabolitos secundarios.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno bajo luz azul y blanca en la productividad (g L^{-1}) de tres biotipos de *Chlorella sp* en el Alto Andino Ecuatoriano. Se aplicó la solución de trabajo de ácido Indol 3-Acético (AIA) exógeno durante el período de aceleración obteniendo un incremento significativo en la multiplicación celular (g L^{-1}), densidad celular (células mL^{-1}) y la obtención de biomasa.

La irradiación de los cultivos con luz LED azul generó un desgaste de energía provocando un declive en el desarrollo celular en los tres biotipos de *Chlorella sp*. entre los días 14 y 18; la irradiación de los cultivos con luz LED blanca generó un aumento en el desarrollo celular en los tres biotipos de *Chlorella sp*. y provocar desgaste energético.

El máximo desarrollo celular y biomasa se consiguió en el tratamiento AIA con irradiación luz LED blanca.

Las microalgas podrían convertirse en la agroindustria del futuro empleando la biomasa para aprovechar efluentes y residuos de diferentes procesos de la industria alimentaria como el lactosuero.

PALABRAS CLAVE:

- ***Chlorella sp.***
- **Ácido Indol 3-Acético**
- **Biomasa**
- **Metabolitos**

ABSTRACT

Microalgae are very important for diverse production of substances like food, industrial, energy, agriculture, chemical and pharmaceutical. *Chlorella sp.* is an important product due to their versatility; however, no processes have been developed to reduce production costs, it means people lost the interest about make an industrial production to obtain important metabolites.

The objective of this investigation was evaluate the effect of exogenous indole 3-acetic acid (AIA) under blue and white light on the productivity (g L⁻¹) of three *Chlorella sp.* biotypes in the High Andean Ecuadorian. The exogenous Indole 3-Acetic Acid AIA working solution was applied in the acceleration stage obtaining a significant increase in cell multiplication (g L⁻¹), cell density (cells mL⁻¹) and biomass production.

The irradiation with blue LED light generated energy wasting causing a decline in cell development in the three *Chlorella sp.* biotypes between days 14 and 18; irradiation with white LED light generated an increase in cell development in the three *Chlorella sp.* biotypes and did not cause energy wasting. The maximum cell and biomass production was achieved with the AIA treatment under white LED light irradiation.

Microalgae could become the agribusiness of the future using biomass to take advantage of effluents and residues from different processes in the food industry such as whey.

KEYWORDS:

- ***Chlorella Sp.***
- **Indol 3-Acetic Acid**
- **Biomass**
- **Metabolite**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las microalgas han sido conocidas por el ser humano como alimento desde el siglo XVI, donde probablemente cianobacterias proveniente de los lagos cercanos eran el principal ingrediente en la elaboración de panecillos. No fue hasta 1940 cuando se aísla la primera microalga *Chlorella vulgaris* y comienzan los estudios sobre su fisiología y bioquímica y fue en Alemania alrededor de los años 40 donde inicia el estudio de diatomeas (Batista, Gouveia, Bandarra, Franco, & Raymundo, 2013).

Durante los últimos tiempos el estudio de microalgas basado en sus procesos de síntesis y sistemas de cultivo ha permitido aprovechar su capacidad fotosintética para generar productos de valor económico y convertirse en una fuente prometedora dentro de la investigación; los pigmentos, polisacáridos, proteínas y lípidos extraídos de estos microorganismos son aplicados en la industria, acuicultura, agricultura, biomedicina, farmacología, cosmetología, alimentación y energía (Sánchez, 2011).

Dentro de la industria alimentaria crece el interés por la microalga *Chlorella* sp. pues de esta se derivan ácidos grasos importantes como el omega 3 y omega 6 (Tejeda, Henao, Alvear, & Castillo, 2015). “El mercado de omega-3 obtenido de microalgas son 3.000 ton/año, la venta de aceite de microalga con DHA es 140 USD/kg, encabezando los países productores esta Estados Unidos, China, Portugal y Australia, las especies son *Cryptocodinium cohnii* o *Schizochytrium limacinum*” (Torrentera & Tacon, 1989).

Además, las microalgas poseen proteínas, metabolitos secundarios como betacaroteno, astaxantina, ficocianina, luteína, fucoxantina, terpenoides, ficoeritrina, betaglucanos y polisacáridos extracelulares” (Espinoza , 2017).

Dentro de los organismos fotosintéticos *Chlorella sp.* presenta el genoma más pequeño, realiza un papel semejante a las plantas superiores cuando interacciona con el ácido Indol-3-acético mejorando significativamente su crecimiento, cambiando su metabolismo y produciendo mayor cantidad de lípidos y pigmentos (Bashan, 2004).

1.2 Planteamiento del problema

“Para el año 2030 la población mundial habrá aumentado a ocho mil millones, la demanda de alimento para el ser humano y animales en el futuro dependerá del aumento poblacional, el precio de los granos, factores como seguridad y salud alimentaria, así como también del desarrollo del medio ambiente” (Enzing, 2014).

En el país existe una sobre explotación de tierras fértiles para cultivos primarios y un abandono de tierras erosionadas; el crecimiento y desarrollo de las industrias crean la necesidad de una mayor producción de compuestos bioactivos lo que implica desgastar más la tierra sin darle el tiempo necesario para regenerarse (Asuthkar, Gunti, Rao, & Yadavalli, 2016).

Según estudios sobre huella ecológica, “entre 4 a 7 años la población necesitaría 1,5 Tierras para satisfacer sosteniblemente la demanda de materias primas, tierras de cultivo y agua. A largo plazo, la Tierra no nos va a dar más crédito, cada día se consume más y más rápidamente” (Jäger, 2015).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) en la productividad de biomasa de tres biotipos de microalgas andinas del género *Chlorella sp.* bajo, diferentes condiciones de luz en laboratorio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la productividad de biomasa de tres biotipos de *Chlorella sp.* aplicando ácido indol-3-acético (AIA) bajo condiciones de luz blanca y azul.
- Construir las ecuaciones lineales para determinar densidad celular de tres biotipos de microalga *Chlorella sp.* aplicando ácido indol-3-acético (AIA) bajo condiciones de luz blanca y azul.

1.4 Justificación

Las microalgas presentan alta importancia comercial en el sector alimenticio, industrial y energético; caracterizados por producir pigmentos, polisacáridos, proteínas y lípidos (Sánchez, 2011). Su cultivo se desarrolla en corto tiempo y se pueden utilizar tierras erosionadas evitando competir con la producción de alimentos (Medipally *et al.*, 2015; Tate *et al.*, 2013; Wijffels y Barbosa, 2010).

Al ser organismos unicelulares tienen una mayor capacidad de crecer y generar biomasa superando a las plantas superiores, no presentan estructuras reproductoras que retrasen o limiten su rápida duplicación celular (Lissarrague, Baeza, & Sánchez, 2010). Presentan un aparato fotosintético que lo vuelve rico en pigmentos y ácidos poliinsaturados de cadena larga. “Generan productos de alto valor, como carotenoides, luteína, astaxantina, captan CO₂ y asimilan nitrógeno y fuente sostenible de biocombustibles y biofertilizantes” (Alvear, Castillo, & Henao, 2011).

La microalga *Chlorella sp.* al igual que las plantas, cuando interactúa con promotores vegetales de crecimiento (hormonas) como las auxinas desarrollan varios cambios fisiológicos mejorando su crecimiento y cambiando su metabolismo, lo cual favorece la producción acelerada de los cultivos con un aumento significativo de biomasa (Alvear , Castillo, & Henao, 2011).

Dentro de la industria, el uso de técnicas convencionales retarda los procesos e imposibilitan el aumento en la generación de bioproductos; la aplicación de auxinas permitirá un aumento significativo en la producción de metabolitos secundarios, optimización del proceso, reducción de tiempos y costos, resultando en un aumento de la productividad (Liu, Qiu, & Song, 2016).

El fin de este estudio es la evaluación del efecto del ácido indol -3 acético (AIA) exógeno en la productividad de 3 biotipos de *Chlorella sp.* con el objetivo de mejorar la producción de estos microorganismos de interés comercial.

1.5 Hipótesis

H₀: La aplicación de ácido indol 3-acético exógeno (AIA) exógeno, no incrementa la productividad de biomasa de tres biotipos de *Chlorellas* andinas del Ecuador.

H₁: La aplicación de ácido indol 3-acético exógeno (AIA) exógeno, si incrementa la productividad de biomasa de tres biotipos de *Chlorellas* andinas del Ecuador.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Microalgas

Son microorganismos unicelulares eucariotas que contiene pigmentos fotosintéticos, se desarrollan de modo autotrófico o heterotrófico (González, 2015), su pared celular delimita sus organelos internos y está compuesta de una estructura fibrilar formada de celulosa, hemicelulosa, quitina, además de macromoléculas como proteínas, pectina y peptidoglicano” (Guaman Burneo & González Romero, 2016).

Existen dos grupos de microalgas eucariotas y procariotas. Al grupo de procariotas pertenecen las cianofíceas y proclorófitas, estas se caracterizan por la ausencia de organelos con membrana y el ADN ubicado en una molécula circular localizada en el citoplasma. En el grupo de las eucariotas se encuentran clorofíceas, crisofíceas, caracterizadas por tener su pared celular conformada de polisacáridos y organelos con membrana celular y el núcleo en donde se encuentra el material genético (Guaman Burneo & González Romero, 2016).

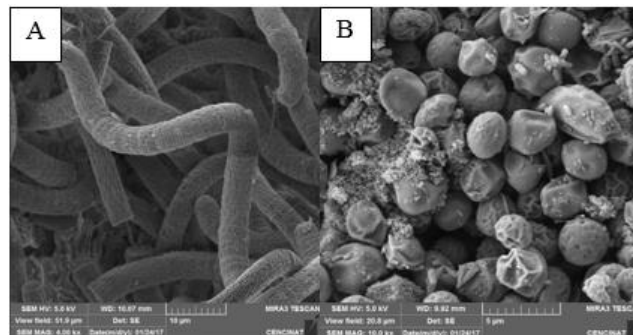


Figura 1. A) Célula procariota (*Arthrospira platensis*), B) Célula eucariota (*Chlorella Biotipo*)

2.2 *Chlorella sp.*

Chlorella sp. Alga unicelular de coloración verde y cuyo hábitat es el agua dulce, posee una forma esférica y puede estar agrupada en colonia. Una de sus características es la de presentar grandes cantidades de vitamina C y E además de beta-carotenos, clorofila, hierro, calcio, 10 de los aminoácidos esenciales y 9 de los complementarios, también se caracteriza por su alto contenido de proteína llegando hasta un 70%. Su reproducción se realiza por ruptura de la pared celular para liberar las esporas generadas dentro de la célula madre. (Guaman Burneo & Gonzáles Romero, 2016).

2.2.1 Clasificación taxonómica *Chlorella sp.*

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Chlorella sp

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

TOMADO DE Alvear , Castillo, & Henao, 2011)

2.2.2 Morfología de *Chlorella sp.*

Chlorella sp. Son células esféricas con un diámetro que oscila entre 2 a 10 μm , el contenido interno limitado por una pared celular compuesta por una fracción soluble de hemicelulosa y una rígida de glucosamina (Hubert, Ricochon, Linder, & Muniglia, 2017).

En su citoplasma se alberga el núcleo, cloroplasto, aparato de Golgi, vacuolas, minerales, proteínas solubles y agua. El aparato respiratorio se constituye por una doble capa de membrana, parte del material genético se encuentra dentro de la mitocondria. Posee un cloroplasto con forma de copa que presenta una membrana de doble envoltura compuesta de fosfolípidos. Dentro del cloroplasto se encuentran piretroides que presentan altos niveles de la enzima rubisco. Además, el cloroplasto presenta tilacoides fusionados, donde se genera la síntesis de clorofila. (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).



Figura 2. Estructura celular de *Chlorella sp.*

Tomado de, Arce , 2009)

2.2.3 Reproducción de *Chlorella sp.*

Manifiesta una reproducción asexual por mitosis. En la fase de maduración, se forman dentro de la madre 4 hijas que poseen una pared celular. Luego de la maduración se rompe la pared celular de la madre por parte de las células recién formadas para liberarlas y los restos de la madre son utilizados por las hijas como alimento (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

2.2.4 *Chlorella* sp. Porcentaje de peso seco total

Chlorella sp. por su alto porcentaje de lípidos y proteínas se está utilizando en la elaboración de biodiesel y en la alimentación tanto humana como animal *Chlorella* sp. en peso seco posee:

- Proteína del 51-58%
- Grasas del 16-40%
- Carbohidratos del 12-17%
- El 10% restante está compuesto por; minerales, ácidos nucleicos, pigmentos y otros componentes considerados menores. (Ramírez , Rendón, & Vélez, 2013).

2.2.5 Nutrición de microalgas

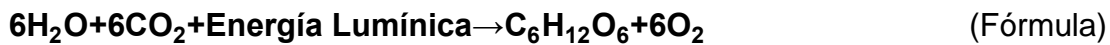
La clasificación de las microalgas según estrategias metabólicas es la siguiente:

- **Fotoautótrofas:** Utilizan la luz para generar energía, el carbono lo obtienen del CO₂, con esto producen ATP e hidratos de carbono (Guaman Burneo & Gonzáles Romero, 2016).
- **Fotoheterótrofas:** La energía es obtenida a partir de la luz y la fuente de carbono proviene de compuestos orgánicos. (Gonzáles, 2015).
- **Mesotróficas:** Presentan para su desarrollo procesos autótrofos y heterótrofos, su energía proviene de la luz solar y material orgánico, el carbono es obtenido de materia orgánica y CO₂, un ejemplo de estas es la *Spirulina platensis* (Gonzáles, 2015).
- **Heterótrofa:** La luz no es indispensable para su desarrollo, el carbono y la energía se obtienen de compuestos orgánicos, un ejemplo de estas es *Chlorella protothecoides* (Gonzáles, 2015).

2.2.6 Procesos fisiológicos

2.2.6.1 Fotosíntesis en microalgas

Mediante este proceso las microalgas con la energía lumínica y a partir de materia inorgánica sintetizan materia orgánica. La importancia de este proceso se encuentra en la introducción de nutrientes a las cadenas tróficas de los ecosistemas, lugar en donde la materia orgánica es utilizada como alimento para otros organismos (Ruiz, 2011). El proceso fotosintético se realiza de la siguiente manera:



El proceso tiene dos fases: Luminosa y oscura

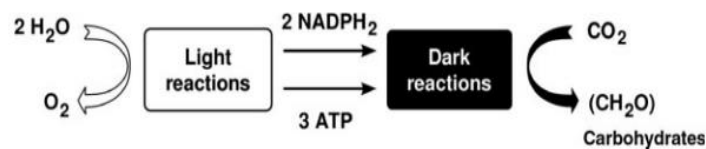


Figura 3. Fase Luminosa y oscura de la fotosíntesis.

Tomado de Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.6.1.1 Fase luminosa

La luz compuesta por fotones es captada por la clorofila y los Carotenoides, mismo que se ubican dentro de los cloroplastos para ser conducidos a los fotosistemas I y II. Al pasar los electrones por estos sistemas se produce el ATP junto con NADPH necesarios para que el CO_2 sea asimilado. En el fotosistema II los electrones se encargan de disociar la molécula de agua obteniendo como resultado oxígeno molecular (Lissarrague, Baeza, & Sánchez, 2010).

2.2.6.1.2 Fase oscura Ciclo de Calvin

Fase en la cual la energía captada se utiliza para la reducción del CO_2 en hidratos de carbono, para esto se emplea la cantidad de 8 fotones por molécula de CO_2 , ATP y NADPH que se produjo en la fase luminosa. En esta fase el ciclo de Calvin actúa junto con las reacciones de la fase luminosa, en la cual la transformación del CO_2 generó glucosa u otros compuestos.

Las cuatro fases del ciclo de Calvin son:

- 1) Carboxilación
- 2) Reducción
- 3) Regeneración
- 4) Producción

Fase de carboxilación, donde se agrega azúcar al CO_2 , ribulosa-bis-P (bifosfato de ribulosa), y se forma dos moléculas de glicerato-P (fosfoglicerato). La producción está caracterizada por Carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos principales productos de la fotosíntesis, en el proceso de fotosíntesis también se pueden formar otros productos, esto está ligado al contenido de nutrientes del medio, CO_2 y O_2 (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

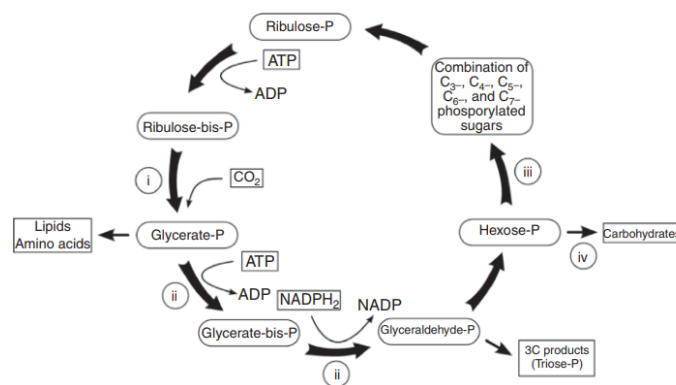


Figura 4. Ciclo de Calvin **i)** Fase de carboxilación, **ii)** Fase de reducción, **iii)** Fase de regeneración, **iv)** Fase de producción

Tomado de (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.6.1.3 Foto-respiración

Es un proceso contrario a la carboxilación que se da dentro del ciclo de Calvin, aquí el carbono orgánico es transformado en CO_2 sin obtener ganancia metabólica alguna. La enzima rubisco trabaja como oxigenasa catalizando la reacción que se genera entre el CO_2 y el bifosfato de ribulosa de esta manera de forma el fosfoglicolato. Luego de la desfosforilación el glicolato se transforma en serina, CO_2 y amoníaco. De las concentraciones O_2 y CO_2 depende la fotorespiración. Para disminuir los efectos de la fotorrespiración y mejorar los rendimientos en la población de microalgas es necesario contar con alta irradiación lumínica baja concentración de CO_2 y un elevado nivel de O_2 , así podemos estimular el proceso. (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.6.1.4 Pigmentos fotosintéticos

Clorofila: Principal pigmento encargado de la transformación química de la energía lumínica captada. La clorofila se encarga de absorber la longitud de onda de color azul (400 a 500 nm) y rojo (650 a 700 nm). “Las clorofilas a, b y c absorben la luz de dos bandas predominantes de luz, azul o verde-azul (450 a 475 nm) y rojo (630 a 675 nm)”. Dentro de la clorofila se da la reacción del complejo pigmento-proteína característico de los organismos autótrofos. Los pigmentos denominados antena o accesorios que se encuentran en la *clorofila b* y *c* extienden los rangos de absorción lumínica (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

Carotenoides: Estos tienen un rango de absorción lumínica que oscila entre 400 a 500 nm, lo que resulta en la apreciación del color amarillo-anaranjado. Los carotenoides se dividen en; α -caroteno, β -caroteno y luteína, zeaxantina, fucoxantina, peridina que pertenecen a las xantofilas. Estos tienen funciones varias dentro del proceso fotosintético, entre ellas es la recolección de la luz y la transferencia a la clorofila, además estas moléculas generan la protección indispensable contra la irradiación lumínica excesiva (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.3 Parámetros para el cultivo de microalgas

Como parte fundamental se debe considerar la luminosidad, los nutrientes, salinidad, temperatura y aireación, se debe tener en cuenta los rangos óptimos de tolerancia, y factores ambientales que cada especie de microalga posee (Sorgeloos, 1996).

2.3.1 Nutrientes (Medio de cultivo)

2.3.1.1 Carbono

Principal compuesto dentro de la biomasa que contribuye a la formación de los compuestos orgánicos, el 65% del peso seco está constituido por él. La baja presencia de nutrientes tales como nitrógeno o fósforo producen un incremento en el carbono presente en la biomasa. Las microalgas toman el carbono en su forma inorgánica del CO_2 que reacciona junto con el agua (H_2O) (Markou, Vandamme, & Muylaert, 2014).

2.3.1.2 Nitrógeno

Su presencia dentro de la biomasa puede variar del 1 al 10%. La deficiencia de nitrógeno puede decolorar las células debido a que la clorofila se ve disminuida aumentando los carotenoides. Al medio de cultivo se suministra habitualmente como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-)

El nitrógeno es un elemento importante en la producción de biomasa en microalgas. La deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo puede generar decoloración de las células debido a la disminución de clorofila y al aumento de carotenoides. El nitrógeno en el medio se suministra por lo general como nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), el pH se ve disminuido de manera significativa cuando el amonio es utilizado como fuente de nitrógeno (Richmond, 2004).

2.3.1.3 Fósforo

Mineral indispensable para el desarrollo de varios procesos dentro de las microalgas tales como la síntesis de ácidos nucleicos (ADN) y la transferencia de energía. El fósforo se utiliza preferentemente en forma de fosfato (PO_4^{2-}). Las microalgas contienen menos del 1% de fósforo, sin embargo, este es un limitante dentro del cultivo, ya que tiene funciones metabólicas y es utilizado en el almacenamiento de energía e inclusive en la estructura celular, material genético (Borowitzka, 2018). Si se suministra de manera externa afecta en especial el contenido graso y de hidratos de carbono de la biomasa (Richmond, 2004).

2.3.1.4 Macro y micronutrientes

Dentro de la nutrición en microalgas a más del C, N y K son micronutrientes importantes el Na, Fe, Mg, Ca y en menor cantidad S, B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, Se, Fe, estos se ven reflejados en la composición básica de las microalgas. Estos elementos actúan en muchas de las reacciones enzimáticas que intervienen en la biosíntesis (Richmond, 2004). Un elemento esencial es el magnesio para la fijación del carbono y las reacciones de ATP como en procesos enzimáticos, el contenido de magnesio en microalgas se encuentra entre el 0.35% al 0.7 %. El calcio requerido en la construcción de la pared celular y en la división celular, está presente entre 0.2 a 1.4 % (Markou, Vandamme, & Muylaert, 2014).

2.3.2 Luz

Al igual que las plantas las microalgas también utilizan la “radiación foto sistémica activa (PAR)” de amplitud de onda de 400 a 700 nm con la finalidad de efectuar el proceso fotosintético. La luz azul con una longitud alrededor de 400nm posee más energía que la luz roja con una onda aproximada de 700nm (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

El desarrollo de las microalgas es directamente proporcional a la densidad de flujo que presentan los fotones fotosintéticos (PPFD), si los niveles son bajos la

producción de oxígeno aumenta mientras que si superan ($100 \mu\text{mol quantum m}^{-2} \text{s}^{-1}$) la producción de oxígeno disminuye a este fenómeno se lo denomina “saturación de luz en la fotosíntesis”. La intensidad lumínica en el cultivo de microalgas interviene con la densidad celular y el volumen de biomasa. (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.3.3 Potencial de hidrógeno (pH)

Los cultivos de microalgas en su mayoría se desarrollan con un pH entre 7 y 9, esto regula el carbono y su biodisponibilidad y afecta las presencias de metales traza, nutrientes para el desarrollo de niveles extremos de pH (mayores a 11.9 afectan la fisiología del proceso fotosintético (Surindra & Verma, 2018). Si estos parámetros se manejan de forma inadecuada se puede llegar a la interrupción de los procesos de División celular (Sorgeloos, 1996).

El pH se puede regular con la aireación o adición de CO_2 , La fotosíntesis genera el aumento de pH gracias a la acumulación de OH^- y la disminución del CO_2 disuelto, (Ruiz, 2011). El pH afecta principalmente la disponibilidad de nutrientes debido a sus constantes ácido-base, el aumento de pH ocasiona la precipitación de fósforo y eliminación de nitrógeno como amoníaco (Lores, 2015).

2.3.4 Aireación

Permite la homogenización de los nutrientes evitando la sedimentación, facilita el intercambio de gases y homogeniza la captación de luz dentro del cultivo (Sorgeloos, 1996). Se debe considerar el volumen de oxígeno disuelto, puesto que las altas concentraciones de este gas pueden disminuir la acción de fijación del carbono de la enzima rubisco, esto activará el proceso de foto-respiración (Ruiz, 2011), Al suministrar aire mediante burbujeo se puede asegurar el suministro de CO_2 , la activación del oxígeno fotosintético y así evitar que el cultivo se sobresature de oxígeno (García, 2014)

2.3.5 Salinidad

Las microalgas en su mayoría se desarrollan de mejor manera en condiciones de salinidad menores a las de sus hábitats naturales, salinidad entre 20 a 24 g L⁻¹ es óptima para el desarrollo normal de las microalgas de origen marino (Sorgeloos, 1996)

2.3.6 Temperatura

Las microalgas toleran temperaturas entre 16 y 17 °C, a temperaturas inferiores a 16°C su crecimiento se ve afectado y las temperaturas superiores a 35°C son letales para la mayoría de especies (Sorgeloos, 1996). Este es un factor de suma importancia dentro del proceso fotosintético, ya que fija el carbono (CO₂) (García, 2014).

2.4 Fases de crecimiento

2.4.1 Fase de adaptación

Esta es una fase de adaptación, así también se la puede llamar, en esta al cultivo le afectan factores varios como iluminación, pH y temperatura, lo que puede ocasionar lentitud en el desarrollo inicial (Arredondo & Voltolina, 2007)

2.4.2 Fase de aceleramiento

Los componentes estructurales se desarrollan secuencialmente iniciando por el ARN (ácido ribonucleico) y proteínas que generan el desarrollo celular y al final aumenta la concentración celular (Arredondo & Voltolina, 2007)

2.4.3 Fase exponencial

En esta fase el crecimiento y División celular llegan a su máxima expresión, y se mantienen constantes debido a que no están presentes factores limitantes (Arredondo & Voltolina, 2007). Zhang, Amendola, Hewson, Sommerfeld, & Hu, en el 2012, pudieron apreciar que durante la fase exponencial las microalgas de *Chlorella zofingiensis* presentaron un diámetro menor al de otras etapas en 3

micrómetros (μm), pero con un rendimiento en peso seco 10 veces mayor al de otra etapa.

2.4.4 Fase de desaceleración

Caracterizada por la menor disponibilidad de nutrientes generando condiciones inadecuadas para el óptimo desarrollo del cultivo, la División celular se ve disminuida gracias a una elevada concentración de individuos (Arredondo & Voltolina, 2007)

2.4.5 Fase estacionaria

Aquí la biomasa no presenta cambios relevantes, la mortalidad al igual que la natalidad son similares, esto se debe a alteraciones en factores como iluminación, pH, o la no disponibilidad e algún nutriente (Arredondo & Voltolina, 2007)

2.4.6 Fase de muerte

Esta fase se deriva por la carencia en la disponibilidad de nutrientes, provocando lisis (muerte celular), en esta etapa existe una marcada disminución de la biomasa (Arredondo & Voltolina, 2007).

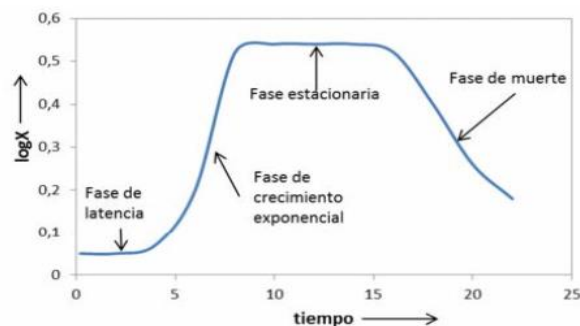


Figura 5. Fases del crecimiento celular en microalgas.

Tomado de Arredondo & Voltolina, 2007).

2.5 Manejo del cultivo

2.5.1 Control de contaminación

Se debe tomar muy en cuenta el evitar que otros organismos como bacterias interrumpen los procesos fisiológicos del cultivo de microalgas. Para ese efecto se puede añadir un sustrato como glucosa y si no se cuenta con esta sacarosa o peptona en una concentración p/v del 1-2%, o utilizar agar-agar (15 mil mg L^{-1}). Los cultivos se deben incubar durante 24 horas hasta 2 semanas cuando presentan una contaminación por bacterias se observan colonias. Es muy importante revisar la pureza del cultivo con esta técnica (Arredondo & Voltolina, 2007)

En un adecuado control de microorganismos se puede usar antibióticos para bacterias o antimicóticos para hongos, generando así un efecto selectivo, se puede implementar penicilina (100 mg/L) o Sulfato de gentamicina (25 mg/L) para varias especies de microalgas. En *Chlorella sp.* existe una bacteria *Vampirovibrio Chlorellavorus* que es predadora la cual se puede controlar al exponerla durante 15 minutos a un pH menor a 3.5 con 0.5 g / L de acetato previamente tratado con ácido clorhídrico (Ganuzza, Sellers, Bennett, Lyons, & Carney, 2016)

2.6 Promotores de crecimiento vegetales

Las fitohormonas son moléculas de bajo tamaño y trabajan como mensajeros químicos coordinando procesos celulares en hongos algas y plantas. Los promotores de crecimiento son sistemas de biosíntesis producidos por fitohormonas, aquí podemos encontrar a las citoquininas, etileno, auxinas, ácido abscísico y giberelinas cuyo papel fundamental en microalgas no está definido completamente (Lu & Xu, 2015).

Las fitohormonas son de presencia endógena en varias microalgas (Lu y Xu, 2015; Tarakhovskaya *et al.*, 2007), pero poco se conoce referente a su función y la adición de las mismas, como reguladores de crecimiento tienen positivos efectos como por ejemplo, Czerpak *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 2010; Piotrowska

y Czerpak, 2009^a observaron que al aplicar auxinas exógenas al igual que citosinas, estas estimulan el desarrollo, incrementando el peso fresco y en el número de pobladores de *Chlorella pyrenoidosa* o *Chlorella sorokiniana*.

2.7 Ácido indol 3-acético (AIA)

Es una fitohormona que se encuentra involucrada en varios procesos fisiológicos tanto en plantas como en algas, división celular, biosíntesis de etileno, crecimiento, es una auxina natural con presencia en algas del género *Chlorella* y *Scenedesmus* y plantas vasculares, con una concentración menor en algas verdes cuando las comparamos con plantas (Piotrowska & Bajguz, 2014).

Las auxinas trabajan directamente en la división celular, al igual que en la transición de estado latente a estado activo, además de estimular la respiración, el ácido indol 3-acético (AIA) y el ácido indol 3 butanoico (IBA) son las auxinas en microalgas, el AIA permite la síntesis de glucosa, ácidos nucleicos, cloroplastos, oligosacáridos y proteínas (Xingfeng, Bartocci, Yunjun, Fantozzi, & Yan, 2018).

2.7.1 Efecto de Auxinas en microalgas

Intervienen en el metabolismo y crecimiento de las microalgas, con bajas concentraciones influye en el aumento de biomasa al igual que estimulan la fijación de grasas y la síntesis de proteínas y pigmentos en microalgas (Xingfeng, Bartocci, Yunjun, Fantozzi, & Yan, 2018)

Las auxinas estimulan la síntesis de proteínas en *Chlorella pyrenoidosa* y el contenido de clorofila a y b. La aplicación de AIA en el cultivo de *C. vulgaris* permitió evidenciar un aumento significativo en la multiplicación celular (Antoun, Bashan, & de-Bashan, 2008)

Según (Piotrowska & Bajguz, 2014) “las auxinas tienen un efecto mediado por enzimas secuestradoras en las especies reactivas de oxígeno (ROS)” y esto responde a la existencia de hormonas endógenas (Ácido indol 3-acético) lo cual aumenta su actividad, esto puede estar relacionado al proceso de organogénesis, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al igual que el ROS están controlados mediante “la maquinaria celular antioxidante” que controla las auxinas exógenas, esto genera respuestas fisiológicas en microalgas tales como la producción de metabolitos y la División celular, sin embargo enfatiza en que esta hipótesis debe ser validada utilizando herramientas moleculares

2.7.2 Rutas biosintéticas de las auxinas en microalgas

Stirk, y otros en 2014 valoraron auxinas endógenas en *Chlorella minutissima* detectando la presencia de triptófano (TRP), y (ANT) precursor antranilato, con concentraciones elevadas, esto permite creer que hay una vía dependiente de triptófano (TRP) en *Chlorella minutissima*. TRP se caracteriza por ser un precursor en las vías biosintéticas siendo un compuesto de defensa y generador de proteínas en plantas vasculares.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar de investigación

3.1.1 Ubicación Geográfica

Este estudio fue efectuado en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, en las instalaciones del laboratorio de Acuicultura y Recursos acuáticos de la Carrera de ingeniería Agropecuaria IASA I, Hacienda

el Prado, localizada geográficamente en las coordenadas UTM WGS 84 ZONA 17 SUR M 787833.19 m E, 99957478.26 m S.



Figura 3. Ubicación laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos IASA1

Tomado de Google maps, 2018

3.1.2 Condiciones ambientales

El desarrollo de este estudio se efectuó a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. (Arce , 2009)

3.2 Materiales

3.2.1 Materiales de laboratorio

- Alcohol 75%
- Algodón
- Asas de siembra
- Botellas de vidrio
- Espátulas
- Filtro de jeringa $0.22 \mu\text{M}$
- Frascos de tapa rosca de 100 ml autoclavables
- Galones de plástico
- Gasa
- Gradillas
- Lámparas led color azul 18W
- Lámparas led color blancas 18 W

- Libro de campo
- Llaves de aireación para pecera
- Mangueras de pecera
- Masking
- Matraces Erlenmeyer 500ml
- Mechero de alcohol
- Micro pipetas de 1 ml
- Papel aluminio
- Papel de cocina
- Pipetas de 1ml
- Puntas azules para pipetas de 1 ml
- Purificador de aire
- Refrigeradora
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Tubos eppendorf 1.5 ml

3.2.2 Materiales Biológicos

Cepas de microalgas *Chrorella* Biotipo 1, Biotipo 2 y Biotipo 3, del Laboratorio de Recursos Acuáticos y Acuicultura de la ESPE.

3.2.3 Equipos y programas

- Autoclave ALLAMERICAN 25X-1
- Balanza electrónica (M-220D)
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de neubauer
- Centrífuga MX 8624
- Espectrofotómetro (Termo spectronic génesis 20)
- Espectrofotómetro HANON UV
- Estufa esterilizador MM MEDCENTER
- Microscopio óptico

- Microscopio óptico
- Motor doble salida (Acuario)
- Potenciòmetro HANNA
- Purificador de aire
- Refrigerador
- Refrigeradora
- Vórtex

3.2.4 Reactivos

- Agua esterilizada
- Nitrofoska foliar (30-10-10)
- Ácido indol-3-acético (AIA) Sigma-Aldrich
- Etanol absoluto

3.3 Métodos

3.3.1 Crecimiento de microalgas

Se tomó varias colonias de inóculos aislados del biotipo 1, 2 y 3 con el asa de siembra y dentro de la cámara de flujo laminar, junto a un mechero de alcohol se trasladaron hacia tubos vacutainer. Tres biotipos de microalgas se colocaron en iluminación artificial mediante una lámpara fluorescente color azul y los biotipos blancos fueron puestos bajo una lámpara fluorescente color blanca, todos con un fotoperiodo de 24 horas durante una semana hasta observar crecimiento celular (Mann and Myers, 1968).

3.3.2 Masificación de microalgas

Para incrementar la biomasa de las microalgas se aplicó un cultivo discontinuo (incrementando el volumen del cultivo paulatinamente). La masificación se realizó utilizando medio de cultivo Nitrofoska foliar (30-10-10) a una concentración de (1g^L⁻¹) con agua destilada, previamente autoclavado a 121° C, 15 PSI de presión durante 25 minutos y a temperatura ambiente.

El proceso inició con 12 tubos de ensayo de 10 ml y cada 5 días se trasvasó a tubos de 100 ml, 250 ml y finalmente 1 litro, durante este tiempo se realizó el monitoreo de contaminación, pH, conteo celular y se evaluó el crecimiento celular hasta alcanzar una concentración de 40×10^6 células mL^{-1} .

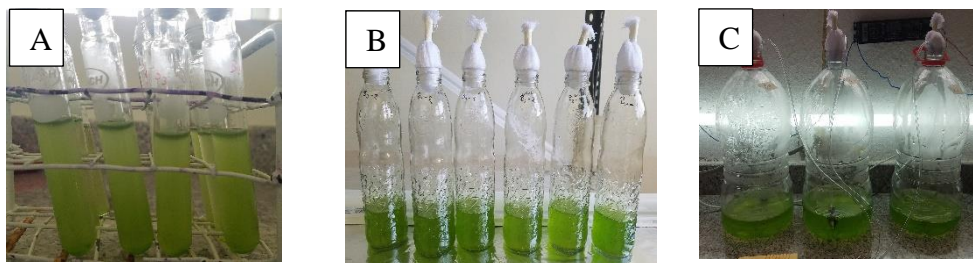


Figura 7. Cultivos de *Chlorella sp.* a diferente volumen de fertilizante en presencia de luz blanca: A) 10ml, B) 250 ml, C) 1000 ml.

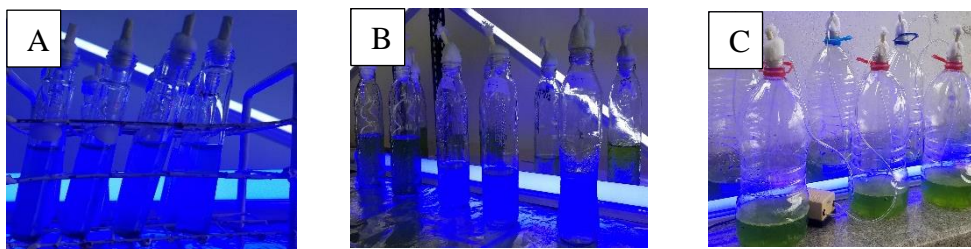


Figura 8 Cultivos de *Chlorella sp.* a diferente volumen de fertilizante en presencia de luz azul: A) 10ml, B) 250 ml, C) 1000 ml.

3.3.3 Preparación del ácido indol 3- acético

Se trabajó con una solución madre de ácido indol-3 acético de 1000mgL^{-1} constituida por 20 mg de AIA disueltos en 20 ml de etanol absoluto homogenizado en vórtex. Se filtrará con una jeringa de $0,22 \mu\text{m}$ y finalmente se preparará las soluciones de trabajo de 30mg L^{-1} y 50mg L^{-1} como lo menciona (Udayan & Arumugam, 2017).

3.3.4 Aplicación de las soluciones de trabajo de AIA

Se utilizó botellones de 6 litros e inóculos de 5×10^5 células mL^{-1} . En estos botellones se dispensaron 4 litros de agua purificada y fertilizante foliar Nitrofoska (30-10-10) (1 g L^{-1}). Las dos concentraciones de AIA fueron inoculadas al séptimo día durante la fase de aceleración del cultivo. El experimento fue evaluado durante 23 días en los cuales se tomó valores de densidad celular y densidad óptica.

Durante el proceso se colocó en cada botellón aireación constante (2 L/min, Presión 0.020 megapascuales (Mpa)), iluminación artificial con una irradiación de ($78,8 \mu\text{mol quantum m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a una temperatura controlada de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ (Arce , 2009).



Figura 9 Esquema del seguimiento de los cultivos bajo parámetros de luz azul A) día 0, B) día 7- inoculación de auxinas, C) día 23.



Figura 10 Esquema del seguimiento de los cultivos bajo parámetros de luz blanca A) día 0, B) día 7- inoculación de auxinas, C) día 23.

3.3.5 Variables del estudio

3.3.5.1 Potencial de hidrógeno (pH):

Se evaluó la variación de este parámetro en los tratamientos cada tres días para controlar que el valor no salga del rango de desarrollo (7-9).

3.3.5.2 Concentración celular y densidad óptica

Mediante una cámara de Neubauer, se contó los 4 cuadrantes (A, B, C, D), se realizó el conteo cada tres días y los datos se reemplazaron en la fórmula con el fin de obtener el valor resultante de concentración celular (células mL⁻¹) (Arredondo & Voltomina, 2007).

$$C = N \times 10^4 \times FD$$

Dónde:

- **C** = Concentración celular (células/mL).
- **N** = promedio del conteo celular de los cuadrantes (A, B, C, D).
- **10⁴**= factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL.
- **FD** = factor de dilución

Para medir la densidad óptica se utilizó un espectrofotómetro calibrado a 550 nm de absorbancia, el control se realizó cada tres días, con estos datos se elaboró las curvas de calibración para cada tratamiento. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones lineales, en donde y=densidad celular (células mL⁻¹), x=absorbancia (550 nm).

3.3.5.3 Cosecha de la biomasa

Para la cosecha se centrifugó la biomasa se procedió a centrifugar el contenido de los tratamientos a 2900 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El residuo se depositó en cajas Petri de vidrio estériles y se secó en una estufa a 35 °C durante 48 horas, la biomasa seca se colocó en un mortero y se trituro hasta obtener una textura fina, posteriormente la biomasa se colocó en tubos falco de 15 ml y se los almaceno en un refrigerador a 4°C.

3.3.6 Diseño Experimental

3.3.6.1 Factores

Se evaluó el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) en la producción de biomasa en cada biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3) y un testigo (0 mg L⁻¹) (Tabla2).

Tabla 2

Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3.

Tratamiento	Descripción	Codificación
T1	Biotipo 1 - con hormona - luz blanca	B1-CH-LB
T2	Biotipo 1 - con hormona - luz azul	B1-CH-LA
T3	Biotipo 1 - sin hormona - luz blanca	B1-SH-LB
T4	Biotipo 1 - sin hormona - luz azul	B1-SH-LA
T5	Biotipo 2 - con hormona - luz blanca	B2-CH-LB
T6	Biotipo 2 - con hormona - luz azul	B2-CH-LA
T7	Biotipo 2 - sin hormona - luz blanca	B2-SH-LB
T8	Biotipo 2 - sin hormona - luz azul	B2-SH-LA
T9	Biotipo 3 - sin hormona - luz blanca	B3-CH-LB
T10	Biotipo 3 - con hormona - luz azul	B3-CH-LA
T11	Biotipo 3 - con hormona - luz blanca	B3-SH-LB
T12	Biotipo 3 - sin hormona - luz azul	B3-SH-LA

3.3.6.2 Tratamientos

Se evaluó 4 tratamientos, (0 mg L⁻¹ y 30 mg L⁻¹) para el biotipo 1 y biotipo 3; ácido indol-3 acético en concentración de (50 mg L⁻¹) para el biotipo 2 y un testigo (0 mg L⁻¹), como se puede apreciar en la (Tabla 3).

3.3.6.3 Tipo de diseño

En la primera fase de laboratorio se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con 2 repeticiones.

3.3.6.4 Características de las unidades experimentales.

Se emplearon 12 botellones plásticos con capacidad de 6 litros, se colocó 4 litros de agua destilada con medio de cultivo Nitrofoska (1 g L⁻¹) y un inóculo inicial de 50 x 10⁵ células mL⁻¹ para cada biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3).

3.3.7 Análisis estadístico

Los análisis de datos obtenidos fueron analizados mediante el software estadístico Infostat.

3.3.8 Análisis funcional

Las variables evaluadas se calcularon mediante estadística descriptiva empleando ANOVA (análisis de varianza) para comparar diferencia entre medias. Se utilizó el test de Tukey como una prueba de múltiple comparación para demostrar si todos los tratamientos son estadísticamente iguales o no lo son.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción de las ecuaciones lineales para determinar densidad celular

El desarrollo de la densidad celular (células mL⁻¹) en la fase experimental se encuentra ilustrado en la (tabla 3). Las concentraciones de trabajo en los tres biotipos de *Chlorella* se inocularon en los cultivos al séptimo día durante la fase de aceleramiento.

En la siguiente tabla se observa la correlación entre la concentración celular y la densidad óptica para *Chlorella* biotipo 1, biotipo 2 y biotipo 3 con sus respectivos

tratamientos. Con esto es posible determinar la producción de biomasa indirectamente con la densidad óptica, para *Chlorella* biotipo 1 se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9279$, para *Chlorella* biotipo 2 el coeficiente de determinación fue de $R^2 = 0,8582$ y para *Chlorella* biotipo 3 el coeficiente de determinación corresponde a $R^2=0.93$.

Este modelo propuesto presenta un ajuste correcto a los datos experimentales para determinar con precisión los parámetros de crecimiento.

Tabla 3

Ecuaciones lineales para determinar densidad celular.

Tratamiento	Codificación	Concentración de AIA mg L ⁻¹	Ecuación	R ²
T1	LB A1-B1	30	$y = 0,022x + 0,0791$	$R^2 = 0,9279$
T2	LB A0-B1	0	$y = 0,0193x + 0,1472$	$R^2 = 0,809$
T3	LA A1-B1	30	$y = 0,0152x + 0,2084$	$R^2 = 0,3411$
T4	LA A0-B1	0	$y = 0,016x + 0,1127$	$R^2 = 0,743$
T5	LB A1-B2	50	$y = 0,0177x + 0,1281$	$R^2 = 0,8582$
T6	LB A0-B2	0	$y = 0,0202x + 0,2123$	$R^2 = 0,5183$
T7	LA A1-B2	50	$y = 0,0172x + 0,2088$	$R^2 = 0,6524$
T8	LA A0-B2	0	$y = 0,0181x + 0,1749$	$R^2 = 0,5433$
T9	LB A1-B3	30	$y = 0,0314x + 0,0383$	$R^2 = 0,9383$
T10	LB A0-B3	0	$y = 0,0223x + 0,3081$	$R^2 = 0,4414$
T11	LA A1-B3	30	$y = 0,0267x + 0,0884$	$R^2 = 0,8628$
T12	LA A0-B3	0	$y = 0,020x + 0,0791$	$R^2 = 0,8782$

y^1 = Densidad celular, x^2 = Absorbancia 550 nm, R^2 = Coeficiente de determinación

4.1.1 Evaluación de Parámetros productivos (densidad celular)

El análisis de varianza para densidad celular (células mL⁻¹) mostró efectos significativos en la interacción (biotipo x concentración de AIA) con un valor ($p=0.023$) menor a $p<0.05$ (Tabla 3).

El test de Tukey hasta el último día del experimento (día 23) presentó diferencias significativas entre los tratamientos; el tratamiento con mayor densidad celular fue el tratamiento 9 (biotipo 3-con hormona-luz blanca) con densidad celular

(44.62×10^6 células ml^{-1}), seguido por el tratamiento 1 (biotipo 1-con hormona-luz blanca) con densidad celular ($37,65 \times 10^6$ células ml^{-1}) y el tratamiento 5 (biotipo 2-con hormona-luz blanca) con densidad celular ($37,12 \times 10^6$ células ml^{-1}) superando significativamente a los tratamientos testigos *Chlorella* biotipo1 con densidad celular (7.57×10^6 células ml^{-1}), *Chlorella* biotipo 2 con densidad celular (5.32×10^6 células ml^{-1}) y *Chlorella* biotipo 3 con densidad celular (7.97×10^6 células ml^{-1}).

Tabla 4

Resultados de la prueba ANOVA para el parámetro densidad celular

F.V	SC	gL	CM	F	p-valor
Modelo	2897.53	13	222.89	4.42	0.0031
Tratamiento	2893.47	12	142.12	4.78	0.0023
Repeticiones	4.06	1	4.06	0.08	0.7802
Error	806.45	16	50.40		
Total	3703.98	29			

4.1.2 Evaluación de Parámetros productivos (Absorbancia)

Los datos de absorbancia obtenidos en el último día del ensayo presentaron diferencias significativas ($p=0.0134$) (tabla 4), destacándose el tratamiento 9 (biotipo3-con hormona-luz blanca) con una absorbancia de 1.668nm como mejor tratamiento en *Chlorella* biotipo 3, seguido por los tratamientos 1 en *Chlorella* biotipo 1 (biotipo1- con hormona - luz blanca) con una absorbancia de 0.970nm y en *Chlorella* biotipo 2 el tratamiento 5 (biotipo2-con hormona-luz blanca) con una absorbancia de 0.806nm, superando significativamente a los tratamientos testigos *Chlorella* biotipo 1 con absorbancia de 0.279nm, *Chlorella* biotipo 2 con absorbancia de 0.254nm y *Chlorella* biotipo 3 con absorbancia de 0.300nm.

Tabla 5

Resultados de la prueba ANOVA para la absorbancia

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.08	13	0.16	4.87	0.0019
Tratamiento	2.05	12	0.17	5.20	0.0014
Repeticiones	0.03	1	0.03	0.96	0.3429
Error	0.053	16	0.03		
Total	2.61	29			

4.1.2.1 Curva de desarrollo

Las curvas de desarrollo de la densidad celular (células mL⁻¹) a través del tiempo en los tratamientos evaluados están ilustradas en las (Figuras 16, 17 y 18).

En el presente experimento, se concluyó que la aplicación de ácido indol 3-acético AIA en la etapa de aceleramiento en *Chlorella* biotipo 1, *Chlorella* biotipo 2 y *Chlorella* biotipo 3 contribuye como un estímulo bioquímico que acelera el proceso de desarrollo celular y la producción de biomasa (Auz, 2019).

Para *Chlorella* biotipo 1, biotipo 2 y biotipo 3, se puede observar un aceleramiento en el desarrollo celular en todos los tratamientos hasta el día 18; en el último día de evaluación la densidad celular para los tres biotipos de *Chlorella* incrementó considerablemente en los tratamientos con inoculación de hormona y luz blanca; siendo *Chlorella* (biotipo 3 con hormona y luz blanca) la que alcanzó la mayor densidad celular (Figura 16,17 y18).

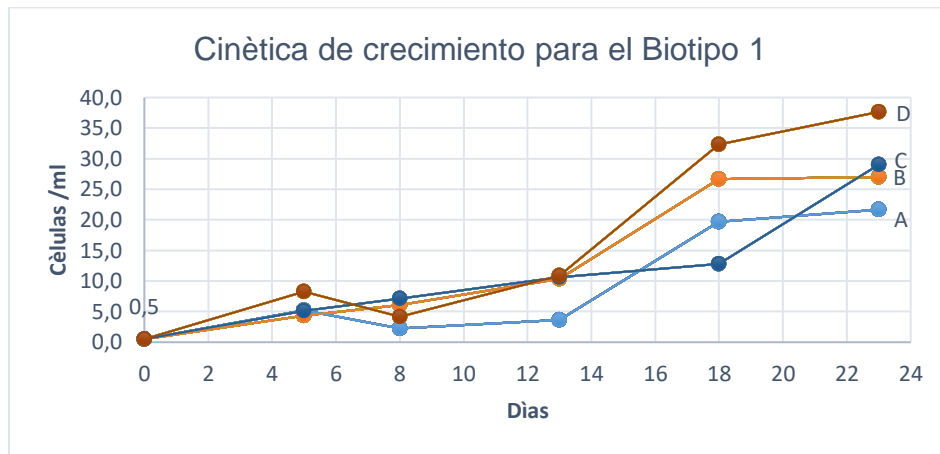


Figura 4 Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 1 con cada tratamiento. A) testigo con luz azul, B) tratamiento con hormona y luz azul, C) testigo con luz blanca y D) tratamiento con hormona y luz blanca.

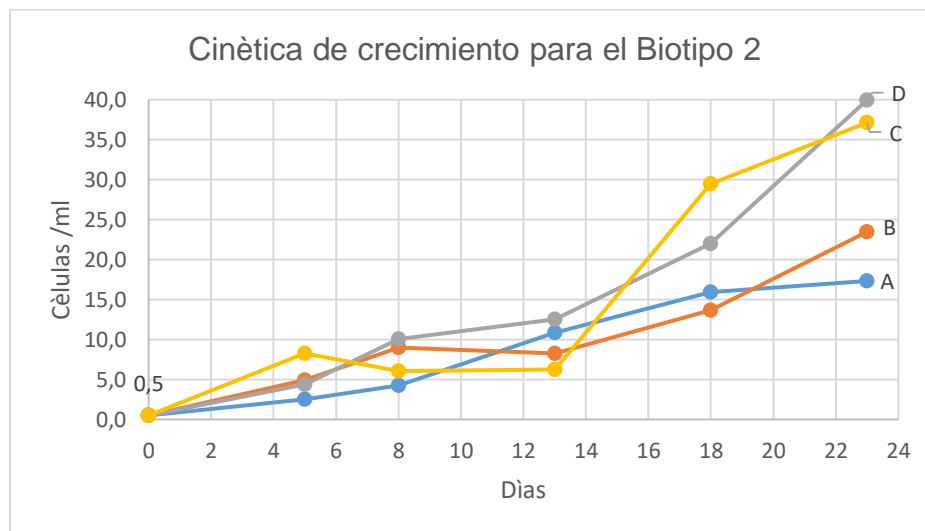


Figura 5 Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 2 con cada tratamiento. A) testigo con luz azul, B) tratamiento con hormona y luz azul, C) testigo con luz blanca y D) tratamiento con hormona y luz blanca.

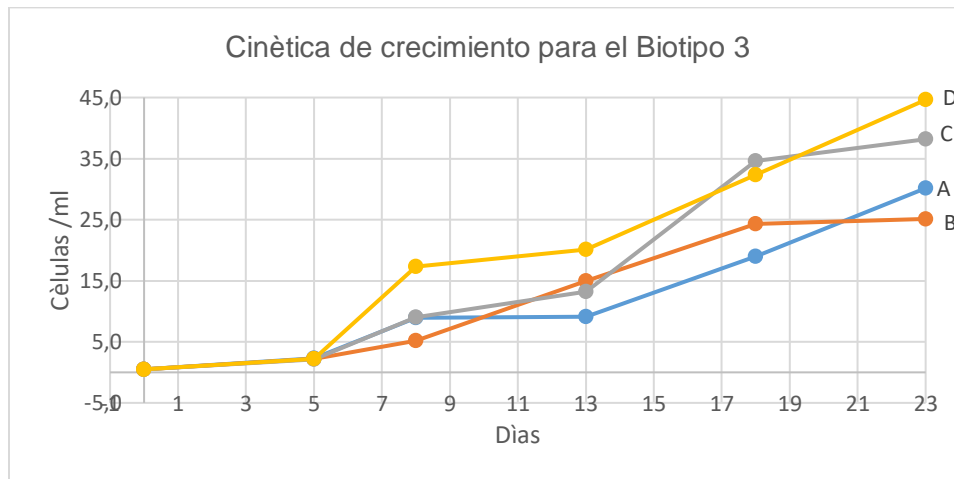


Figura 6 Gráfico de la cinética de crecimiento para el biotipo 3 con cada tratamiento. A) testigo con luz azul, B) tratamiento con hormona y luz azul, C) testigo con luz blanca y D) tratamiento con hormona y luz blanca.

Según Abiusi et al., (2013) en algunos tipos de microalgas se ha determinado cómo influyen los distintos espectros de luz en el proceso de división celular y síntesis bioquímica. Por ejemplo, el género *Chlorella sp.* responde ante la luz roja con un mayor desarrollo celular debido a que estimula la síntesis de enzimas y proteínas estructurales, mitocondriales, citoplasmáticas, direccionadas al crecimiento, mientras que la luz azul incrementa la producción de lípidos (Pérez & Fernández 2011). En varias investigaciones se ha demostrado un alto crecimiento e incremento de proteínas y carbohidratos con luz roja y azul.

En cuanto a los tratamientos con hormona y luz azul, para *Chlorella* biotipo 1 y *Chlorella* biotipo 3 se observa en el día 18 un declive en el crecimiento celular en comparación con los demás tratamientos. Según Arredondo & Voltolina (2007) ha demostrado que las microalgas tienen mayor crecimiento bajo luz azul y logran alcanzar la fase estacionaria con mayor rapidez que las microalgas irradiada con

luz blanca o luz roja, en este caso el resultado podría variar por el biotipo con el cual se trabajó.

Comparando el desarrollo celular entre los biotipos irradiados con luz azul, los resultados obtenidos muestran que *Chlorella* biotipo 1 tuvo un mejor desarrollo celular a comparación de *Chlorella* biotipo 2 y *Chlorella* biotipo 3; *Chlorella* biotipo 3 alcanzó la fase estacionaria más rápidamente que los demás tratamientos.

(Arce , 2009) menciona que la irradiación con luz azul es más energética que la luz blanca y la luz roja, logrando excitar los electrones de la clorofila, generando mayor asimilación de nutrientes e incrementado el crecimiento; sin embargo, esto puede incurrir en un desgaste temprano de energía debido a que el cultivo ha consumido la mayor parte de los nutrientes para desarrollarse.

Segùn Koc et al. (2013) en la producción de *Chlorella kessleri*, se utilizó luz roja para irradiar los cultivos y alcanzar una mayor densidad y peso celular, la luz azul incrementa un mayor tamaño celular y velocidad de crecimiento.

CAPÍTULO V

IMPACTO DEL ESTUDIO

La producción mundial de microalgas es de más de 100.000 especies, pero únicamente 200 especies son explotadas lo cual significa una producción de 7.000 toneladas anuales. Sin embargo, a partir del año 2015 se ha visto un incremento en la producción de estos microorganismos y se espera un crecimiento elevado en los próximos años (García, 2014).

Según la revista *Agriculturers* (2020) las microalgas apuntan a convertirse en la agroindustria del futuro con una producción incipiente donde el potencial de empleo de su biomasa es enorme y se comercializa a diversos sectores. Como parte de la economía circular permite aprovechar efluentes y residuos de diferentes procesos de la industria alimentaria como el lactosuero, zumos, pulpas y líquido de frutas y verduras no comercializadas. El aprovechamiento integral de la biomasa para la obtención de productos de valor añadido para los distintos sectores industriales, tales como la industria química, cosmética, farmacéutica, nutracéutica, energética, sector agropecuario y la industria alimentaria como alimento en humanos y nutrición animal (Alvear , Castillo, & Henao, 2011).

Su uso como alimento en humanos se inclina por suplementos dietéticos en forma de pastilla o polvo de *Chlorella* y *Spirulina*, como fuente de proteína, antioxidantes, vitaminas y minerales o la producción de ácidos grasos omega 3 (DHA y EPA) y colorantes naturales (Villafuerte, 2016). Actualmente ya se fabrican diversos alimentos que incorporan las microalgas o algún compuesto derivado, como es el caso de algunas bebidas funcionales, galletas, alimentos infantiles o postres.

La creciente necesidad por una mayor producción de compuestos bioactivos exigen un mayor desarrollo industrial, mismo que implica desgastar más la tierra (Asuthkar, Gunti, Rao, & Yadavalli, 2016). En este sentido, un sistema de cultivo de

microalgas perfectamente se puede levantar en tierras erosionadas con lo cual se reduce la explotación de tierras fértiles; al ser un cultivo artesanal no requiere tecnología ni grandes maquinarias permitiendo potencializar el desarrollo económico de las zonas agrícolas ganaderas sin altos costos de inversión.

Tomando en cuenta que cada día aumenta la población en el mundo y cada vez se requerirán más alimentos, existe la responsabilidad de suplir este requerimiento teniendo presente la soberanía alimentaria de las zonas, el derecho a un trabajo digno y justo; el cultivo de microalgas permitiría cubrir un porcentaje de esta demanda, contribuiría en el reemplazo de productos químicos y artificiales utilizados en la agroindustria por metabolitos de origen natural lo cual beneficiaría a toda la cadena productiva (Antoun, Bashan, & de-Bashan, 2008).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- La aplicación del ácido indol 3- acético AIA (30 mg L⁻¹) en *Chlorella* Biotipos 1 y 3, y (50 mg L⁻¹) en *Chlorella* Biotipo 2 aceleró el desarrollo de los cultivos incrementando significativamente la multiplicación celular y la obtención de biomasa.
- La irradiación de los cultivos con luz azul permitió un desarrollo celular homogéneo, sin embargo, luego de 15 días generó un desgaste de energía provocando un declive en el desarrollo celular en *Chlorella* biotipo 1, *Chlorella* biotipo 2 y *Chlorella* biotipo 3, entre los días 14 y 18.
- La irradiación de los cultivos con luz blanca generó un aumento exponencial en el desarrollo celular y desarrollo de biomasa en los tres biotipos de *Chlorella* evaluados, al final de experimento, no se evidenció desgaste energético.
- Se realizaron las curvas de desarrollo de densidad celular en los tres tratamientos, en todos los tratamientos hasta el día 18 se observó un aceleramiento en el desarrollo celular; sin embargo, el último día de evaluación la densidad celular para los tres biotipos de *Chlorella* incrementó considerablemente en los tratamientos con inoculación de hormona y luz blanca; siendo *Chlorella* (biotipo 3 con hormona y luz blanca) la que alcanzó rápidamente la fase estacionaria y la mayor densidad celular más entre los tratamientos.

- Las curvas de desarrollo de densidad celular para los tratamientos con hormona y luz azul en *Chlorella* biotipo 1 y *Chlorella* biotipo 3 muestran en el día 18 un declive en el crecimiento celular en comparación con los demás tratamientos.
- El modelo cinético propuesto para *Chlorella* biotipo 1, *Chlorella* biotipo 2 y *Chlorella* biotipo 3, permite hacer el seguimiento de la cinética de crecimiento. Estos parámetros cinéticos contribuyen a establecer bases para el diseño de foto biorreactores y permitirían a futuro el escalamiento del proceso productivo a nivel industrial.

6.2 Recomendaciones

- Analizar el perfil lipídico de los tratamientos con AIA irradiados con luz azul y blanca para evaluar su aplicación en la industria alimentaria. Se requiere tomar en cuenta las estrictas normas de seguridad alimentaria, por tanto, se deben realizar ensayos de toxicidad entre otros especificados en las normas ecuatorianas, sin embargo, éstas pueden ser consideradas para alimentación animal (Markou, Vandamme, & Muylaert, 2014).
- Investigar el papel de diferentes tipos de auxinas en la productividad de los tres biotipos de *Chlorella sp.* y comparar la producción de metabolitos secundarios sean estos, proteína, lípidos, y pigmentos fotosintéticos
- Evaluar el efecto del AIA en la productividad y obtención de clorofila y carotenoides en los tres biotipos de *Chlorella sp.* y determinar su aplicabilidad como colorantes naturales en alimentos (Auz, 2019).

6.1 Referencias

- Agriculturers. (2020). Red de especialistas en agricultura. Microalgas la agroindustria del futuro. Obtenido de <https://agriculturers.com/microalgas-la-agroindustria-del-futuro/>
- Alsenani, F., Wass, T., Ma, R., Eltanahy, E., Netze, M., & Schenk, P. (2019). Transcriptome-wide analysis of *Chlorella* reveals auxin-induced carotenogenesis pathway in green microalgae. *Algal Research*, 37, 320-335.
- Alvear, M., Castillo, C., & Henao, D. (2011). Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Universidad de Cartagena Trabajo de grado.
- Antoun, H., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. in promoting growth of *chlorella vulgaris*. *Phycological Society of America*, 44, 938–947.
- Arce, M. (2009). Normal climática y distribución de la precipitación de la hacienda El Prado-IASA. *Serie Zoológica*, 4(5), 126-128.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. La Paz, Baja California, México: Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Asuthkar, M., Gunti, Y., Rao, R., & Yadavalli, R. (2016). Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 1000-1005.
- Auz, E. (2019). "Efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la producción de metabolitos de *Chlorella* sp.". En E. Auz.
- Bashan, Y. H.-B. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can. J. Microbiol.* 50.

- Batista, A., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Borowitzka, M. A. (2018). *Biology of Microalgae. Microalgae in Health and Disease Prevention*, 23-72.
- Cerón, M. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *CEA05*, 83-101.
- Charlotte, F., François, C., & Travers. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine drugs*, 14(159), 1-27.
- Enzing, C. P. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Obtenido de JRC SCIENTIFIC AND POLICY REPORTS: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC85709/final%20version%20online%20ipts%20jrc%2085709.pdf>
- Espinoza, F. M. (2017). Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados? *Ciencia*, 68(2), 2-5.
- Galal, A. A., Reda, R. M., & Abdel-Rahman Mohamed, A. (2018). Influences of *Chlorella vulgaris* dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of penoxsulam herbicide. *Fish and Shellfish Immunology*, 77, 445-456.
- Ganuza, E., Sellers, C., Bennett, B., Lyons, E., & Carney, L. (2016). A Novel Treatment Protects *Chlorella* at Commercial Scale from the Predatory Bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Frontiers in microbiology*(7).
- García, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Sevilla: Universidad de Sevilla Consejo de investigaciones científicas(España):Tesis Doctoral .
- González, A. (2015). ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. *Cajamar ADN Agro*(11), 1-11.

- Guaman Burneo, M. C., & Gonzáles Romero, N. P. (2016). Biodiversidad de los principales géneros de microalgas y cianobacterias encontradas en los sistemas lacustres de áreas protegidas de los andes y amazonía del Ecuador. Quito: Corporación para la investigación energética.
- Halim, R. D. (2012). "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review", *Biotech. Adv.*, vol. 30, pp. 709-732, May.-Jun. 2012.
- Halima, N. (2017). Why is it important to use algae in aquaculture? *Biochem Biotech*, 1(1), 11-13.
- Helm, M. (2004). Hatchery culture of bivalves. Roma: Food and agriculture organization of the united nations.
- Hubert, P., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A New Insight into Cell Walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25, 333-371.
- Jäger, K. (2 de Agosto de 2015). Huella ecológica: la sobreexplotación de la Tierra. Obtenido de <https://www.dw.com/es/huella-ecol%C3%B3gica-la-sobreexplotaci%C3%B3n-de-la-tierra/a-18645079>
- Janssen, M. G. (2002). Cultivation of microalgae:effect of light/dark cycles on biomass yield. Wageningen: Wageningen University.
- Jusoh, M., Hong Loh, S., Aziz, A., San Cha, T., & Seng Chuah, T. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content, fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. *Phytochemistry*, 111, 65-71.
- Jusoh, M., Hong, S., Seng, T., Aziz, A., & San, T. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content, fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. *Phytochemistry*, 65–71.
- Lissarrague, J., Baeza, P., & Sánchez, P. (2010). La Fotosíntesis. Universidad Politécnica de Madrid. Obtenido de <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos/Fotosintesisvid.pdf>

- Liu, J., Qiu, W., & Song, Y. (2016). Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Research*, 273–280.
- Lores, H. (2015). Estudio a escala piloto del efecto de diferentes condiciones de operación sobre la eliminación de nutrientes en un cultivo de microalgas. Universidad Politécnica de València: Trabajo final de master.
- Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends Plant Sci*, 20(5), 273-282.
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186-202.
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). *Photosynthesis in Microalgae*. Blackwell Publishing Ltd, 21-36.
- Medina, A., Piña, P., Nieves, M., Arzola, J., & Guerrero, M. (2012). La importancia de las microalgas. *Conabio*(103), 1-5.
- Miażek, K., & Ledakowicz, S. (2013). Chlorophyll extraction from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach. *Int J Agric & Biol Eng*, 6(2), 107-115.
- Ozioko, F., Chiejina, N., & Ogbonna, J. (2015). Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. *African Journal of Biotechnology*, 14(30), 2367-2376.
- Pachacama Moreno, L. E. (2016). "Uso de microalgas endémicas del Ecuador *Chlorella* sp. Y *Synechocystis* sp., Para el tratamiento de aguas residuales de planteles porcícolas, a nivel de laboratorio". Obtenido de <http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/19-Microalgas-Tratamiento-Aguas-Residuales-Porc%C3%ADcolas.pdf>
- Piotrowska, A., & Bajguz, A. (2014). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regul*, 73, 57-66.
- Ramírez, M., Rendón, L., & Vélez, Y. (2013). *Microalgas para la industria alimenticia*. Universidad Pontificia Bolivariana.

- Ren, X., Zhao, X., Turcotte, F., Deschênes, J., Tremblay, R., & Jolicoeur, M. (2017). Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 26.
- Richmond, A. (2004). *Microalgal culture biotechnology and applied phycology*. Iowa: Blackwell Science Ltd.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. España: Universidad Politecnica de Valencia.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., & Vaca, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Sánchez, E. O. (2011). "Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pinch analysis of heat integration". *Chem. Eng. J.*, vol. 176–177.
- Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper.
- Stirk, W., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., . . . van Staden, J. (2014). Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 66-76.
- Strickland, J., & Parsons, T. (1972). *A practical Handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries research board of Canada .
- Surindra, S., & Verma, R. (2018). Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. *Process Safety and Environmental Protection*, 113, 141–148.
- Tipan, M. (2017). *Uso de microalgas endémicas del Ecuador (Chlorella sp. Biotipo 3) en la bioacumulación de insecticidas a nivel de laboratorio*. Universidad de las fuerzas armadas (ESPE) Tesis de grado.
- Torrentera, L., & Tacon, A. (1989). Cultivo de microalgas en la producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. FAO-

- Documento de campo 12. . Obtenido de <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-microalgas/>
- Udayan, A., & Arumugam, M. (2017). Selective Enrichment of Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in *N. oceanica* CASA CC201 by Natural Auxin Supplementation. *Bioresource Technology*.
- Villafuerte, G. (2016). Uso de *Chlorella sorokiniana* biotipo 1 en dietas balanceadas para tilapia roja. Obtenido de <http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/20-Chlorella-en-Dietas-de-Tilapia-Roja-Gabriel-Villafuerte.pdf>
- Xingfeng, H., Bartocci, P., Yunjun, Y., Fantozzi, F., & Yan, Y. (2018). Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *fermentation*, 4(2).
- Yu, Z., Song, M., Pei, H., Jiang, L., Hou, Q., Nie, C., & Zhang, L. (2017). The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae. *Bioresource Technology*, 239, 87-96.
- Zhang, X., Amendola, P., Hewson, J., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved. *Bioresource Technology*, 116, 477–484.

