



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la producción de metabolitos secundarios por microorganismos fotosintéticos.

Informe Final del Trabajo de Titulación, opción de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Christian Josué Lalaleo Camino

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Febrero – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.
Ambato, 12 de enero del 2024

PhD. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Christian Josué Lalaleo Camino, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las referencias bibliográficas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josue J. M.' with a stylized flourish at the end.

Christian Josué Lalaleo Camino

1804456216

AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josue', with a large, stylized flourish extending from the end of the signature.

Christian Josué Lalaleo Camino

1804456216

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

1804256905

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

1802726628

Ambato, 6 de febrero de 2024

DEDICATORIA

A mi familia, por brindarme su apoyo constante y ser parte de mis logros alcanzados.

A mis padres, Fernando y Cecilia, por ser un sostén fundamental en mi vida y enseñarme a enfrentar cada desafío.

A mis sobrinos, Josué y Said, quienes han sido mi motivación y aliento para seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio, Vivian, Alex, Dania, Erick, Kathy y Karlita, quienes compartí gran parte de mi tiempo y me brindaron su apoyo y amistad incondicional.

A mis amigos Eder, Carillo, Licha, Nath y Sello, quienes forman parte de mi vida y los llevaré en mi corazón.

A mi mascota “gatito”, quien fue mi soporte y compañía durante largas noches.

Christian J. Lalaleo Camino

AGRADECIMIENTO

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria

A mi tutor, Mario García y a la docente Liliana Cerda, quienes han sido guías fundamentales en el desarrollo de esta investigación. Gracias por su apoyo, paciencia y orientación.

A la Universidad Técnica de Ambato, que ha sido mi pilar fundamental para mi formación tanto profesional como personal, forjándome como un individuo íntegro y valioso para la sociedad.

A todos mis compañeros y profesores de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por los momentos y experiencias brindadas.

Christian J. Lalaleo Camino

ÍNDICE GENERAL DE CONETIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DEL AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONETIDOS.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Introducción.....	1
1.1.2. Panorama de metabolitos primarios y secundarios a escala mundial.....	3
1.1.2.1. Demanda e impacto ambiental.....	3
1.1.2.2. Fuentes naturales de metabolitos primarios y secundarios.....	4
1.1.3. Producción de metabolitos primarios y secundarios a partir de microorganismos fotosintéticos.....	7
1.1.3.1. Generalidades de los microorganismos fotosintéticos.....	7
1.1.3.2. Potencial biotecnológico de los microorganismos fotosintéticos.....	9
1.1.3.3. Obtención de metabolitos primarios y secundarios a partir de microorganismos fotosintéticos.....	10
1.1.3.4. Condiciones óptimas de cultivo para la producción de metabolitos.....	11

1.2.	Objetivos	15
1.2.1.	Objetivo general	15
1.2.2.	Objetivos específicos	15
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		16
2.1.	Materiales	16
2.1.1.	Equipos de laboratorio	16
2.1.2.	Reactivos	17
2.1.3.	Material fungible.....	17
2.2.	Métodos.....	18
2.2.1.	Preparación de inóculos	18
2.2.2.	Condiciones de cultivo CLMR1 empleando distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono	19
2.2.3.	Determinación de la curva de crecimiento celular.....	20
2.2.4.	Evaluación del contenido de proteínas totales	20
2.2.5.	Evaluación del contenido de carbohidratos totales	21
2.2.6.	Evaluación del contenido de pigmentos.....	22
2.2.7.	Diseño experimental.....	22
2.2.8.	Análisis de datos	24
2.2.9.	Análisis morfológico mediante microscopio óptico	24
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		25
3.1.	Análisis y discusión de datos	25
3.1.1.	Evaluación de la cinética de crecimiento	25
3.1.2.	Evaluación de la cantidad de proteína contenida en la biomasa de microorganismos fotosintéticos	30

3.1.3. Evaluación de la cantidad de carbohidratos contenidos en la biomasa de microorganismos fotosintéticos	34
3.1.4. Evaluación de la cantidad de clorofila contenida en la biomasa de microorganismos fotosintéticos	37
3.1.5. Evaluación de la cantidad de carotenoides contenidos en la biomasa de microorganismos fotosintéticos	40
3.1.6. Análisis morfológico mediante microscopía.....	46
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
4.1. Conclusiones	50
4.2. Recomendaciones.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición bioquímica de las fuentes nutricionales tradicionales con las especies más usadas en la industria de microalgas y cianobacterias</i>	6
Tabla 2. <i>Diseño experimental propuesto para la generación de biomasa y metabolitos secundarios de microorganismos fotosintéticos utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.....</i>	23
Tabla 3. <i>Densidad celular obtenida en el 16 día con BBM suplementado con cuatro diferentes concentraciones de NaNO₃ y tres distintas fuentes de carbono.....</i>	27
Tabla 4. <i>Promedio de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por CLMR1 empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.....</i>	44
Tabla 5. <i>Intervalos de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por CLMR1 empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.....</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Organización celular de microorganismos fotosintéticos.....</i>	8
Figura 2. <i>Especies de microorganismos fotosintéticos con mayor demanda en la industria</i>	10
Figura 3. <i>Curva de crecimiento del aislamiento CLMR1.</i>	26
Figura 4. <i>Curva de la concentración de proteína producidos a partir del aislamiento CLMR1.</i>	31
Figura 5. <i>Curva de la concentración de carbohidratos producidos a partir del aislamiento CLMR1.</i>	34
Figura 6. <i>Curva de la concentración de clorofila y carotenoides producidos a partir del aislamiento CLMR1</i>	38
Figura 7. <i>Curva de la concentración de carotenoides producido a partir del aislamiento CLMR1</i>	41
Figura 8. <i>Morfología celular del aislamiento CLMR1 a lo largo de su fase de crecimiento vista desde un microscopio binocular (100x). Se representa la morfología de cada tratamiento aplicando distintas concentraciones de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5 g/L), además de las diferentes fuentes de carbono: (C1) CO₂, (C2) CO₂ + EG, (C3) CO₂ + NaOAc. Las fotografías corresponden a los días 2, 5, 8, 12 y 16 del cultivo.</i>	49

RESUMEN EJECUTIVO

El crecimiento poblacional mundial ha impulsado la demanda de recursos alimentarios, causando un impacto ambiental negativo mediante la expansión de la agricultura y la ganadería. En respuesta, los microorganismos fotosintéticos se han destacado como fuente alternativa de compuestos bioactivos, como proteínas, carbohidratos y pigmentos.

Este proyecto evaluó el impacto del carbono y del nitrógeno en la cinética de crecimiento, producción de proteínas, carbohidratos y pigmentos del aislamiento CLMR1, así como su influencia en la morfología celular. Se realizaron cultivos autotróficos y mixotróficos, utilizando dióxido de carbono con dos fuentes de carbono orgánicas (etilenglicol y acetato de sodio) y diferentes concentraciones de nitrato de sodio (0, 0.625, 1.25 y 2.5) gramos por litro

Los resultados más destacados se observaron en el cultivo con 2.5 gramos por litro de nitrato de sodio y etilenglicol, logrando la mayor concentración celular (21,000,000 células por mililitro), máxima cantidad de carbohidratos (1015.78 microgramos por mililitro) y la síntesis más elevada de clorofila y carotenoides (0.274 y 0.207 microgramos por mililitro). Además, el tratamiento con 2.5 gramos por litro de nitrato de sodio y acetato de sodio produjo la mayor concentración de proteína (2.31 microgramos por mililitro). No obstante, los cultivos sin nitrato de sodio mostraron la síntesis más baja de cada metabolito y la mínima producción de biomasa (200,000 células por mililitro) . Se evidenciaron cambios morfológicos en las células, destacando la importancia de las condiciones óptimas de cultivo para la síntesis de metabolitos y su aplicación en la producción sostenible de biomoléculas de alto valor.

Palabras clave: Microbiología, metabolitos primarios y secundarios, microorganismos fotosintéticos, cultivo mixotrófico, morfología,

ABSTRACT

Global population growth has driven demand for food resources, causing a negative environmental impact through the expansion of agriculture and livestock farming. In response, photosynthetic microorganisms have been highlighted as an alternative source of bioactive compounds, such as proteins, carbohydrates, and pigments.

This project evaluated the impact of carbon and nitrogen on the growth kinetics, production of proteins, carbohydrates, and pigments of the CLMR1 isolate, as well as its influence on cell morphology. Autotrophic and mixotrophic cultures were carried out, using carbon dioxide with two organic carbon sources (ethylene glycol and sodium acetate) and different concentrations of sodium nitrate (0, 0.625, 1.25 and 2.5) grams per liter.

The most outstanding results were observed in the culture with 2.5 grams per liter of sodium nitrate and ethylene glycol, achieving the highest cell concentration (21,000,000 cells per milliliter), maximum amount of carbohydrates (1015.78 micrograms per milliliter) and the highest synthesis of chlorophyll. and carotenoids (0.274 and 0.207 micrograms per milliliter). Additionally, treatment with 2.5 grams per liter of sodium nitrate and sodium acetate produced the highest protein concentration (2.31 micrograms per milliliter). However, cultures without sodium nitrate showed the lowest synthesis of each metabolite and the minimum biomass production (200,000 cells per milliliter). Morphological changes were evident in the cells, highlighting the importance of optimal culture conditions for the synthesis of metabolites and their application in the sustainable production of high-value biomolecules.

Keywords: Microbiology, primary and secondary metabolites, photosynthetic microorganisms, mixotrophic culture, morphology.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Introducción

La ingesta adecuada de proteínas y carbohidratos es esencial para mantener una buena alimentación. De tal manera, las proteínas son importantes para la reconstrucción y reparación de tejidos, la producción de enzimas, hormonas, entre otras moléculas. De igual importancia, los carbohidratos proporcionan energía a las células del cuerpo, son indispensables para ciertas actividades biológicas e incluso actúan como antibióticos naturales (Szklairek et al., 2022). Por lo tanto, estos dos macronutrientes son necesarios para el adecuado funcionamiento del cuerpo humano (Piguave & Martínez, 2021).

La **Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018)** recomienda elegir fuentes saludables de carbohidratos y proteínas, tales como frutas, verduras, legumbres, carne, pescado o lácteos. El consumo de estos productos se basa en productos de la agricultura y ganadería, los cuales han generado una crisis ambiental, debido a que para sostener una producción que abastezca las necesidades de la sociedad, se necesita deforestar extensiones considerables de terreno, además del uso de pesticidas o agentes químicos que afectan en la calidad y fertilidad del suelo y la salud del medio ambiente. El uso de estos recursos se eleva al nivel que demanda la creciente población global, la cual se prevé que alcance los 9 mil millones de personas para el año 2050 (Izquierdo, 2017; Fetanat et al., 2021). Dichos productos tienden a lixiviarse y contaminar fuentes de agua superficial y subterránea, arrastrando así macronutrientes (N, P y K) antibióticos y promotores hormonales provenientes del sector agrícola y ganadero (Beatriz et al., 2019).

Los microorganismos fotosintéticos son un recurso natural que, en comparación con los productos de la agricultura y ganadería convencional, presentan diversas ventajas como la tolerancia a las aguas residuales, producción de metabolitos primarios y secundarios de

alto valor, alta tasa de crecimiento, bajos requerimientos nutricionales, bajo impacto ambiental y espacio reducido para su desarrollo.

Los microorganismos son cultivados comúnmente en fotobiorreactores con el fin de controlar las condiciones del cultivo (**Estévez, 2021**). Para ello, los insumos mínimos que debe tener fotobiorreactor es un medio de cultivo estable, y sistemas de control de la temperatura, pH, intensidad de luz, concentración y suministro de CO₂ o macro y micronutrientes, agitación neumática, entre otros (**Zhao & Huang, 2021**). La optimización de estos factores a escala de laboratorio es indispensable para alcanzar un mayor crecimiento y producción de metabolitos de interés. Además, los microorganismos fotosintéticos no requieren de ningún tipo de fertilizante, ni compiten por el espacio de suelo cultivable (**Salgueiro & Fernández, 2018; Rumin et al., 2020**). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (**FAO**) (**2021**), destaca el potencial de los microorganismos fotosintéticos como una fuente de alimento sostenible y nutritiva para el futuro debido a su alto contenido de macronutrientes como proteínas, carbohidratos y compuestos antioxidantes. De esta manera, el desarrollo de sistemas enfocados en la obtención de metabolitos de microorganismos fotosintéticos tiene un alto impacto en la industria alimentaria, médica y ambiental.

Según **Transparency Market Research, (2018)**, se prevé que, para el período 2021 a 2031 la industria de las microalgas aumente exponencialmente debido a la venta de productos nutracéuticos y suplementos dietéticos. De tal manera, el mercado global dedicado al cultivo de microorganismos fotosintéticos alcanzará los 4.2 mil millones de dólares para el año 2031. Esto indica que el cultivo de microorganismos fotosintéticos puede convertirse en una de las industrias sólidas a futuro, ya que presentan beneficios gracias a la amplia gama de aplicaciones (**FAO, 2021; Tang et al., 2020**). Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, en la presente investigación se planea la caracterización de la producción de metabolitos primarios y secundarios de microorganismos fotosintéticos aislados a partir de muestras ambientales con la finalidad de cuantificar su capacidad de producir proteínas, carbohidratos y pigmentos, alterando las condiciones de cultivo.

1.1.2. Panorama de metabolitos primarios y secundarios a escala mundial

1.1.2.1. Demanda e impacto ambiental

La obtención de metabolitos a través de fuentes naturales, tales como las proteínas y carbohidratos, corresponden principalmente a la producción agrícola y productos cárnicos. En este contexto, la producción mundial agrícola cual alcanzó un total del 9.6 millones de toneladas en 2022, creciendo así un 56 % con respecto al año 2000. Por otro lado, la producción mundial de productos cárnicos (derivado de pollos, cerdo, vacuno, oveja y búfalo) fue de 333 millones de toneladas **(FAO, 2023a)**

Sin embargo, su producción a gran escala a través de la agricultura y ganadería presenta varios problemas, que incluyen el uso descontrolado de pesticidas, fertilizantes y una demanda cada vez más grande de suelo arable o apto para la ganadería **(Howard et al., 2021; Mohan et al., 2022)** Como consecuencia, estas prácticas han ocasionado el deterioro de fuentes de agua superficial y subterránea, han contribuido a la contaminación atmosférica y cambio climático, y han promovido el desarrollo de organismos patógenos resistentes **(Henchion et al., 2017)**. De acuerdo con la **FAO, (2023)** los contaminantes agrícolas más preocupantes para la salud humana son los patógenos del ganado, plaguicidas, nitratos en las aguas subterráneas, oligoelementos metálicos y los contaminantes emergentes, incluyendo antibióticos y genes resistentes a los antibióticos.

Cada año, se aplican aproximadamente 4.6 millones de toneladas de pesticidas químicos en todo el mundo, afectando la salud del medio ambiente y de los seres humanos. Aunque los países en desarrollo contribuyen con el 25 % del uso global de pesticidas en la agricultura, lamentablemente, representan el 99 % de las fatalidades asociadas con su utilización a nivel mundial **(FAO, 2023c)**. Los efectos negativos de la ganadería en la calidad del agua y la contaminación ambiental son significativos. Estos efectos se manifiestan desde la producción de alimentos y forraje para animales hasta la conversión de productos derivados de la ganadería. Se calcula que la actividad ganadera es

responsable del 18 % del conjunto de emisiones de gases de efecto invernadero producidas a nivel global (**Zambrano et al., 2021**). Cabe mencionar que, la superficie destinada a la agricultura a nivel mundial es de aproximadamente 5000 megahectáreas, esto significa el 30 % del total de la superficie terrestre mundial (**FAO, 2023b**). No obstante, el 90 % de la deforestación a nivel mundial es causada por la agricultura, siendo América del sur, Asia y África las principales zonas que sufren la pérdida de biomasa.

1.1.2.2. Fuentes naturales de metabolitos primarios y secundarios

El principal suministro de proteínas está influenciado por fuentes vegetales, el cual representa el 57 % de la producción total de proteínas a nivel mundial, seguido de los productos cárnicos (18 %), los lácteos (10 %), subproductos de origen animal (8 %) y mariscos (6 %) (**Nehete et al., 2013**). De tal manera, las fuentes de proteína de origen vegetal destacan las verduras, las legumbres y las frutas. La soja es la fuente de proteína vegetal más importante debido a la alta cantidad de aminoácidos esenciales y compuestos bioactivos que presenta, los cuales son necesarios para la elaboración de alimentos y piensos (**Michelfelder, 2009**). Sin embargo, la producción industrial de soja representa un grave problema para el medio ambiente, ya que, su cultivo afecta en la degradación del suelo, el uso desmedido de agua y la contaminación que conlleva (**Henchion et al., 2017**).

Por otro lado, los carbohidratos son compuestos que abundan en la naturaleza, los cuales están presentes en verduras, cereales, productos lácteos y frutas. Las fuentes más importantes en la industria a nivel mundial son el maíz, el arroz, la yuca, el trigo y los tubérculos (**Rozi et al., 2023**). En concreto, el cultivo de arroz es la principal fuente de alimentación en países asiáticos, siendo consumido por más de la mitad de la población mundial, ocupando un 10% de tierras fértiles del planeta. Dicha fuente es rica en almidón, el cual puede ser usado en la producción de alimentos procesados, papel, textiles, productos de panadería, entre otros (**Saravanan et al., 2024**).

En lo que respecta con los pigmentos, en los últimos años ha habido una creciente demanda por los pigmentos de origen natural debido a sus compuestos bioactivos, los cuales pueden ser usados en áreas de farmacología y toxicología, industrias textiles, de impresión, pesqueras y lácteas. **(Di Salvo et al., 2023)**. En cambio, los tintes sintéticos tienen efectos negativos en la salud, ya que son altamente cancerígenos, no biodegradables y no aportan un agradable sabor en los alimentos **(Jiménez et al., 2020)**. De tal manera, las plantas y los microorganismos son las principales fuentes de pigmentos naturales, son amigables con el medio ambiente ya que son biodegradables y presentan cualidades terapéuticas tales como antioxidantes, antimutagénicos, antirreumáticos, y antiinflamatorios **(Singh et al., 2023)**. Sin embargo, la producción de pigmentos proveniente de las plantas presenta diversas desventajas como la sensibilidad a la luz, al pH y escasa solubilidad en agua. Por otro lado, la producción de pigmentos por microorganismos como las microalgas puede ser más eficiente, ya que no se ven severamente afectadas por el cambio climático, las condiciones de cultivo son controladas y suelen propagarse rápidamente **(de Souza et al., 2021)**.

Por lo tanto, este escenario plantea la necesidad de impulsar el desarrollo de nuevas tecnologías dirigidas a obtener compuestos bioactivos de una manera eficiente y sostenible para el futuro **(García et al., 2018)**. Varios estudios sostienen que los microorganismos fotosintéticos poseen las principales fuentes de nutrientes y compuestos activos necesarios para el desarrollo de animales y seres humanos, además de una productividad superior a la de la mayoría de las plantas y productos animales **(Del Carmen & García, 2013)**. De tal manera, la Tabla 1 presenta los porcentajes tanto de proteína como carbohidratos producidos por distintas especies de microorganismos fotosintéticos y se compara con las fuentes naturales tradicionales consumidas diariamente. De hecho, *Spirulina máxima* es el microorganismo fotosintético que más porcentaje de proteína presenta, en comparación con las especies de microalgas y cianobacterias presentadas. En cambio, *S. máxima* contiene aproximadamente 65% más de proteína en comparación la cantidad que se encuentra en la carne. Por otro lado, *Porphyridium cruentum* puede contener hasta un 57 % de carbohidratos. Aunque su

contenido sea mayor el de fuentes nutricionales convencionales (leche y soja), el arroz contiene un 35 % más de carbohidratos

Tabla 1. Composición bioquímica de las fuentes nutricionales tradicionales con las especies más usadas en la industria de microalgas y cianobacterias

Especie	Composición bioquímica		Referencias
	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	
Carne	43	1	(Del Carmen & García, 2013)
Leche	26	38	(Del Carmen & García, 2013)
Soja	37	30	(Del Carmen & García, 2013)
Arroz	8	77	(Del Carmen & García, 2013)
Microalgas			
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	12 - 17	(Becker, 2007)
<i>Dunaliella. salina</i>	57	32	(Becker, 2007)
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	(Becker, 2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	(Rendón et al., 2015)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	27	(Niccolai et al., 2019)
<i>Tetraselmis chunii</i>	31 - 46	25	(Brown, 1991)
<i>Botryococcus braunii</i>	39 – 40	19 - 31	(Tibbetts et al., 2015)
<i>P. cruentum</i>	28- 39	40 - 57	(Becker, 2007)
Cianobacterias			
<i>S. máxima</i>	60 - 71	13 – 16	(Becker, 2007)

Nota. Se presenta la comparación de la composición bioquímica de las fuentes más representativas de proteínas y carbohidratos con algunas especies de microalgas y cianobacterias. Adaptado de *Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition* por, **Barkia et al., 2019**, MDPI.

1.1.3. Producción de metabolitos primarios y secundarios a partir de microorganismos fotosintéticos

1.1.3.1. Generalidades de los microorganismos fotosintéticos

El uso de microorganismos fotosintéticos data desde hace más de 2000 años, cuando los chinos usaron la cianobacteria *Nosctoc sp.* como fuente de alimento frente la hambruna (**Galarza, 2019**). Sin embargo, las investigaciones científicas acerca de las microalgas comenzaron a partir del año de 1890, donde se deseaba conocer el potencial fotosintético de cultivos con alta densidad de *C. vulgaris* (**Warburg, 1928**). Seguidamente, debido al alto contenido de proteína que presentaba la biomasa microalgal, se usó como suplemento alimenticio e incluso se suplía el consumo directo de vegetales y animales de consumo (**Burlew, 1953**).

Los microorganismos fotosintéticos se dividen en dos grupos principales, eucariotas y procariotas, que mayormente coexisten en ambientes acuáticos. Dichos microorganismos son extensamente diversificados con respecto a su morfología, formas reproductivas y fisiología (**Abalde et al., 2016**). Las bacterias fotosintéticas son organismos capaces de producir energía por medio de la fotosíntesis, la cual puede ser en presencia o ausencia de oxígeno. Además, sus principales pigmentos son los carotenoides y las bacterioclorofilas, los cuales les otorgan un color verde, púrpura, rojo, marrón y naranja que les permiten capturar la luz (**Tavares, 2017**). Las cianobacterias son el grupo más representativo de las bacterias fotosintéticas debido a que tienen un rol importante en la acumulación de

oxígeno en la atmósfera terrestre y a su destreza para fijar nitrógeno molecular que contribuye al desarrollo de otros organismos, como las plantas (López et al., 2011).

Las microalgas se caracterizan por ser microorganismos unicelulares que se diferencian de las cianobacterias por no presentar flagelos, tener núcleo, cloroplastos, mitocondria, aparato de Golgi, entre otros orgánulos representados en la Figura 1 (Duran et al., 2021). Su tamaño varía en un rango desde 1 µm hasta 1mm. Se estima un total de 30.000 a 1.000.000 especies de microalgas las cuales se clasifican en algas verdes (presentan clorofila B), marrones (presentan carotenoides C y E) y rojas (presentan clorofila D) (Rumin et al., 2020). Para su desarrollo utilizan la energía luminosa, sales inorgánicas y CO₂. Estas son las productoras primarias en la cadena trófica, contribuyendo con el 50 % de fotosíntesis en el mundo. Se destacan por su facilidad de propagarse, versatilidad de habitar en cualquier tipo de ambiente, incluyendo agua dulce y salina (Leonardi, 2019).

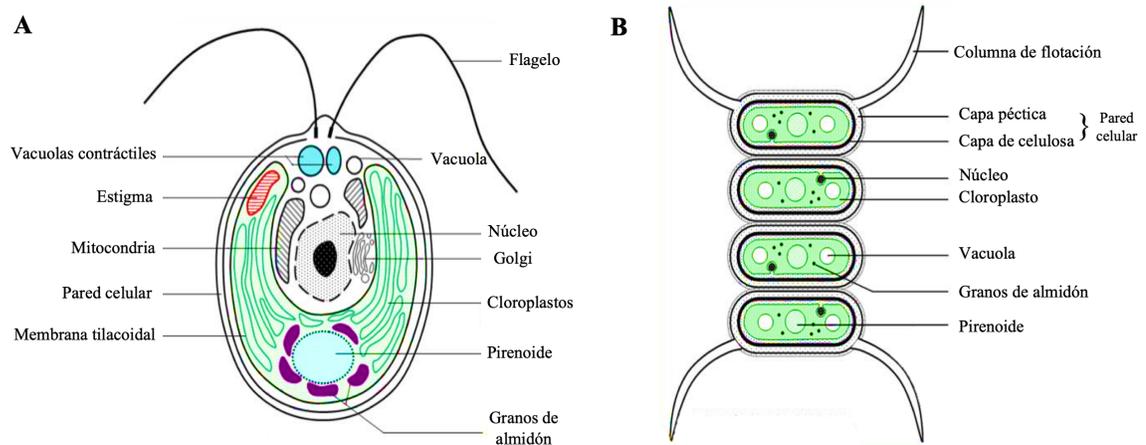


Figura 1. Organización celular de microorganismos fotosintéticos.

Se representa la estructura celular de **A)** Microalga *Chlamydomonas sp* y **B)** Cianobacteria *Scenedesmus sp*. Adaptado por Braida et al., 2015.

1.1.3.2. Potencial biotecnológico de los microorganismos fotosintéticos

Los microorganismos fotosintéticos son unidades celulares que actúan como biofábricas debido que transforman el dióxido de carbono, a través de la energía lumínica, en moléculas bioactivas, las cuales han despertado el interés de la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola y energética (Álvarez, 2022; González et al., 2013). A partir de la biomasa obtenida de estos microorganismos se puede obtener proteínas, carbohidratos, pigmentos, ácidos grasos, polisacáridos, carotenoides, entre otras biomoléculas (Abreu et al., 2023) Dichos componentes bioactivos pueden ser aprovechados como fuente de energía renovable, así como la producción de biocombustibles, además de medicamentos, aditivos alimentarios, tratamiento de aguas residuales, ingeniería de tejidos, apósitos para heridas y tratamientos contra el cáncer (Khademhosseini et al., 2006; Zhang et al., 2023).

La demanda de producción de biomasa microalgal ha aumentado debido a sus propiedades nutricionales y terapéuticas. En este contexto, las microalgas más atractivas para la producción industrial de metabolitos son *C. vulgaris*, *D. salina*, *S. obliquus*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Porphyridium purpureum*, y la cianobacteria *Arthrospira plantensis* (*Spirulina*), representadas en la Figura 2 (Abalde et al., 2016). Sin embargo, los microorganismos más significativos en el área de investigación e industrial son *Chlorella sp* y *Arthrospira plantensis* ya que representan el 90 % del total de la producción de biomasa a nivel mundial (Abreu et al., 2023)

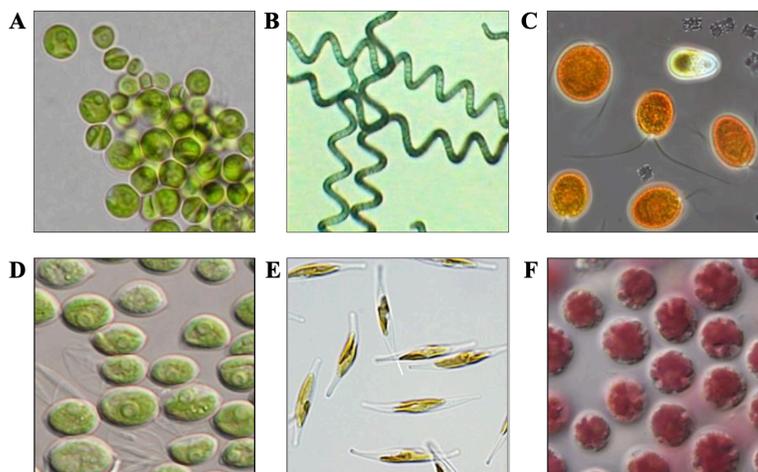


Figura 2. Especies de microorganismos fotosintéticos con mayor demanda en la industria.

Se representa la morfología de los microorganismos fotosintéticos de: **(A)** *C. vulgaris*, **(B)** *Arthrospira plantensis* (*Spirulina*), **(C)** *D. salina*, **(D)** *S. obliquus*, **(E)** *Phaeodactylum Tricornutum*, **(F)** *Porphyridium purpureum*. Imágenes extraídas de *Microalgae strain catalogue*, por **Figueroa et al., 2021**, Zenodo. Copyright © 2021 por The University of Manchester.

1.1.3.3. Obtención de metabolitos primarios y secundarios a partir de microorganismos fotosintéticos.

Una de las alternativas para la producción de metabolitos primarios y secundarios a gran escala es el uso de los microorganismos fotosintéticos, debido a su corto tiempo de desarrollo, bajo costo de producción y a los mínimos requerimientos para su cultivo **(Escobedo & Calderón, 2021)**. Las cianobacterias del género *A. plantensis* pueden ser empleadas como aditivo proteico debido a su elevado valor nutricional **(E. G. Álvarez, 2022)**. Por otra parte, **Bernal (2015)** determinó que la microalga *C. vulgaris* posee un mayor porcentaje de los aminoácidos leucina, valina, lisina, fenilalanina, metionina, tirosina, treonina e histidina, en relación con las fuentes nutricionales tradicionales, como el huevo y la soya. Además, las proteínas de *C. vulgaris* son en su mayoría solubles, ya que más del 50 % de sus proteínas se localizan en el citoplasma, mientras que alrededor del 20 % se encuentran en la pared celular.

Por otro lado, en las microalgas, los carbohidratos se encuentran en forma de almidón, donde se pueden encontrar azúcares como arabinosa, manosa, xilosa, galactosa y glucosa. **Becker (2007)** asegura que los carbohidratos presentes en las microalgas tienen un alto nivel de digestibilidad, por lo que no existe ningún tipo de limitación para su uso alimenticio. Según **Ardila et al. (2017)**, los carbohidratos pueden llegar a representar el 90 % de la biomasa seca de las microalgas. En cuanto a las cianobacterias, a partir de la biomasa de *Nostoc flagilliforme* se puede extraer el polisacárido *Nostoflan*, mismo que tiene propiedades antivirales (**Kanekiyo et al. 2015**).

Por último, los pigmentos producidos por los microorganismos fotosintéticos varían según su composición química y pueden ser clasificados en ficobilinas, carotenoides y clorofila (**Galarza, 2019**). La clorofila y carotenoides pueden llegar a representar entre el 0,5 y 5 % del peso seco de la célula, la cual presenta un mejor rendimiento en comparación con el 0.2 a 2 % de pigmentos obtenidos en peso seco total de la mayoría de las plantas. La obtención de pigmentos a partir de microorganismos fotosintéticos es altamente atractiva para aplicaciones industriales, considerando que, a diferencia de las plantas, el cultivo de microorganismos fotosintéticos es mucho más eficiente en cuanto a la relación rendimiento, costo y tiempo. Por ejemplo, la biomasa de *D. salina* es usada para la síntesis de carotenoides, los mismos que son usados como colorante y aditivo nutricional en la industria alimentaria (**Murcia & Parra, 2018**). Además, la biomasa de *H. pluvialis* es rica en astaxantina, un carotenoide con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias empleada para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y musculares (**García et al., 2018**).

1.1.3.4. Condiciones óptimas de cultivo para la producción de metabolitos

La optimización de la producción de metabolitos usualmente incluye la variación de los parámetros físicos y químicos del cultivo, como la intensidad y fuente de luz, fotoperiodo, temperatura, aireación y concentración de nutrientes esenciales como el carbono, nitrógeno y fósforo, entre otros. Las condiciones de luz afectan directamente a la síntesis

metabólica ya que incitan un cambio en el aparato fotosintético. Consecuentemente, las microalgas necesitan un espectro de luz solar o artificial de en el rango de 350 a 700 nm para su desarrollo **(Ochoa, 2017)**. En cuanto a los requerimientos nutricionales, el medio de cultivo requiere de micronutrientes como de azufre, potasio, sodio, hierro y magnesio además de macronutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo. De la misma forma, la aireación facilita la distribución de gases (principalmente el CO₂) y luz; adicionalmente homogeniza el pH del medio de cultivo. Por último, la temperatura óptima para su desarrollo se encuentra entre 16 a 27°C **(Martínez, 2019)**.

Los microorganismos fotosintéticos presentan un alto nivel de adaptación a distintas condiciones de cultivo debido a su morfología, tamaño, transformaciones fisiológicas y alteraciones en su ciclo de vida. Estas permutaciones son respuesta a variaciones ambientales o factores que inciden directamente en la biosíntesis de metabolitos **(Llopiz, 2016)**. En este sentido, los microorganismos presentan una tasa de crecimiento alta, la cual se representa en 5 fases. Inicialmente, la fase de latencia sucede cuando el cultivo de microalgas es inoculado en medio líquido para la generación de biomasa. De tal manera, el crecimiento es relativamente lento, debido a la falta adaptación, el reducido metabolismo celular y la escasa producción de enzimas para la división celular **(Steele, 2014)**.

La fase exponencial ocurre cuando los microorganismos se han adaptado al medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento dependerá de diversos factores como el pH, la aireación, disponibilidad de nutrientes y fuente de carbono. Seguidamente, en la fase estacionaria, el crecimiento es relativamente nulo, ya que el número de células que crecen es proporcional al número de células que mueren. Además, en esta fase se produce una acumulación de metabolitos secundarios, mismos que son generados como respuesta al estrés inducido por la baja disponibilidad de nutrientes **(Bernal, 2015)**. Por último, en la fase de declive, los microorganismos fotosintéticos mueren ya sea por falta de nutrientes, envejecimiento celular, acumulación de productos de desecho, o alteración en el pH y temperatura; por ende, disminuye drásticamente la viabilidad celular **(Bekirogullari et al., 2020; Romagnoli et al., 2021)**.

Los microorganismos fotosintéticos contienen altos niveles de proteínas debido a la elevada presencia de ficobiliproteínas. Las cianobacterias además contienen capas de peptidoglicanos que contribuyen a su contenido global de proteína **(Nadir, 2016)**. Las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos que están formados esencialmente por nitrógeno. En presencia de bajas concentraciones de nitrógeno, la corriente de carbono es direccionada hacia la biosíntesis de moléculas no nitrogenadas, como los lípidos y carbohidratos **(Guzmán, 2023)**. Por ende, el nitrógeno es un nutriente clave para el desarrollo de los microorganismos fotosintéticos, ya que influye en la composición bioquímica de la célula. El nitrógeno puede ser adquirido en formas inorgánicas como el nitrógeno molecular (N_2) o el amonio (NH_4^+); u orgánicas, como la glutamina, la asparagina o la urea **(Bernal, 2015)**.

Igualmente, se conoce que la concentración de nitrógeno es proporcional al porcentaje de pigmentos producidos, siendo el nitrato de sodio ($NaNO_3$) la fuente preferida por la mayoría de los microorganismos fotosintéticos **(Murcia & Parra, 2018)**. **García et al. (2020)**, afirman que la concentración de β -caroteno, producida por *Dunaleilla tertiolecta*, descendió conforme bajó la concentración de nitrógeno en el medio. Por lo tanto, la ausencia de nitrógeno afectará al metabolismo de la célula, disminuyendo la producción de proteínas y pigmentos. Por lo tanto, el control de los niveles y la fuente de nitrógeno en los sistemas de producción puede ser un factor clave para estimular la producción de varios metabolitos de gran interés biotecnológico, como las proteínas, pigmentos, lípidos y carbohidratos, un área de estudio que todavía está en desarrollo debido al creciente número de microorganismos fotosintéticos que logran ser aislados de entornos naturales mediante las técnicas de laboratorio modernas.

Finalmente, el carbono actúa como fuente de energía para estimular el crecimiento y biosíntesis tanto de proteínas como carbohidratos. Cabe recalcar que el carbono compone el 50 % de la biomasa microalgal; por ende, es el eje central en el diseño y estudio de los factores que afectan la biosíntesis de metabolitos **(Rendón et al., 2015)**. Las fuentes de carbono más empleadas para el cultivo de microorganismos fotosintéticos son el CO_2 , fijado mediante el metabolismo fotosintético autótrofo, o el acetato, glucosa o glicerol,

aprovechados mediante el metabolismo heterótrofo. La producción de metabolitos secundarios puede realizarse solamente mediante el suministro de aire, considerando que este contiene un 0.04% de CO₂ atmosférico que es incorporado por el metabolismo fotosintético. Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios puede verse beneficiada por el uso de cultivos mixotróficos (**Castañeda et al., 2012**). En este sentido, **Ortega & Moronta (2004)** sugieren que, para la producción de pigmentos como clorofila y carotenoides, el uso combinado de CO₂ y acetato de sodio resulta ser más eficiente en comparación con los resultados obtenidos al emplear las otras fuentes de carbono antes mencionadas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la producción de metabolitos secundarios de microorganismos fotosintéticos empleando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono para su cultivo.

1.2.2. Objetivos específicos

- Estimar la cinética de crecimiento de microorganismos fotosintéticos empleando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.
- Evaluar la producción de proteína, carbohidratos y pigmentos bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.
- Determinar la morfología de los microorganismos fotosintéticos bajo las condiciones de estudio.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1.Materiales

Para este proyecto de investigación se utilizaron los equipos, materiales e insumos que se describen a continuación

2.1.1. Equipos de laboratorio

- Autoclave (Hirayama Hicl. HV-110)
- Balanza analítica (VWR-224AC)
- Cámara de cultivo (incluye lámparas fluorescentes, compresor de aire seco, reguladores de flujo de aire, mangueras de silicona y temporizador)
- Cámara de flujo laminar (N1 Esco)
- Centrífuga (para microtubos de 1.5 mL) (Centrífuga Eppenddorf 5424R)
- Centrífuga (para tubos de 15 mL) (Rotina 380)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Fisher Scientific-accuSkan Go)
- Lisador de células (Biospec Products - Mini-Beadbeater-24)
- Microondas
- Micropipetas (2 – 20 μ L; 20 – 200 μ L; 100 – 1000 μ L; 1 -10 mL)
- Microscopio óptico binocular (Olimpus-CX21FS1)
- Potenciómetro (Mettler Toledo-SevenCompact)
- Refrigerador/congelador
- Termobloque (Labnet Accublock 2)
- Termómetro
- Vórtex (Labnet-varios huecos)

2.1.2. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Acetato de sodio (NaOAc)
- Ácido sulfúrico concentrado 97 % (H_2SO_4)
- Agar Bacteriológico
- Agua desionizada de tipo 2
- Agua destilada
- Albúmina de suero bovino
- Dextrosa
- Etanol (70 y 96 % de pureza)
- Etilenglicol (EG)
- Fenol
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Medio Basal de Bold (BBM)
- Medio Basal de Bold modificado (0, 0.625, y 1.25 g/L $NaNO_3$)
- Metanol concentrado 97 % (CH_3OH)

2.1.3. Material fungible

- Botellas (100 mL; 300 mL; 500 mL; 1L)
- Cubreobjetos
- Frascos ámbar
- Gradilla para microtubos
- Gradilla para tubos Falcon
- Lámpara de alcohol
- Microtubos Eppendorf (2 mL)
- Pipetas pasteur de vidrio (18 cm)
- Piseta

- Placa de 96 pocillos
- Placas petri
- Portaobjetos
- Probeta (100 mL)
- Puntas para micropipeta (2 – 20 μ L; 20 – 200 μ L; 100 – 1000 μ L; 1 -10 mL)
- Tubos Falcon (10 mL y 50 mL)
- Vasos de precipitación (100 mL; 250 mL; 500 mL)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de inóculos

El presente proyecto de investigación evaluó la producción de metabolitos secundarios producidos por microorganismos fotosintéticos aislados a partir de una muestra ambiental recolectada en el río Tena, Provincia de Napo, misma que fue previamente establecida en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por el Ing. Miguel Carrera y el Dr. Mario García. Para los fines de esta investigación, se empleó el código CLMR1 para nombrar al aislamiento hasta su identificación mediante técnicas moleculares.

El aislamiento CLMR1 se estableció en un cultivo líquido (cultivo inicial) en Medio Basal de Bold (BBM) compuesto por NaNO_3 , 250 mg/L; K_2HPO_4 , 75 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg/L; KH_2PO_4 , 175 mg/L; NaCl , 25 mg/L; solución alcalina de EDTA, 1 mL/L (5 g de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ y 3.1 g de KOH en 100 mL de agua desionizada); solución de hierro 1 mL/L (0.498 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,1 mL de H_2SO_4 en 100 mL de agua desionizada); solución de metales traza, 1 mL/L (H_2SO_4 , 10 mL/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.44 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.82 g/L; MoO_3 , 0.71 g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.49 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.57 g/L), solución de boro, 1 mL/L (0.11 g de H_3BO_3 en 100 mL de agua desionizada (**Figueroa et al., 2020**)). Dichas soluciones fueron disueltas en agua

desionizada y el pH del medio fue ajustado entre $6,8 \pm 0,3$ empleando HCl o NaOH. Por último, el medio fue esterilizado en autoclave por 20 minutos a 121°C y 15 psi.

El cultivo inicial de CLMR1 se mantuvo a lo largo de la fase experimental del presente proyecto mediante un sistema de cultivo semicontinuo, donde cada 15 días se retiró el 50 % del volumen del cultivo (100 mL) y se reemplazó con medio fresco. La pérdida de agua por evaporación fue restaurada cada 2 días empleando agua desionizada estéril. Las condiciones de incubación se mantuvieron constantes durante todo el proceso: temperatura ambiente (aproximadamente 21°C), fotoperiodo luz/oscuridad alternada de 16 h/8 h proporcionado mediante luz fluorescente blanca (~ 2500 lx) y aireación constante de 200 mL/min, con un suministro de $\text{CO}_2 \sim 0.04\%$ (v/v). Este cultivo sirvió como inóculo inicial para las siguientes etapas del proyecto.

2.2.2. Condiciones de cultivo CLMR1 empleando distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono

Para estimar la cinética de producción de biomasa de CLMR1 bajo diferentes concentraciones de nitrógeno (NaNO_3) y fuente de carbono (acetato de sodio o etilenglicol), se realizaron modificaciones al BBM descrito en la sección 2.2.1., similar a lo descrito por **Murcia & Parra (2018)**. Para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, se valoraron 4 diferentes concentraciones de NaNO_3 : (N1) BBM suplementado 0 g/L de NaNO_3 ; (N2) BBM suplementado con 0.625 g/L de NaNO_3 ; (N3) BBM suplementado con 1.25 g/L de NaNO_3 ; y (N4) BBM suplementado con 2.5 g/L de NaNO_3 . Con respecto a la fuente de carbono, se evaluó la producción de biomasa de CLMR1 utilizando una fuente de carbono autótrofa y 2 fuentes mixotróficas, similar a lo realizado por **Ortega & Moronta (2004)**, **Kishi et al. (2015)**, y **Carrera & García (2022)**, como se describe a continuación: (C1) BBM sin suplementar, recibió solamente CO_2 ; (C2) BBM suplementado con CO_2 y 2.5 g/L de etilenglicol (EG); y (C3) BBM suplementado con 1.64 g/L de acetato de sodio (NaOAc) juntamente con CO_2 . Por último, se empleó un control negativo, el cual consistió solamente de BBM sin inóculo.

Cada tratamiento fue inoculado con una suspensión celular proveniente del cultivo inicial en 200 mL de medio de cultivo hasta obtener una concentración celular de 4×10^3 células/mL. Además, las condiciones de incubación fueron las mismas descritas previamente para el cultivo inicial, excepto que en este caso todos los ensayos se evaluaron en cultivo discontinuo.

2.2.3. Determinación de la curva de crecimiento celular.

Para la determinación de la cinética de crecimiento celular, se tomó 10 μ l de muestra del cultivo y se colocará en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. El conteo de células se realizó en un microscopio óptico binocular. El número de células por mL se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Número de células}}{5 \text{ cuadrantes}} * \frac{1 \text{ cuadrante}}{4 * 10^{-3} \text{ mm}^3} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} * \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ ml}} * FD \quad (\text{eq. 1})$$

El recuento celular se realizó diariamente (excepto fines de semana) por aproximadamente 15 días o hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Dichos resultados fueron reflejados en una curva de crecimiento celular.

2.2.4. Evaluación del contenido de proteínas totales

La producción de la proteína de CLMR1 se evaluó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), descrito por Merck (2024) y modificado para este estudio. Para ello, se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a centrifugación a 12000 rpm durante 4 minutos. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada en un microtubo de 1.5 mL. Por consiguiente, se añadieron 10 microesferas de vidrio de 3 mm de diámetro, juntamente con 0.05 % de Tritón X-100 y se homogenizó en un vortex durante 20 segundos. Seguidamente se llevó a congelación a -20°C durante 2° minutos y

se descongeló a -80°C en un termobloque. Este proceso de congelación/descongelación se repitió durante 3 ciclos. Las muestras se llevaron a un lisador de células a 3500 oscilaciones por minuto durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugó las muestras a 12000 rpm durante 4 minutos. Una vez tomado el sobrenadante se aplicó el método del ácido bicinoninico (BCA), al cual se colocó en una microplaca 196 μl de la solución de pentahidrato de sulfato de cobre al 4 %, 4 μl de la solución de ácido bicinoninico y 25 μl de la muestra, posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos. La absorbancia de la muestra se determinó mediante un espectrofotómetro lector de placas a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de proteínas se determinó en función de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Las determinaciones se realizaron por aproximadamente 15 días (excepto fines de semana) o hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

2.2.5. Evaluación del contenido de carbohidratos totales

Los carbohidratos totales contenidos en la biomasa de CLMR1 se determinaron mediante hidrólisis ácida. Para ello, se usó el método colorimétrico fenol ácido sulfúrico descrito por **López et al. (2017)**. Se tomó 1 mL de medio de cultivo y se adicionó 0.5 mL de fenol al 5 % y 2.5 mL de ácido sulfúrico con una concentración del 95 %. Posteriormente, la muestra se dejó en reposo por 10 minutos. Seguidamente, se agitó la mezcla durante 30 segundos en vórtex y se mantuvo en reposo en baño a 25°C por 10 minutos. Finalmente, la medición de los carbohidratos totales se realizó en microplacas de 96 pocillos, en donde se depositó 240 μL de muestra en un pocillo y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm mediante espectrofotómetro. La concentración de carbohidratos se determinó en función de una curva estándar de glucosa obtenida mediante el mismo método. Las determinaciones se realizaron por aproximadamente 15 días (excepto fines de semana) o hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

2.2.6. Evaluación del contenido de pigmentos

La evaluación de los pigmentos contenidos en la biomasa de CLMR1 se realizó mediante el uso de disolventes orgánicos siguiendo la metodología descrita por **Henriques et al. (2007)**. Inicialmente, se tomó una alícuota de 2.5 mL de medio de cultivo de cada tratamiento. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las células se suspendieron en 2 mL de agua destilada para eliminar las sales retenidas en la biomasa y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se añadió 2 mL de metanol (CH₃OH) con una concentración del 95 % y se dejó en reposo durante 20 minutos. Las muestras se centrifugarán nuevamente a 4000 rpm por 5 minutos y la absorbancia del sobrenadante fue determinada mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 666 nm y 470 nm para la determinación de clorofila y carotenoides totales, respectivamente. La concentración de clorofila se determinó mediante la ecuación 2 (eq.2) (**Porra et al., 1989**), mientras que la concentración de carotenoides se determinó mediante la ecuación 3 (eq.3) (**Lichtenthaler & Wellburn, 1983**), mismas que se describen a continuación:

$$\mu g_{Clorofila}/mL_{Medio} = 15.65 A_{666} \quad (\text{eq. 2})$$

$$\mu g_{Carotenoides\ totales}/mL_{Medio} = \left(\frac{1000 A_{470} - 44.76 A_{666}}{221} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

Este procedimiento se realizó por aproximadamente 15 días (excepto fines de semana) o hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

2.2.7. Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno y la fuente de carbono, se aplicó un diseño factorial A x B. Cabe resaltar que el factor A, concentración de nitrógeno, presentó 4 niveles, mientras que el factor B, fuente de carbono, presentó 3 niveles (Tabla

2). Por lo tanto, cada tratamiento consistió en la combinación de los niveles de cada factor, por lo que hubo un total de 12 tratamientos. Cada determinación se realizó por triplicado.

Tabla 2. *Diseño experimental propuesto para la generación de biomasa y metabolitos secundarios de microorganismos fotosintéticos utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fuente de carbono.*

Factor A	Factor B
Concentración de nitrógeno	Fuente de carbono
1. NaNO ₃ (0 g/L)	1. CO ₂ (0.04 % v/v)
2. NaNO ₃ (0.625 g/L)	2. CO ₂ (0.04 % v/v) + EG (2.5 g/L)
3. NaNO ₃ (1.25 g/L)	3. CO ₂ (0.04 % v/v) + NaOAc (1.64 g/L)
4. NaNO ₃ (2.5 g/L)	

- **Hipótesis**

Hipótesis Nula

La variación de la concentración de nitrógeno y fuentes de carbono en el medio de cultivo no mejora la producción de biomasa y metabolitos.

Hipótesis alternativa

La variación de la concentración de nitrógeno y fuentes de carbono en el medio de cultivo tiene un efecto sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios.

- **Variables**

Generación de biomasa

Variable dependiente

Cantidad de biomasa generada.

Variable independiente

Fuente de carbono y concentración de nitrógeno

Producción de proteínas, carbohidratos y pigmentos**Variable dependiente**

Cantidad de proteína, carbohidratos y pigmentos generados

Variable independiente

Fuente de carbono y concentración de nitrógeno

2.2.8. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos en las etapas de generación de biomasa, producción de proteínas, carbohidratos y pigmentos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA con modelo lineal general univariado) con un nivel de confianza del 95 % empleando software estadístico (IBM SPSS Statistics). Para establecer las diferencias y determinar el mejor tratamiento en cuanto a la cantidad de biomasa obtenida y producción de metabolitos secundarios con las distintas concentraciones de nitrógeno y diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo, se empleó una prueba de Tukey.

2.2.9. Análisis morfológico mediante microscopio óptico

Para la determinación morfológica de las muestras, se siguió el protocolo establecido por **Yu et al. (2022)**. Cabe recalcar que el análisis se realizó antes y después de las condiciones de estudio anteriormente detalladas. Se tomaron muestras de 3 μL del cultivo y se centrifugarán a 1500 x g por 5 minutos. El precipitado se suspendió en 300 mL de medio BBM. Seguidamente, se tomó 40 μL de la muestra y se colocó en un portaobjetos de vidrio. La estructura celular y movilidad se observó en un microscopio óptico binocular.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de datos

3.1.1. Evaluación de la cinética de crecimiento

Generalmente las microalgas son cultivadas bajo condiciones autotróficas, es decir, la luz actúa como su única fuente de energía y la principal fuente de carbono es el CO₂. Sin embargo, el cultivo autotrófico genera una baja tasa de producción de biomasa debido a la limitación de nutrientes (**Abreu et al., 2012**). En lo que respecta al cultivo mixotrófico, se trata de una combinación del cultivo autotrófico y heterotrófico, donde tanto fuentes de carbono orgánicas (EG y NaOAc) como inorgánicas (CO₂) pueden ser aprovechadas para la síntesis de metabolitos y el crecimiento celular (**Chen et al., 2011**). Este tipo de cultivos logran aminorar las limitaciones nutricionales de los cultivos convencionales (**Wang et al., 2018**). Además del carbono, el nitrógeno también influye significativamente en la producción de biomasa. Para los cultivos a gran escala, el nitrato de sodio (NaNO₃) es la fuente de nitrógeno preferida para los microorganismos fotosintéticos y estimula su crecimiento ya sea en condiciones mixotróficas, heterótrofas o autótrofas (**Ranadheer et al., 2019**).

Para la evaluación de la biomasa generada por el aislamiento CLRM1 en condiciones autótrofas y mixotróficas, se ensayaron diferentes concentraciones de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5) g/L y distintas fuentes de carbono (CO₂, EG y NaOAc). La cinética de crecimiento del aislamiento se evaluó por un período de 16 días. La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento de CLRM1 frente a cada tratamiento. Cabe recalcar que la densidad celular fue obtenida mediante el conteo celular en la cámara de Neubauer (células/mL).

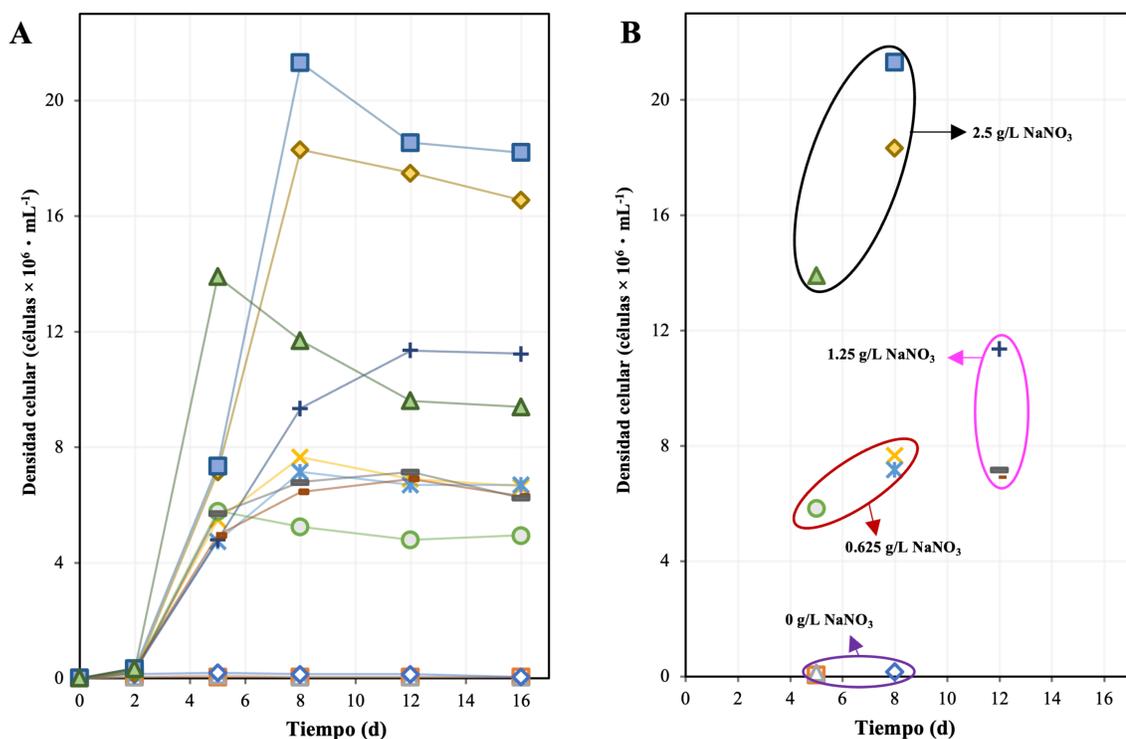


Figura 3. Curva de crecimiento del aislamiento CLMR1.

Se representa: **(A)** La cinética de crecimiento a partir de la concentración celular por volumen de cultivo (células·mL⁻¹), a lo largo de 16 días **(B)** Se representan los valores máximos de concentración celular por volumen de cultivo (células·mL⁻¹) tomando en cuenta las distintas cinéticas de cada tratamiento, empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [◆]; N1 + C2 [□]; N1 + C3 [△]; N2 + C1 [x]; N2 + C2 [*]; N2 + C3 [●]; N3 + C1 [+]; N3 + C2 [-]; N3 + C3 [-]; N4 + C1 [◇]; N4 + C2 [■]; N4 + C3 [▲].

Las curvas de crecimiento presentaron distintas cinéticas a lo largo de los 16 días de cultivo, tomando en cuenta los diferentes tratamientos. Los resultados del análisis de varianza ANOVA indican que las tasas de crecimiento celular son estadísticamente significativas ($p < 0.05$), lo que refleja que son diferentes entre sí. Según los hallazgos de la prueba de Tukey, la variable que influyó en el crecimiento del aislamiento CLMR1 fue la concentración de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5) g/L. Se observan tres niveles de significancia, donde los tratamientos sin NaNO₃ se encuentran en el grupo de menor crecimiento. A continuación, los cultivos suplementados con 0.625 y 1.25 g/L de NaNO₃

pertenece al mismo grupo, mientras que el último grupo está compuesto por los cultivos suplementados con 2.5 g/L de NaNO₃ (Tabla 3). Estos resultados sugieren que el crecimiento de el aislamiento CLMR1 es mayor a mayores concentraciones de nitrógeno. Por otra parte, el análisis de varianza ANOVA no mostró diferencias significativas en relación a las fuentes de carbono suministradas ($p > 0.05$).

Tabla 3. Densidad celular obtenida en el 16 día con BBM suplementado con cuatro diferentes concentraciones de NaNO₃ y tres distintas fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Densidad celular (células/mL)			
	Concentración de NaNO ₃ (g/L)			
	0	0.625	1.25	2.5
CO ₂	5×10 ⁴ A	6.7×10 ⁶ B	11×10 ⁶ B	17×10 ⁶ C
CO ₂ + EG	5×10 ⁴ A	6.7×10 ⁶ B	6.3×10 ⁶ B	18×10 ⁶ C
CO ₂ + NaOAc	5×10 ⁴ A	5.0×10 ⁶ B	6.3×10 ⁶ B	9.4×10 ⁶ C

Nota: Se representa la densidad celular por volumen de cultivo (células/mL) observada el día 16 de cultivo. En todos los tratamientos, la densidad celular inicial fue de 4×10³ células/mL. Los superíndices (A, B, C) simbolizan los niveles de significancia de la concentración NaNO₃ según la prueba de Tukey y los resultados obtenidos por el ANOVA ($p < 0.05$). Cabe recalcar que, no existe diferencia significativa con respecto a las distintas fuentes de carbono según los resultados obtenidos por el ANOVA ($p > 0.05$).

Las cinéticas de crecimiento construidas a partir de los conteos celulares (Figura 3A) muestran que en todos los tratamientos se logró alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual las microalgas tienden a acumular metabolitos como respuesta a la disminución en la concentración de nutrientes y a la reducción en la tasa de crecimiento (Teh et al., 2021). En todos los tratamientos se observó una fase inicial de latencia que duró un período de 2 días. En la fase exponencial, se evidenció que la tasa de incremento en la densidad celular tuvo relación con el incremento en la concentración de NaNO₃, y que este comportamiento es independiente del tiempo. Por ejemplo, los cultivos suplementados con 2.5 g/L de

NaNO₃ mostraron una tasa de crecimiento constante que duró entre 5 (NaOAc) y 8 días (CO₂ y EG). Un resultado similar fue observado cuando el medio se suplementó con 0.625 g/L de NaNO₃, mientras que los cultivos suplementados con 1.25 g/L de NaNO₃, solamente el cultivo autotrófico (CO₂) extendió su fase exponencial hasta el día 8 de cultivo. En contraste, en los cultivos que recibieron una suplementación de 0 g/L de NaNO₃ no se observó una fase exponencial. Esta ausencia de crecimiento estuvo directamente relacionada a la falta de nitrógeno, y se estima que esto limitó la producción de biomoléculas nitrogenadas esenciales para la división celular, como los ácidos nucleicos y las proteínas.

Además, las cinéticas de crecimiento mostraron que la concentración de nitrógeno produjo una influencia en el comportamiento de la fase estacionaria. Por ejemplo, a bajas concentraciones de NaNO₃ (0.625 y 1.25 g/L), la fase estacionaria se prolongó hasta el final del estudio. Aparentemente, las células no agotaron completamente los recursos del medio de cultivo durante la duración del ensayo, debido a la menor tasa de crecimiento que se observó en estos tratamientos durante la fase exponencial. Esto les permitió mantener densidades celulares similares, manteniendo un equilibrio entre la tasa de crecimiento y la tasa de muerte. Por otro lado, durante los muestreos no pudo observarse una fase estacionaria evidente en los tratamientos suplementados con la concentración más alta de NaNO₃ (2.5 g/L). En su lugar, las cinéticas muestran una disminución en la densidad celular a partir del día 12 de cultivo, lo que sugiere el inicio de la fase de decaimiento o muerte de las células provocada por un elevado crecimiento celular inicial que derivó en un consumo anticipado del nitrógeno disponible. Esto es congruente con lo observado por **Vo et al., (2022)**, quienes determinaron que la ausencia de la fuente de nitrógeno en el medio repercute de manera negativa en la productividad de la biomasa de la microalga *C. vulgaris*. Además, se considera que los productos derivados del metabolismo podrían tener un efecto tóxico al restringir la síntesis de aminoácidos, que son esenciales para el crecimiento celular (**Castelo, 2018; García, 2014; Simionato et al., 2013**). **Widjaja et al. (2009)** también observaron que a medida que aumentó la densidad celular y la fuente de nitrógeno se volvió limitante, las células de *Chlorella sp.* experimentaron estrés y su tasa de crecimiento disminuyó. Por lo tanto, se presume que,

con una mayor concentración de NaNO_3 , las microalgas agotan rápidamente el nitrógeno disponible hasta su completa extinción, lo que podría ocasionar un rápido ingreso a la fase de muerte celular.

Con respecto a la variación en la fuente de carbono, el cultivo cultivo autotrófico y mixotrófico proporcionaron resultados similares para cada nivel de concentración de nitrógeno. Los mejores resultados fueron obtenidos cuando el CO_2 o el EG se suplementaron con 2.5 g/L de NaNO_3 .

Cabe mencionar que las densidades celulares más elevadas no fueron obtenidas al finalizar el tiempo de experimentación, sino que fueron obtenidas en la parte más alta de la fase exponencial o de la fase estacionaria (Figura 3B). Así, los tratamientos suplementados con CO_2 o EG y 2.5 g/L de NaNO_3 mostraron las mayores densidades celulares en el día 8 de cultivo, con valores de 18×10^6 células/mL y 21×10^6 células/mL, respectivamente. Por su parte, el suministro de NaOAc en conjunto con 2.5 g/L de NaNO_3 produjo una densidad celular máxima (14×10^6 células/mL) apenas en el día 5 de cultivo. En definitiva, el tratamiento mixotrófico complementado con EG generó 1.16 veces más biomasa que el cultivo autotrófico y 1.5 veces más que el tratamiento con NaOAc.

Al analizar las densidades celulares máximas obtenidas con diferentes concentraciones de NaNO_3 (Figura 3B) es posible observar que el crecimiento celular está estrechamente relacionado con la concentración de nitrógeno, incluso empleando diferentes fuentes de carbono. Además, en la mayoría de los tratamientos se alcanzó los valores máximos a los 5 u 8 días de cultivo, con excepción de aquellos tratamientos suplementados con 1.25 g/L de NaNO_3 .

El estudio realizado por **Ranadheer et al. (2019)**, sugiere que un suministro suficiente de nitrógeno al medio mejora la fijación de carbono y aumenta la biomasa. Sin embargo, **Thepsuthammarat et al. (2023)**, advierten que las altas concentraciones de nitrato pueden inhibir el metabolismo y el crecimiento de la microalga *Coelastrella sp*, siendo 1.5 g/L de NaNO_3 la cantidad óptima. Sin embargo, si bien esta premisa no respalda el

resultado obtenido, **Khatoon et al. (2022)** demostraron un aumento significativo en la densidad celular de la microalga *T. chunii*, alcanzando hasta 3×10^6 células/mL en 9 días con una concentración de 5 g/L de NaNO_3 . Sus resultados se correlacionan con los datos obtenidos en la presente investigación, donde la Figura 3B muestra que la densidad celular más alta fue de 21×10^6 células/mL. Esta concentración se logró con de 2.5 g/L de NaNO_3 en un período de 8 días. Por lo tanto, el aislamiento CLMR1 demostró una capacidad de desarrollarse 7 veces más que *T. chunii* tomando en cuenta las mejores condiciones de cada estudio.

3.1.2. Evaluación de la cantidad de proteína contenida en la biomasa de microorganismos fotosintéticos

La biomasa de microalgas es una fuente sustentable para la obtención de proteína. Varios estudios aseguran que la producción de proteína en las microalgas constituye una porción importante en relación con la síntesis de lípidos y carbohidratos (**Lu et al., 2019**). En cuanto los requerimientos nutricionales, las altas concentraciones de nitrógeno promueven el crecimiento celular y la producción de proteína, mientras que, al limitarse el acceso a este nutriente, el metabolismo induce a la acumulación de lípidos y carbohidratos (**Lu et al., 2019**). Para conocer la cantidad de proteína generada, se llevaron a cabo distintos tratamientos a partir del medio BBM suplementado con distintas concentraciones de NaNO_3 (0, 0.625, 1.25 y 2.5) g/L en conjunto con fuentes de carbono (CO_2 , EG y NaOAc). La Figura 4 representa la cantidad de proteína producida bajo las condiciones de estudio mencionadas.

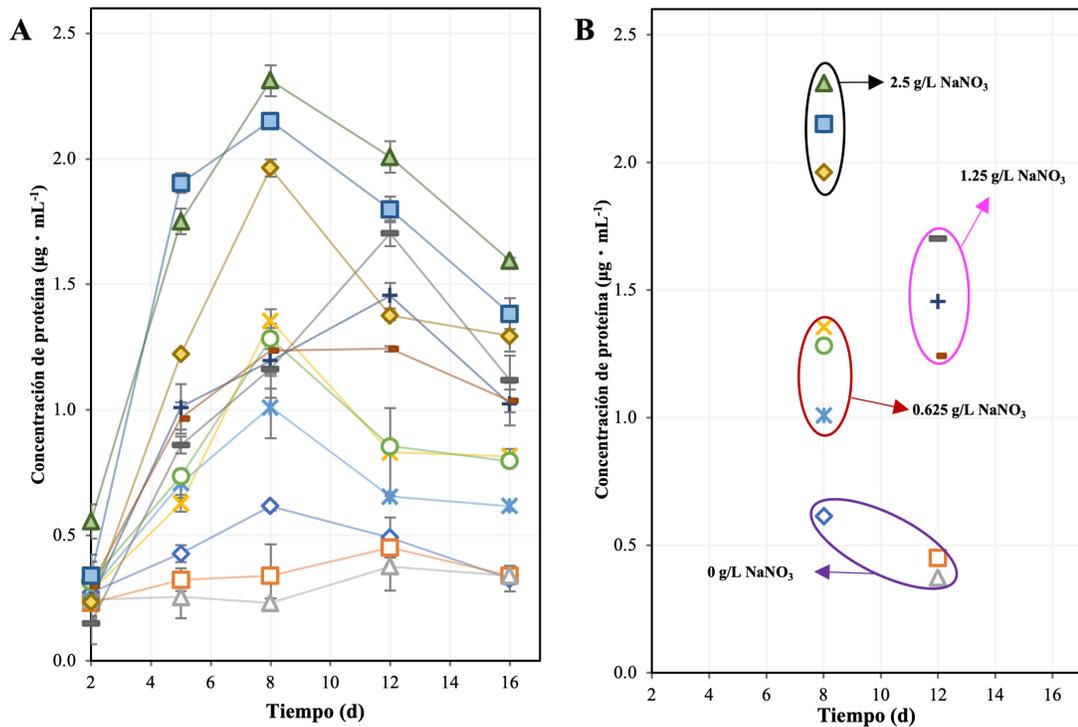


Figura 4. Curva de la concentración de proteína producidos a partir del aislamiento CLMRI.

La gráfica representa: **(A)** La producción de proteína ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a lo largo de 16 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de proteína ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [$-\diamond-$]; N1 + C2 [$-\square-$]; N1 + C3 [$-\triangle-$]; N2 + C1 [$-\times-$]; N2 + C2 [$-\ast-$]; N2 + C3 [$-\circ-$]; N3 + C1 [$-\oplus-$]; N3 + C2 [$-\ominus-$]; N3 + C3 [$-\text{--}$]; N4 + C1 [$-\diamond-$]; N4 + C2 [$-\square-$]; N4 + C3 [$-\triangle-$]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

La Figura 4A, indica que la producción de proteínas aumenta con respecto al tiempo de incubación en todos los tratamientos hasta alcanzar un máximo. Este incremento correlaciona con las cinéticas de crecimiento celular (Figura 3) y la disponibilidad de nitrógeno, factores que favorecen a la síntesis de proteínas (Galarza, 2019). Se observó una máxima producción de proteína en el día 5 en los cultivos suplementados con 2.5 y 0.625 g/L de NaNO₃. En cambio, en los cultivos con 0 y 1.25 g/L de NaNO₃, el pico máximo se alcanzó el día 12. Estos picos coinciden con la fase exponencial del crecimiento de la microalga según lo mostrado en la Figura 3A, con la excepción de los

cultivos mixotróficos sin NaNO₃. Este fenómeno podría explicarse por la presencia de a las fuentes orgánicas de carbono añadidas, lo cual podría contribuir con la síntesis de proteína (Nehete et al., 2013).

Sin embargo, tras alcanzar el pico máximo, la generación de proteína presentó un declive en todos los tratamientos. Factores como la escasez de nutrientes, la limitación de nitrógeno y condiciones de estrés pueden ser causantes de esta disminución en la producción de proteínas. Especies como *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros sp*, *Parietochoris sp* y otras microalgas, disminuyen el contenido de proteína frente a la limitación de la fuente de nitrógeno (Chia et al., 2019). En síntesis, como se mencionó anteriormente, las altas cantidades de nitrógeno promueven la producción de proteínas, mientras que su inanición induce la síntesis de carbohidratos (Lu et al., 2019).

El análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos demostró que la producción de proteína es dependiente de la concentración de NaNO₃ y de la fuente de carbono suministrada al medio ($p < 0.05$). Por consiguiente, la prueba de comparación de Tukey dejó en evidencia que existieron 4 niveles de significancia correspondientes a cada concentración de NaNO₃ (Tabla 5). Por otro lado, tomando en cuenta las fuentes de carbono, existen 2 grupos significativos ($p < 0.05$), donde los tratamientos suplementados con CO₂ y EG pertenecen a un mismo grupo diferente al que la prueba ubica al tratamiento con NaOAc (Tabla 5). Esto quiere decir que la producción de proteína es distinta en todos los tratamientos.

Los valores máximos de producción de proteína en cada tratamiento se detallan en la Tabla 4. Se observó que el tratamiento mixotrófico suplementado con NaOAc y 2.5 g/L de NaNO₃ alcanzó la mayor producción con 2.31 µg/mL de proteína al cabo de 8 días. En contraste, la menor concentración registrada fue de 0.37 µg/mL en el tratamiento con NaOAc y 0 g/L de NaNO₃ al día 12. Estos resultados demuestran que el suministro de 2.5 g/L de NaNO₃ produce un incremento de hasta 6.24 veces más proteína con respecto al tratamiento en ausencia de nitrógeno. A pesar de estos resultados prometedores, se observó una disminución en la concentración de proteína después del octavo día, lo que

sugiere que el consumo total de la fuente de nitrógeno tiene un efecto negativo en la acumulación de proteína a largo plazo.

Por otro lado, los hallazgos de este estudio reflejan patrones similares observados en la investigación realizada por **Serrano et al. (2012)**, donde al cultivar *C. vulgaris*, en condiciones similares de NaNO₃ y NaOAc, produjo la máxima concentración de proteína (780 µg/mL) al día 5 de cultivo, y que posteriormente disminuyó. Posiblemente se deba a la rápida incorporación del nitrato en el metabolismo celular, ya que es usado para la síntesis de polisacáridos, pigmentos y proteína según lo descrito por **Barbarino & Lourenço, (2005)**. Además, *C. vulgaris* generó 337.6 veces más proteína que el aislamiento (CLMR1) usado en el presente estudio. Por lo tanto, la biosíntesis de proteína dependerá de la disponibilidad de una fuente de nitrógeno, además del género y especie de la microalga utilizada.

Teniendo en cuenta que, además de las concentraciones de NaNO₃, las fuentes de carbono también inciden en la producción de proteína. Los tratamientos sometidos en condiciones autótrofas resultaron ser similares que los cultivos en condiciones mixotróficas con EG. Dicho análisis podría sugerir que el aislamiento CLMR1 no es capaz de incorporar el EG en las rutas de biosíntesis de aminoácidos. De otro modo, tomando en cuenta que existe diferencia entre los tratamientos suplementados con NaOAc, las microalgas metabolizan el NaOAc a través del ciclo de glioxilato, en donde se da un aumento de la enzima isocitrato liasa, la cual es indispensable para la asimilación de acetato/acetil-CoA. La oscuridad favorece al aumento de la actividad enzimática, las mismas que actúan como catalizadores que inducen a la producción de proteína (**Garcia et al., 2011; Goulding & Merrett, 1966**). Por lo tanto, se considera importante analizar otras variables que podrían afectar la síntesis de proteínas, como el efecto de la fuente de luz, fotoperiodo, flujo de aire, entre otros.

3.1.3. Evaluación de la cantidad de carbohidratos contenidos en la biomasa de microorganismos fotosintéticos

El contenido de carbohidratos puede ser manipulado ya sea por la limitación de macronutrientes (azufre, fósforo, nitrógeno), como la adición de fuentes orgánicas de carbono (acetato de sodio, etilenglicol, propionato), además de factores como la intensidad de luz, temperatura, etc (Ben et al., 2019).

Para evaluar la producción de carbohidratos del aislamiento CLMR1, se estableció un cultivo autotrófico y dos cultivos mixotróficos, en donde se combinó el CO₂ con dos fuentes de carbono orgánicas (EG y NaOAc) a distintas concentraciones de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5 g/L). La concentración de carbohidratos producidos por cada tratamiento se representa en la Figura 5.

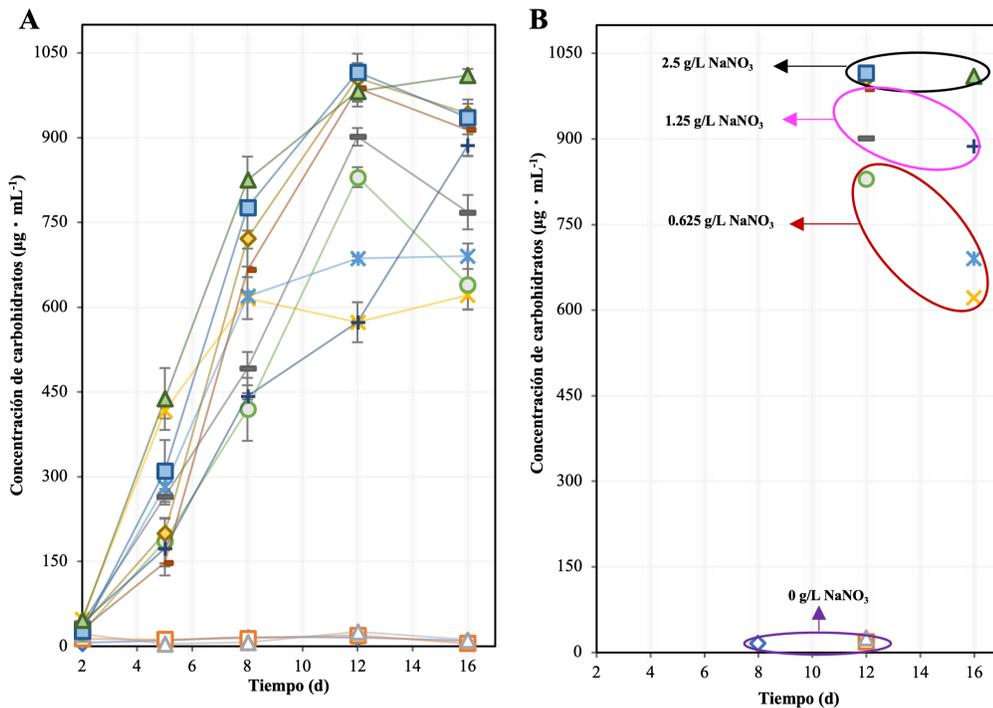


Figura 5. Curva de la concentración de carbohidratos producidos a partir del aislamiento CLMR1.

La gráfica representa: **(A)** La producción de carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a lo largo de 16 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [\blacklozenge]; N1 + C2 [\blacksquare]; N1 + C3 [\blacktriangle]; N2 + C1 [\blackstar]; N2 + C2 [\blackasterisk]; N2 + C3 [\blacklozenge]; N3 + C1 [\blackplus]; N3 + C2 [\blackcross]; N3 + C3 [\blackdash]; N4 + C1 [\blacklozenge]; N4 + C2 [\blacksquare]; N4 + C3 [\blacktriangle]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

La Figura 5A muestra que la cantidad de carbohidratos en los cultivos aumenta a lo largo del tiempo y que alcanza valores máximos hacia el final del ensayo. Inicialmente, en el día 2, todos los cultivos presentaron una concentración baja y uniforme de carbohidratos lo cual podía deberse a una fase de aclimatación celular. Posteriormente, la concentración de carbohidratos llega a su punto máximo a partir del día 12 y 16. Estos máximos contrastan con la curva de crecimiento celular (y contenido de proteínas), donde a partir del día 12 la densidad celular decrece (Figura 3A). Se deduce entonces que, las condiciones de estrés, como la ausencia de NaNO_3 , favorecen la producción de carbohidratos del microorganismo fotosintético en estudio (**Simionato et al., 2013**).

Los resultados obtenidos se asemejan con la investigación realizada por **Khatoon et al. (2022)**, donde la microalga *T. chuii* presentó diferentes niveles de producción de proteínas y carbohidratos con respecto a la concentración de nitrógeno presente en el medio de cultivo. La concentración más elevada de proteína se obtuvo al usar una concentración de 5 g/L de NaNO_3 , mientras que la producción de carbohidratos fue muy limitada. Al tener una concentración de 0.25 g/L, la concentración de carbohidratos aumentó, mientras que la síntesis de proteína disminuyó significativamente. En este contexto **Ben et al., (2019)** aseguraron que la privación de nitrógeno produjo un aumento de almidón en especies de microalgas como *Tetraselmis subcordiformis*, *Porphyridium marinum*, *Arthrospira máxima*, *Isochrysis zhangjiangensis*, *Chlorella sp.* entre otras (**Braga et al., 2018**).

De acuerdo con los datos conseguidos, el análisis de varianza ANOVA deja en evidencia que la cantidad de carbohidratos producidos por el aislamiento CLMR1 es dependiente de

la concentración de NaNO_3 y la fuente de carbono aplicada al medio ($p < 0.05$). Además, en base a la prueba de comparación de Tukey, existen 4 niveles de significancia para la concentración de NaNO_3 , las cuales se indican en la Tabla 5. Por otro lado, existen dos grupos de significancia para la fuente de carbono, donde los tratamientos con EG y NaOAc pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$) (Tabla 5).

Los cultivos mixotróficos que utilizan fuentes de carbono orgánicas (EG y NaOAc) mostraron una producción significativamente mayor en comparación con los cultivos autótrofos. Estos cultivos alcanzaron concentraciones de carbohidratos de hasta 1015.78 y 1010.35 $\mu\text{g/mL}$ en los días 12 y 16 respectivamente, en un medio suplementado con 2.5 g/L de NaNO_3 (Tabla 4). En contraste, el cultivo autótrofo produjo 15.78 $\mu\text{g/mL}$ en el día 8. Esto indica que la combinación de una alta concentración de NaNO_3 en cultivos mixotróficos, resulta en una producción de carbohidratos de hasta 64.37 veces mayor que en los cultivos autótrofos con una nula disponibilidad de nitrógeno. De la misma manera, **Sajadian et al. (2018)**, sostienen que, la microalga *C. vulgaris*, al ser sometida a un medio mixotrófico, produce mayor cantidad de carbohidratos en comparación con un medio autótrofo y heterótrofo.

Otro punto es la influencia de las fuentes de carbono externas, tales como el NaOAc y el EG. Si bien presentan un efecto significativo en la producción de carbohidratos en comparación con el medio autotrófico, también existe una correlación con respecto a la concentración. En este sentido **Álvarez et al. (2015)** aseguran que, al suministrar una concentración mayor de 1 g/L de NaOAc al medio, es posible que el crecimiento celular se inhiba por intoxicación. Esto se debe a que ocurre una disociación interna del ion acetato ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$), lo que conlleva la acidificación del citosol y una gran acumulación de iones que producen daños celulares (**Chalima et al., 2017**) Sin embargo, en la presente investigación se suministró 1.24 g/L de NaOAc, por lo cual, posiblemente, la microalga en estudio tenga la capacidad de incorporar acetato fácilmente en su metabolismo. Así mismo, **Capa (2022)** menciona que *D. salina* presenta la cualidad de ser tolerante a la misma concentración de NaOAc (1.24 g/L).

Investigaciones actuales resaltan el potencial de las microalgas en la degradación de EG en aguas residuales y su impacto en el crecimiento celular, debido a que estos microorganismos son capaces de metabolizar glicoles, entre otros solventes orgánicos **(Kishi et al., 2015)**. Sin embargo, al estar presente en altas concentraciones (> 5 g/L) resulta ser tóxico para el crecimiento celular **(Pillard & DuFresne, 1999)**. A pesar de esto, no se han reportado investigaciones en las que se utilice el EG para la producción de carbohidratos. De hecho, la asimilación de carbono no solo influye en la producción de carbohidratos, sino también en la síntesis de aminoácidos y crecimiento celular, de tal modo que, al disminuir la producción de proteínas por la falta de nitrógeno, la vía del metabolismo del carbono se redirige específicamente a la síntesis de carbohidratos **(Castelo, 2018)**.

3.1.4. Evaluación de la cantidad de clorofila contenida en la biomasa de microorganismos fotosintéticos

Los pigmentos producidos a partir de la biomasa de las microalgas son uno de los productos de alto valor comercial y nutricional **(Sajadian et al., 2018)**. Para su producción, el nitrógeno actúa como elemento crítico, ya que los cambios de concentración de nitrógeno alteran la tasa de crecimiento de las microalgas, por ende, la síntesis de clorofila. Para la evaluación de la cantidad de clorofila producida por el aislamiento CLMR1, se establecieron distintas concentraciones de NaNO_3 (0, 0.625, 1.25 y 2.5) g/L tanto al medio autotrófico como mixotrófico. En cuanto a las fuentes de carbono usadas, se combinó el CO_2 con dos fuentes orgánicas de carbono (EG y NaOAc). La concentración de clorofila producida por cada tratamiento se representa en la Figura 6.

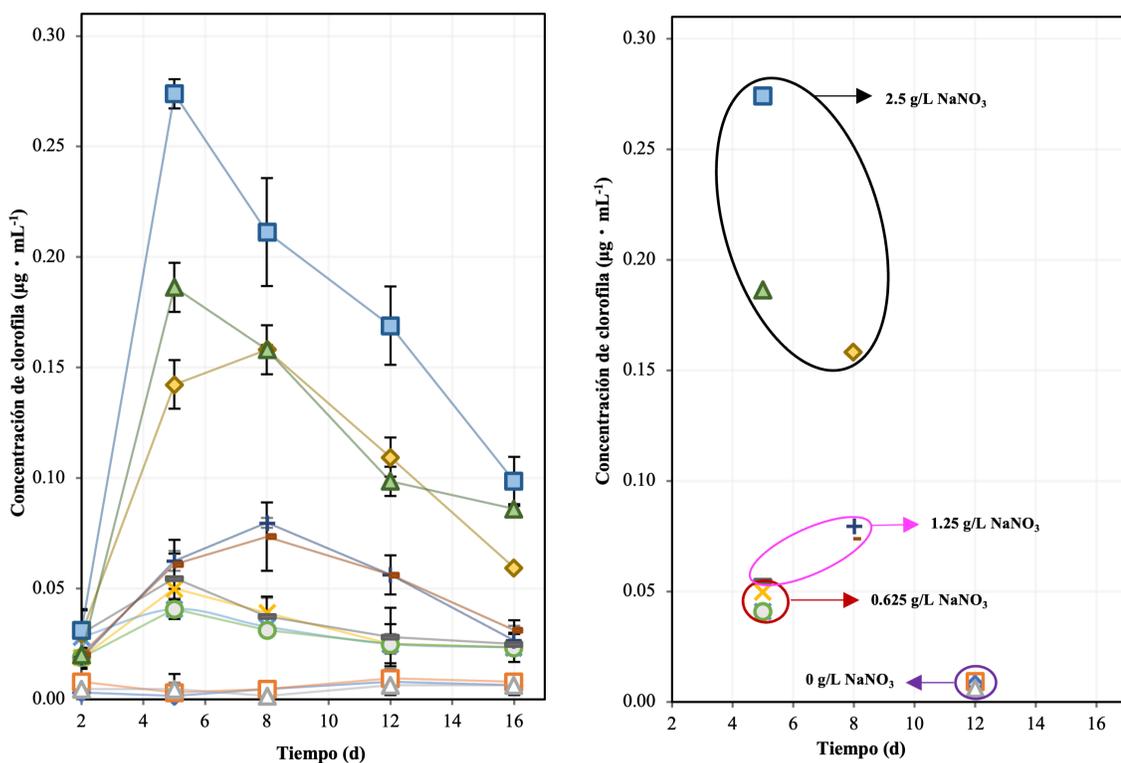


Figura 6. Curva de la concentración de clorofila y carotenoides producidos a partir del aislamiento CLMRI

La gráfica representa: **(A)** La producción de clorofila ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a lo largo de 16 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de clorofila ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [\diamond]; N1 + C2 [\square]; N1 + C3 [\triangle]; N2 + C1 [\times]; N2 + C2 [\ast]; N2 + C3 [\circ]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [$-$]; N4 + C1 [\diamond]; N4 + C2 [\square]; N4 + C3 [\triangle]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

La Figura 6B muestra las curvas de producción de clorofila en diferentes cultivos. Inicialmente, al día 2, se observaron concentraciones bajas de clorofila, entre 0 a 0.011 $\mu\text{g}/\text{mL}$, probablemente, debido a la fase de adaptación celular. Posteriormente, desde el día 5, la mayoría de los cultivos experimentaron un aumento en la producción de clorofila, con la excepción de los cultivos mixotróficos con 1.25 g/L de NaNO_3 , el cultivo autótrofo con 2.5 g/L de NaNO_3 y aquellos sin NaNO_3 , que mostraron un incremento en el día 12. Este aumento está vinculado con la fase exponencial del crecimiento celular, observándose que tanto la densidad celular como la concentración de clorofila se elevan

con el incremento de la concentración de NaNO_3 , alcanzando sus máximos casi simultáneamente (**Zhang & Jianguo, 2016**)

Tras alcanzar valores máximos, se observó una disminución tanto de la concentración de clorofila, así como de la concentración celular. Dicho efecto podría estar relacionado al agotamiento de nutrientes, evidenciado en los cultivos con 0.625 y 1.25 g/L de NaNO_3 que entran en fase estacionaria. En los cultivos con 2.5 g/L de NaNO_3 , la disminución progresiva de la clorofila sugiere una posible limitación de la fuente de nitrógeno, afectando así la producción de clorofila.

La mejor concentración de nitrato para el aislamiento CLMR1 produce un rendimiento diferente en *Neochloris oleobundans*, ya que necesita entre 12.75 y 17 g/L de nitrato para obtener cantidades significativas de clorofila (**Li et al., 2008**) Por lo contrario, en investigaciones realizadas con *S. obliquus*, *Chlamydomonas sp* y *Chlorella sp* disminuyeron la concentración de clorofila conforme aumentaba la concentración de nitrato (**Çelekli & Balci, 2009; Rani & Maróti, 2021**). Esto sugiere que la cantidad de pigmentos en respuesta del estrés por nitratos varía según el género de microalga.

En base a los resultados obtenidos, el análisis de varianza ANOVA mostró que la cantidad de clorofila producida la biomasa del aislamiento CLMR1 es dependiente de la concentración de NaNO_3 y de la fuente de carbono suministrada al medio ($p < 0.05$). Por consiguiente, la prueba de comparación de Tukey dejó en evidencia que existen 4 niveles de significancia correspondientes a cada concentración de NaNO_3 (Tabla 5); mientras que, tomando en cuenta las fuentes de carbono, existió 2 grupos de significancia, donde los tratamientos CO_2 y EG pertenecen al mismo nivel ($p < 0.05$) (Tabla 5).

La síntesis de pigmentos en las microalgas, como la clorofila, es significativamente influenciada por el nitrógeno, similar a su efecto en la producción de proteínas y generación de biomasa (**Loreto et al., 2004**). La Figura 6B resalta que los tratamientos suplementados con la concentración más alta de NaNO_3 (2.5 g/L) registraron una producción de clorofila superior en comparación con bajas concentraciones. La

concentración máxima de clorofila fue de 0.274 $\mu\text{g/mL}$ en el cultivo mixotrófico suplementado con EG. Por lo contrario, el tratamiento autotrófico suplementado con 0 g/L de NaNO_3 presentó la mínima concentración de 0.006 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4). En este contexto, el cultivo mixotrófico fue capaz de producir 45.66 veces más en comparación con el cultivo autotrófico.

Este estudio respalda las investigaciones previas que indican que la disminución en el contenido de clorofila se debe a la reducción de la concentración de la fuente de nitrógeno por el consumo de las microalgas. Por ejemplo, en cultivos de *Scenedesmus sp*, se observó una disminución en el contenido de clorofila de 7.13 a 1.89 $\mu\text{g/mL}$. Esta variación ocurrió bajo un contexto donde la concentración inicial nitrato de 0.247 se redujo a 0 g/L (**Pancha et al., 2014**). En este contexto, *Scenedesmus sp* fue capaz de producir 26.02 veces más clorofila, tomando en cuenta las mejores condiciones de cada estudio. Esto indica que, la generación de clorofila depende tanto de la cantidad de nitrógeno suministrada como de la especie de microalga.

3.1.5. Evaluación de la cantidad de carotenoides contenidos en la biomasa de microorganismos fotosintéticos

La presencia de los pigmentos carotenoides es indispensable para las microalgas, ya que protegen los sistemas fotosintéticos, de manera que neutralizan las fases mas energéticas de la clorofila debido a la excesiva radiación de luz (**Cicccone et al., 2013**). Entre los carotenoides que más producen las microalgas son el licopeno, astanxantina, luteína, violaxantina y β -caroteno (**Gong & Bassi, 2016**). La presencia de β -caroteno indica su participación en la fotosíntesis, ya que es el responsable de transferir la energía de la luz a las clorofilas con el fin de ampliar el espectro de absorción de luz (**Egeland, 2016**).

Se evaluó la cantidad de carotenoides producidos a partir del medio BBM suplementado con distintas concentraciones de NaNO_3 (0, 0.625, 1.25 y 2.5 g/L) en conjunto con fuentes

de carbono (CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EG}$ y $\text{CO}_2 + \text{NaOAc}$). La Figura 7 representa la cantidad de carotenoides producidos bajo las condiciones de estudio mencionadas.

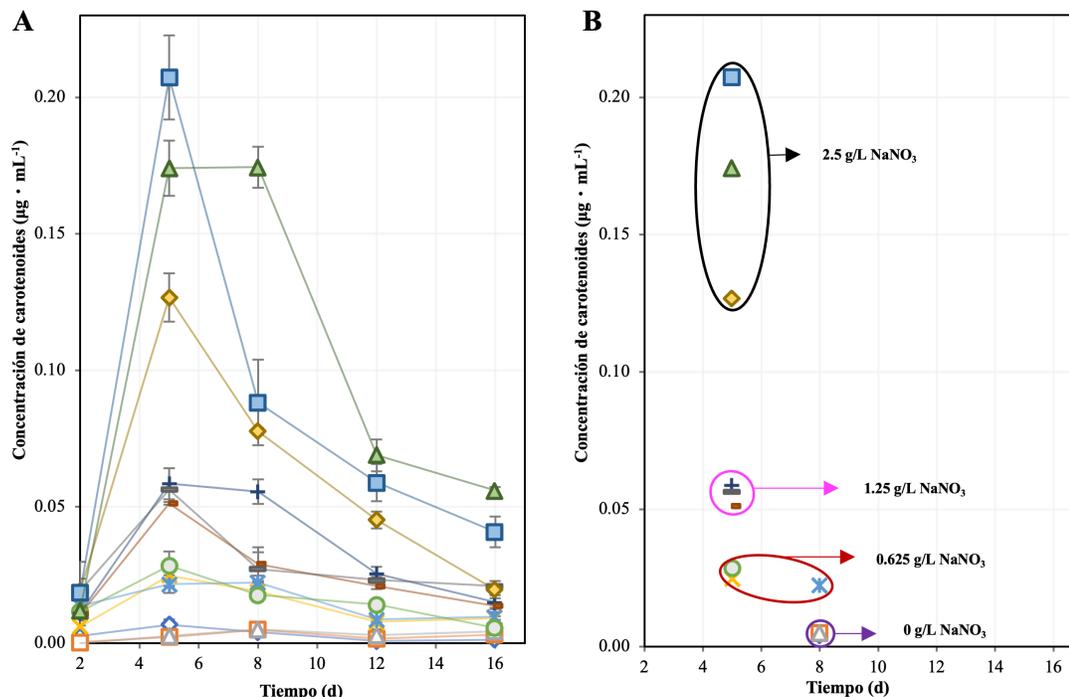


Figura 7. Curva de la concentración de carotenoides producido a partir del aislamiento CLMRI

La gráfica representa: **(A)** La producción de carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a lo largo de 16 días a partir de la densidad celular, **(B)** Los valores máximos de producción de carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) empleado distintas concentraciones de nitrógeno y fuentes de carbono al medio de cultivo: N1 + C1 [\diamond]; N1 + C2 [\square]; N1 + C3 [\triangle]; N2 + C1 [\times]; N2 + C2 [\ast]; N2 + C3 [\circ]; N3 + C1 [$+$]; N3 + C2 [$-$]; N3 + C3 [\dashv]; N4 + C1 [\diamond]; N4 + C2 [\square]; N4 + C3 [\triangle]. Las líneas verticales presentes en cada punto representan la desviación estándar con respecto a la media.

En la Figura 7 se detalla la concentración de carotenoides en base a las condiciones de estudio durante 16 días. Primeramente, al día 2, no se evidenció una generación significativa de carotenoides. La escasa producción podría ser un indicativo que el crecimiento celular se encuentra en una fase de adaptación al cultivo.

A partir del quinto día se observó un aumento significativo en la producción de carotenoides. La Figura 7B muestra que los tratamientos alcanzaron su máximo de producción en este punto, excepto los cultivos que se suplementaron con 0 g/L de NaNO₃ y el cultivo mixotrófico adaptado con 0.625 g/L de NaNO₃ + EG, que alcanzaron su pico máximo de producción en el día 12. El aumento de la acumulación de carotenoides podría atribuirse a la producción de β-caroteno y luteína. Estos, al ser carotenoides primarios, juegan un papel crucial en la absorción de luz y en la reducción del exceso de energía en el metabolismo fotosintético contribuyendo la preservación de la viabilidad celular (Egeland, 2016).

En tal sentido, se deja en evidencia que la concentración de la fuente de nitrógeno afecta directamente a la producción de carotenoides debido a que, al tener una mayor concentración celular generada por una mayor concentración de nitrógeno, existe un mayor número de células capaces de producir este pigmento. Así mismo, el estudio realizado por Villegas et al. (2020), aseguran que el crecimiento de la biomasa de *Scenedesmus sp.* se vio influenciado por altas concentraciones de la fuente de nitrógeno, por ende, se obtuvo una mayor concentración de pigmentos carotenoides

Además, el presente estudio deja en evidencia el consumo de la fuente de nitrógeno por parte de las microalgas para su desarrollo y crecimiento durante la fase exponencial. Bajo estas condiciones, Pisal & Lele (2005), encontraron que, en *D. salina*, el consumo de nitrógeno estaba correlacionado con el aumento de β-caroteno de 1.5 pg a 7.05 pg/célula. Estos hallazgos señalan la relación entre el consumo de nitrógeno y la producción de carotenoides por parte de los microorganismos fotosintéticos.

Por otro lado, la Figura 7A, se observa que, en la mayoría de los tratamientos, la concentración de carotenoides comienza a disminuir a partir del octavo día. Los resultados contrastan con otras investigaciones que afirman un incremento en la síntesis de carotenoides en microalgas durante una fase estacionaria o bajo condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes (Ren et al., 2021). Sin embargo, Fernandes et al., (2018), plantean que los carotenoides son propensos a la degradación debido a su

estructura química, haciéndolos vulnerables a tipos de oxidación como autooxidación, fotooxidación y oxidación enzimática. Actualmente no existen investigaciones donde se presente este fenómeno, la literatura sugiere que la susceptibilidad a la degradación podría complicar la medición precisa de carotenoides (**Schieber & Weber, 2016**).

Según los datos obtenidos, el análisis de varianza ANOVA demostró que la cantidad de carotenoides producida en la biomasa del aislamiento CLMR1 es dependiente de la concentración de NaNO_3 suministrada al medio ($p < 0.05$). La prueba de comparación de Tukey estableció 4 niveles de significancia correspondientes a cada concentración de NaNO_3 (Tabla 5); mientras que, tomando en cuenta las fuentes de carbono, no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) (Tabla 5).

Los valores máximos de cada tratamiento están representados en la Tabla 4, donde la máxima producción de carotenoides se registró con el tratamiento mixotrófico suplementado con EG y 2.5 g/L de NaNO_3 el cual produjo 0.207 $\mu\text{g/mL}$ al cabo de 5 días. Por otro lado, la mínima concentración registrada fue de 0.004 $\mu\text{g/mL}$, producido en el cultivo autótrofo con 0 g/L de NaNO_3 . De tal modo, el cultivo suplementado con la máxima concentración de NaNO_3 fue capaz de producir 51.75 veces más respecto al cultivo más limitado.

Sin embargo, los resultados no mostraron una interacción significativa entre la concentración de NaNO_3 y la fuente de carbono en cuanto a la producción de carotenoides. Este hallazgo de evidencia en el estudio con *Chromochloris zofingiensis*, que no mostró diferencias notables en la producción de carotenoides en presencia o ausencia de NaOAc en un tratamiento con 0.75 g/L de NaNO_3 , donde se obtuvieron producciones de 1.8 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Wood et al., 2022**). Por lo tanto, la influencia de NaNO_3 en la producción de carotenoides fue independiente de la fuente de carbono usada.

Por último, se destaca que *C. zofingiensis* produjo 8.69 veces más carotenoides que el aislamiento en estudio. Esto indica una mayor biosíntesis de esta microalga, lo que resalta la importancia de la selección de cepas en la producción de pigmentos carotenoides.

Tabla 4. Promedio de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por CLMR1 empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N1 + C1	0.616 (8)	15.78 (8)	0.008 (12)	0.007 (5)
N1 + C2	0.452 (12)	19.53 (12)	0.009 (12)	0.005 (8)
N1 + C3	0.376 (12)	26.06 (12)	0.006 (12)	0.005 (8)
N2 + C1	1.356 (8)	621.61 (16)	0.05 (5)	0.025 (5)
N2 + C2	1.012 (8)	690.22 (16)	0.041 (5)	0.022 (5)
N2 + C3	1.284 (8)	830.22 (12)	0.041 (5)	0.028 (5)
N3 + C1	1.456 (12)	886.61 (16)	0.08 (8)	0.058 (5)
N3 + C2	1.244 (12)	987.86 (12)	0.074 (8)	0.051 (5)
N3 + C3	1.704 (12)	901.61 (12)	0.055 (5)	0.056 (5)
N4 + C1	1.964 (8)	1005.92 (12)	0.158 (8)	0.127 (5)
N4 + C2	2.152 (8)	1015.78 (12)	0.274 (5)	0.207 (5)
N4 + C3	2.312 (8)	1010.36 (16)	0.186 (5)	0.174 (8)

Nota: Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo al cual se observó la mayor producción de cada metabolito. Cabe mencionar que cada tratamiento presentó una cinética distinta, con picos máximos de producción en diferentes estados de cultivo.

Tabla 5. Intervalos de producción máxima de metabolitos primarios y secundarios por CLMR1 empleando diferentes concentraciones de NaNO₃ y fuente de carbono.

Tratamiento	Producción máxima (µg/mL)			
	Proteína	Carbohidratos	Clorofila	Carotenoides
N1 + C1	0.6 ± 0.62 ^{AF'} (8)	18.9 ± 12.5 ^{AA'} (8)	0.009 ± 0.006 ^{AE'} (12)	0.005 ± 0.003 ^{AC'} (8)
N1 + C2	0.44 ± 0.46 ^{AF'} (8)	20.6 ± 18.4 ^{AD'} (12)	0.006 ± 0.013 ^{AB'} (12)	0.005 ± 0.004 ^{AC'} (8)
N1 + C3	0.3 ± 0.44 ^{AG'} (12)	27.0 ± 25.0 ^{AD'} (12)	0.009 ± 0.003 ^{AE'} (12)	0.005 ± 0.005 ^{AC'} (8)
N2 + C1	1.32 ± 1.38 ^{BF'} (8)	639.2 ± 603.9 ^{BA'} (16)	0.04 ± 0.05 ^{BE'} (5)	0.02 ± 0.027 ^{BC'} (5)
N2 + C2	0.94 ± 1.1 ^{BF'} (8)	705.9 ± 674.5 ^{BD'} (16)	0.04 ± 0.03 ^{BB'} (5)	0.01 ± 0.02 ^{BC'} (5)
N2 + C3	1.15 ± 1.41 ^{BG'} (8)	842.5 ± 817.8 ^{BD'} (12)	0.04 ± 0.03 ^{BE'} (5)	0.02 ± 0.03 ^{BC'} (5)
N3 + C1	1.49 ± 1.42 ^{CF'} (12)	900.3 ± 12.58 ^{CA'} (16)	0.08 ± 0.07 ^{CE'} (8)	0.05 ± 0.06 ^{BC'} (5)
N3 + C2	1.25 ± 1.23 ^{CF'} (12)	1011.1 ± 964.5 ^{CD'} (12)	0.08 ± 0.06 ^{CB'} (8)	0.05 ± 0.05 ^{BC'} (5)
N3 + C3	1.74 ± 1.66 ^{CG'} (12)	890.6 ± 912.5 ^{CD'} (12)	0.06 ± 0.047 ^{CE'} (5)	0.06 ± 0.05 ^{BC'} (5)
N4 + C1	1.36 ± 1.38 ^{DF'} (8)	1036.1 ± 975.6 ^{DA'} (12)	0.15 ± 0.16 ^{DE'} (8)	0.13 ± 0.12 ^{CC'} (5)
N4 + C2	2.14 ± 2.16 ^{DF'} (8)	1004.2 ± 1027.3 ^{DD'} (12)	0.26 ± 0.27 ^{DB'} (5)	0.21 ± 0.19 ^{CC'} (5)

N4 + C3	2.35 ± 2.26 ^{DG'}	1023.9 ± 996.7 ^{DD'}	0.17 ± 0.19 ^{DE'}	0.18 ± 0.16 ^{CC'}
	(8)	(16)	(5)	(8)

Nota: Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo al cual se observó la mayor producción de cada metabolito debido a que cada tratamiento presentó una cinética distinta. Los superíndices ubicados en la parte superior derecha (A, B, C, D) indican los niveles de significancia para la concentración de nitrógeno, mientras que, (A', B', C', D', E', F', G') indican los niveles de significancia para la fuente de carbono, según la prueba de Tukey.

3.1.6. Análisis morfológico mediante microscopía.

La morfología del aislamiento CLMR1 se evaluó en distintas concentraciones de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5) y a distintas fuentes de carbono (CO₂, EG y NaOAc). De acuerdo con la investigación realizada por **Hourcade et al., (2023)**, los factores ambientales inducen la adaptación celular, así como cambios en la morfología, composición bioquímica y fisiología de las microalgas. Por lo tanto, dichos cambios dependen de la variación y composición del medio en el que se desarrollen. De forma similar, en la Figura 8 la forma, el tamaño, el color y la estructura de las células cambiaron según el tratamiento y conforme el tiempo.

El análisis morfológico indicó que los cultivos autotróficos (CO₂) presentaron un crecimiento similar a lo largo de todo el ensayo, independientemente de la concentración de NaNO₃ suministrada. Además, la morfología celular en el día 2 fue similar en todos los tratamientos. En esta etapa temprana del cultivo, las células mostraron una forma elíptica, una pared celular sumamente delgada y pigmentación celular verde claro. En la estructura celular interna se observan cloroplastos y posiblemente el núcleo. A partir del día 8, se notó un aumento considerable en el tamaño celular, adoptando una forma más circular y un cambio de pigmentación de verde tenue a naranja. Posiblemente sea por la biosíntesis de pigmentos como clorofila y carotenoides (**Núñez, 2013**). Por otro lado, las células del cultivo suplementado con 0 g/L de NaNO₃ + CO₂, presentaron una morfología similar desde el día 2 hasta el día 12, las cuales tuvieron una forma ovalada, achatada a los polos, además que no existe una diferencia significativa en cuanto a su tamaño. No se evidenció

ningún tipo de división celular o formación de colonias, al contrario, se observaron células individuales. De tal modo, la inanición de NaNO_3 no afectaría a la morfología, pero sí limitaría el crecimiento celular (**Khatoon et al., 2022**).

El uso del EG como fuente orgánica de carbono presentó un efecto negativo en la morfología celular, particularmente en nulas concentraciones de NaNO_3 . Según se evidencia en la Figura 9A, (C2, día 16) se observó una posible disgregación celular, la cual pudo ser causada por estrés o toxicidad por la presencia del EG (**Pillard & DuFresne, 1999**). Sin embargo, a medida que la concentración de NaNO_3 aumenta, existe mayor crecimiento celular en comparación con los cultivos sin NaNO_3 . Esto concuerda con los resultados obtenidos por (**Rani & Maróti, 2021**), donde el tamaño de las células de *Chlamydomonas sp.* y *Chlorella sp.* aumentaron a medida que hubo mayor concentración de nitrato. No obstante, en el tratamiento con 1.25 g/L de NaNO_3 se percibe una disminución celular y una morfología menos definida tras 12 días de cultivo (Figura 9C, C2, Día 12). Esto podría indicar un leve efecto de toxicidad por el EG o producto de las interacciones microbianas causadas por la adición de fuentes de carbono orgánicas (**Salvatore et al., 2023**). Por otro lado, las células en los cultivos con 0.625 y 2.5 g/L de NaNO_3 (Figura 9B, D, C2) muestran un aumento de tamaño tras 12 días. Este fenómeno puede estar relacionado al aumento de biomoléculas como almidón y lípidos contenidos por condiciones de estrés, como se observa en *Scenedesmus sp.*, *H. pluvialis* y *C. vulgaris* en el estudio de **Hourcade et al. (2023)**

Por último, los cultivos suplementados con NaOAc en concentraciones de 0.625, 1.25 y 2.5 g/L mostraron diferencias morfológicas significativas en comparación con los tratamientos suplementados con CO_2 y EG. Estas diferencias se observaron a partir del día 12, ya que se identificaron agregados celulares más grandes, mayor agrupación celular y una pigmentación más intensa y notable en comparación con los cultivos que mostraron tonalidades más tenues y apagadas. Según **George et al. (2014)**, el agrupamiento celulares signo de estrés, causado por la limitación de nutrientes, además de la posible acción del NaOAc en la división celular como respuesta a la falta de nitrógeno en el medio Este análisis es similar al mencionado por Goulding & Merrett (1966), quienes encontraron

que en *Chlorella pyrenoidosa*, la asimilación de NaOAc bajo condiciones mixotróficas provocó un incremento en el tamaño celular, con diámetros de hasta 11.8 μm en comparación con los 0.8 μm en condiciones autotróficas

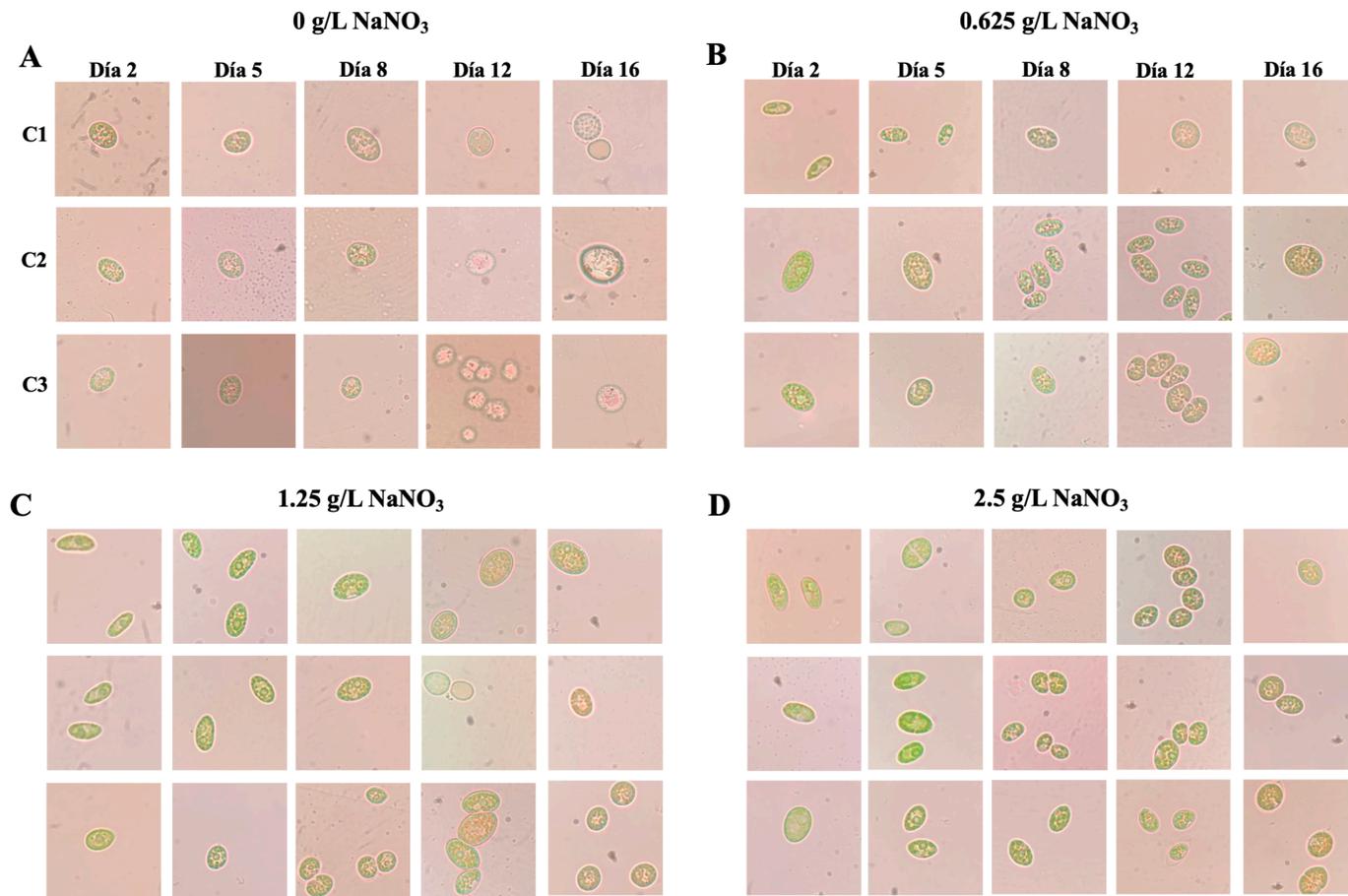


Figura 8. Morfología celular del aislamiento CLMR1 a lo largo de su fase de crecimiento vista desde un microscopio binocular (100x). Se representa la morfología de cada tratamiento aplicando distintas concentraciones de NaNO₃ (0, 0.625, 1.25 y 2.5 g/L), además de las diferentes fuentes de carbono: (C1) CO₂, (C2) CO₂ + EG, (C3) CO₂ + NaOAc. Las fotografías corresponden a los días 2, 5, 8, 12 y 16 del cultivo.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En el presente estudio se evaluó la cinética de crecimiento del aislamiento CLMR1 y su capacidad para producir proteína, carbohidratos, clorofila y carotenoides empleando distintas concentraciones de NaNO_3 y fuentes de carbono. Los resultados obtenidos indican que la concentración de NaNO_3 incide significativamente tanto en la densidad celular generada como en los metabolitos contenidos. Mientras que la influencia de las distintas fuentes de carbono varía según las necesidades metabólicas.

Se estimó la cinética de crecimiento del aislamiento celular CLMR1, el cual presentó distintos comportamientos según la concentración de NaNO_3 . En los cultivos en ausencia de NaNO_3 , la concentración celular se mantuvo constante, con un incremento casi imperceptible (2×10^5 células/mL). Sin embargo, altas concentraciones de NaNO_3 inducen un crecimiento celular más acelerado, obteniendo la mayor densidad celular (2.1×10^7 células/mL) al octavo día de cultivo cuando el medio se suplementó con 2.5 g/L de NaNO_3 + EG.

La concentración de NaNO_3 y la fuente de carbono suministrada influye significativamente en el contenido de proteína del aislamiento CLMR1. La concentración más alta de proteína (2.312 $\mu\text{g/mL}$) se obtuvo a partir del cultivo mixotrófico suplementado con 2.5 g/L de NaNO_3 + NaOAc. En contraste, la menor producción de proteína (0.376 $\mu\text{g/mL}$) se observó en el cultivo con 0 g/L de NaNO_3 + NaOAc, ambos en el día 8 de cultivo. En síntesis, se constató que a mayor concentración de NaNO_3 , mayor es el impacto del NaOAc en la producción de proteínas.

Se evaluó la producción de carbohidratos a partir del aislamiento CLMR1 y se concluyó que tanto la concentración de NaNO_3 como las fuentes de carbono afectan significativamente su generación. El tratamiento más efectivo fue el cultivo mixotrófico

enriquecido con 2.5 g/L de NaNO₃ y EG, alcanzando una producción de 1015.78 µg/mL en el último día de cultivo. La menor concentración fue de 15.78 µg/mL producido en el medio autotrófico suplementado con 0 g/L de NaNO₃ en el día 8. Los resultados obtenidos sugieren el uso de cultivos mixotróficos suplementados con altas concentraciones de NaNO₃ son más eficientes para la obtención de mayor concentración de carbohidratos y que los carbohidratos se acumulan hacia el final de la curva de crecimiento.

Se evaluó la producción de pigmentos contenidos en la densidad celular generada, donde la concentración de NaNO₃ influye en la síntesis de clorofila y carotenoides. Sin embargo, las fuentes de carbono solo inciden en la biosíntesis de clorofila. De tal modo, los medios mixotróficos suplementados con EG resultaron ser los más eficientes en combinación con la mayor concentración de NaNO₃ al día 5. La mayor concentración de clorofila y carotenoides fueron de 0.274 y 0.207 µg/mL respectivamente. En contraste, la menor concentración se registró en el cultivo con nula concentración de NaNO₃ + NaOAc, el cual produjo 0.006 µg/mL de clorofila y 0.005 µg/mL de carotenoides. En definitiva, la presencia de EG promueve la producción de clorofila siempre que esté en combinación con una elevada concentración de NaNO₃. Se sugiere que la producción de carotenoides pudo verse afectada por su degradación debido al estrés oxidativo ocasionado por las condiciones de cultivo.

Se analizó la morfología de las células del aislamiento CLMR1 y a lo largo del experimento, se registraron cambios morfológicos significativos. Los cambios más notorios se observaron en cultivos autótrofos con ausencia de NaNO₃, donde las células adoptaron una forma circular, no se evidenció un desarrollo celular o aglomeraciones celulares y no mostraron cambios en su pigmentación. En contraste, en los cultivos mixotróficos, se observó una variación constante en el tamaño, color y forma celular, que progresivamente se tornó elipsoidal durante el cultivo. De tal manera, la concentración de NaNO₃ y las diferentes fuentes de carbono causaron un ensanchamiento de las células; además, a partir del día 12, las células cambiaron de color, de un color verde claro a un naranja marrón debido a la acumulación de biomoléculas como carbohidratos, lípidos y pigmentos.

4.2. Recomendaciones

Aplicar concentraciones mayores a 2.5 g/L de NaNO_3 al medio BBM con el objeto de optimizar la producción de biomasa microalgal y su efecto en la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios. Además, es fundamental evaluar los posibles efectos tóxicos derivados del uso de concentraciones excesivas de NaNO_3 .

Evaluar el efecto de nuevas fuentes orgánicas de carbono tales como como la glucosa y el glicerol y su efecto sobre la generación de densidad celular y la producción de carbohidratos totales.

Analizar la cantidad de nitrógeno consumido por el cultivo de microalgas, con el fin de identificar y prevenir condiciones de estrés o desequilibrio nutricional, lo cual puede afectar negativamente en el desarrollo celular y la producción de biomoléculas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, A., Fidalgo, E., & Torres, H. (2016). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*.
<https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abreu, A., Fernandes, B., Vicente, A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, 61–66.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.055>
- Abreu, A. P., Martins, R., & Nunes, J. (2023). Emerging Applications of *Chlorella sp.* and *Spirulina (Arthrospira) sp.* *Bioengineering 2023, Vol. 10, Page 955, 10(8), 955*. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10080955>
- Álvarez, A., Matos, Y., Cáceres, M., Delgado, Á., & Solano, A. (2015). *Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos*.
- Álvarez, E. G. (2022). *Efecto de la composición espectral de luz en la composición bioquímica y estandarización de procedimientos para el análisis de la expresión génica de Arthrospira (Spirulina) maxima.pdf*.
- Ardila, Á., López, M., Vásquez, C., González, D., & Barajas, S. (2017). Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *TecnoLógicas*, 20(38), 83.
<https://doi.org/10.22430/22565337.581>
- Barbarino, E., & Lourenço, S. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 447–460. <https://doi.org/10.1007/S10811-005-1641-4>
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs 2019, Vol. 17, Page 304, 17(5), 304*. <https://doi.org/10.3390/MD17050304>
- Beatriz, A., Castro, R., & Panamericana, E. A. (2019). *Evaluación del desempeño de humedales artificiales a escala piloto en la remoción de nitrógeno y fósforo de*

lixiviados agrícolas Evaluación del desempeño de humedales artificiales a escala piloto en la remoción de nitrógeno y fósforo de lixiviados agrícolas.

- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2006.11.002>
- Bekirogullari, M., Torres, Gonzalo., Pittman, Jon., & Theodoropoulos, C. (2020). Models of microalgal cultivation for added-value products - A review. *Biotechnology Advances*, 44, 107609. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107609>
- Ben, H., Dammak, M., Karkouch, N., Hentati, F., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2019). Optimal cultivation towards enhanced biomass and floridean starch production by *Porphyridium marinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 152–161. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.01.207>
- Bernal, C. (2015). Extracción de proteínas de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* asistido por ultrasonido. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 96.
- Braga, V., Mastrantonio, D., Costa, J., & Morais, M. (2018). Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. *Bioresource Technology*, 269, 221–226. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.08.105>
- Braida, V., Nervi, E., & Campot, M. (2015). *Aplicaciones del cultivo de microalgas en arquitectura sustentable.*
- Brown, M. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145(1), 79–99. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90007-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90007-J)
- Burlew, J. (1953). Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. *AIBS Bulletin*, 3(5), 11–11. <https://doi.org/10.1093/AIBSBULLETIN/3.5.11>
- Capa, W. (2022). *Mixotrofia fotosintética inducida en Dunaliella salina: rendimiento y rutas de biosíntesis de isoprenoides, β-caroteno y carotenogénesis.*

- Carrera, M., & García, M. (2022). Producción de bioetanol utilizando biomasa de un cultivo mixto de microalgas como materia prima. In *Braz Dent J.* (Vol. 33, Issue 1).
- Castañeda, M., Stephano, J. L., & Borunda, E. (2012). Evaluación del efecto del CO₂ en el crecimiento y composición bioquímica en condiciones de fotobiorreactor. *Tesis de Maestría*, 118. <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/2251>
- Castelo, E. (2018). *Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga Desmodesmus communis sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros.*
- Çelekli, A., & Balçı, M. (2009). *The influence of different phosphate and nitrate concentrations on growth, protein and chlorophyll a content of Scenedesmus obliquus.*
- Chalima, A., Oliver, L., De Castro, L. F., Karnaouri, A., Dietrich, T., & Topakas, E. (2017). Utilization of volatile fatty acids from microalgae for the production of high added value compounds. *Fermentation 2017, Vol. 3, Page 54, 3(4)*, 54. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION3040054>
- Chen, C., Yeh, K., Aisyah, R., Lee, D., & Chang, J. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.159>
- Chia, S., Chew, K., Zaid, H., Chu, D., Tao, Y., & Show, P. L. (2019). Microalgal Protein Extraction From *Chlorella vulgaris* FSP-E Using Triphasic Partitioning Technique With Sonication. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 493723. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00396/BIBTEX>
- Ciccone, M., Cortese, F., Gesualdo, M., Carbonara, S., Zito, A., Ricci, G., De Pascalis, F., Scicchitano, P., & Riccioni, G. (2013). Dietary Intake of Carotenoids and Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Cardiovascular Care. *Mediators Inflamm*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/782137>

- de Souza, L., Martins, M., Pisani, L., Ventura, S., & de Rosso, V. (2021). Insights on the use of alternative solvents and technologies to recover bio-based food pigments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 787–818. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12685>
- Del Carmen, M., & García, C. (2013). *Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales*.
- Di Salvo, E., Lo Vecchio, G., De Pasquale, R., De Maria, L., Tardugno, R., Vadalà, R., & Cicero, N. (2023). Natural Pigments Production and Their Application in Food, Health and Other Industries. *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 1923, 15(8), 1923. <https://doi.org/10.3390/NU15081923>
- Duran, S., Kumar, P., & Sandhu, S. S. (2021). A review on microalgae strains, cultivation, harvesting, biodiesel conversion and engine implementation. *Biofuels*, 12(1), 91–102. <https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1457314>
- Egeland, E. S. (2016). Carotenoids. *The Physiology of Microalgae*, 507–563. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_20
- Escobedo, M., & Calderón, A. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265–282. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.030>
- Estévez, O. (2021). *Cultivo de microalgas mediante el uso de fotobiorreactores*. <https://www.petroenergia.info/post/cultivo-de-microalgas-mediante-el-uso-de-fotobiorreactores>
- FAO. (2021). *Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development*. <https://www.fao.org/3/cb5670en/cb5670en.pdf>
- FAO. (2023a). *Agricultural production statistics 2000-2022 FAOSTAT Analytical Brief 79 FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- FAO. (2023b). COP26 - La expansión agrícola causa cerca del 90 % de la deforestación mundial. *FAO Publications Catalogue 2023*. <https://doi.org/10.4060/CC7285EN>
- FAO. (2023c). *Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*. <https://doi.org/10.4060/CC7285EN>

- FAO. (2023d). *Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos*.
<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/contaminants/es/#>
- Fernandes, A., Nascimento, T., Lopes, E., Rosso, V., & Zepka, L. (2018). Introductory Chapter: Carotenoids - A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. *Progress in Carotenoid Research*.
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79542>
- Fetanat, A., Tayebi, M., & Mofid, H. (2021). Water-energy-food security nexus based selection of energy recovery from wastewater treatment technologies: An extended decision making framework under intuitionistic fuzzy environment. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 43, 100937.
<https://doi.org/10.1016/J.SETA.2020.100937>
- Figueroa, G., Bermejo, E., Pittman, J., & Constantinos, T. (2020). *Microalgae strain catalogue*. Enhance MicroAlgae. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3780067>
- Figueroa, G., Padilla, E., Pittman, J., & Theodoropoulos, C. (2021). *Microalgae strain catalogue* . <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3780067>
- Galarza, V. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–12.
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
- García, J., López, J. A., Medina, D., García, N., & Fimbres, D. (2020). Effect of nitrogen and salinity stress on the β -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Biocencia*, 22(2), 13–19.
<https://doi.org/10.18633/biocencia.v22i2.1241>
- García, J., Vicente, M., & Galán, B. (2018). Presente y Futuro del Cultivo de las Microalgas para su uso como Superalimentos. *Mediterráneo Económico*, 29(2), 333–350.
- García, O., Escalante, F., de-Bashan, L., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.037>
- García, S. (2014). *Cosecha de microalgas con nanopartículas magnéticas*.
<http://addi.ehu.es/handle/10810/14866>

- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, *171*, 367–374. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.08.086>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, *34*(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.10.005>
- González, M., Guerrero, D., Jiménez, N., & Quezada, J. (2013). Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiol*, *4*(1), 23–33. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/20093>
- Goulding, K., & Merrett, M. (1966). The Photometabolism of Acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Experimental Botany*, *17*(4), 678–689. <https://doi.org/10.1093/JXB/17.4.678>
- Guzmán, A. (2023). Análisis de la dinámica de producción de carbohidratos de sistemas de cultivo de microalgas a través de simulación matemática. *Tesis de Maestría*, 1–23.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, *6*(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/FOODS6070053>
- Henriques, M., Rocha, J., Henriques, M., Silva, A., & Rocha, J. (2007). *Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method*. <https://www.researchgate.net/publication/237752510>
- Hourcade, M., Fernando, D., & Gentili, Francesco. (2023). Morphological and cellular organization of green microalgae to cope with cold stress in subarctic environment. *Algal Research*, *75*, 103254. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103254>
- Howard, Philip., Ajena, F., Yamaoka, M., & Clarke, A. (2021). Industry Convergence and Its Implications for Resilient and Equitable Food Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 684181. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.684181/BIBTEX>

- Jiménez, M., Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Natural Pigments of Microbial Origin. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 590439. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.590439/BIBTEX>
- Kanekiyo, K., Lee, J. B., Hayashi, K., Takenaka, H., Hayakawa, Y., Endo, S., & Hayashi, T. (2015). Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Natural Products*, 68(7), 1037–1041. <https://doi.org/10.1021/np050056c>
- Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., & Vacanti, J. P. (2006). *Microscale technologies for tissue engineering and biology*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507681102
- Khatoun, S., Rahman, R., Mazumder, R., & Hasan, S. (2022). Effects of sodium nitrate on the growth and proximate composition of the indigenous marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Aquatic Sciences and Engineering*, 37(1), 46–52. <https://doi.org/10.26650/ASE2021972678>
- Kishi, M., Kawai, M., & Toda, T. (2015). Heterotrophic utilization of ethylene glycol and propylene glycol by *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 11, 428–434. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.04.020>
- Leonardi, J. (2019). *Diseño, caracterización, modelado y optimización de fotobiorreactores destinados al cultivo de microalgas y la producción de metabolitos de interés tecnológico-biológico*.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1681-1>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*.
- Llopiz, A. (2016). Active compounds from cyanobacteria and microalgae: Properties and potential applications in biomedicine. *Bionatura*, 1(2), 79–88. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.8>
- López, A., Maya, Y., & Troyo, E. (2011). *Cianobacterias Criptobacterias: Una alternativa de agricultura orgánica*.

- López, X., Taramuel, A., Arboleda, C., & Segura, F. (2017). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. In *Rev. Cubana Quím* (Vol. 29, Issue 2). <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq>
- Loreto, C., Mora, R., & Morales, E. (2004). *Influencia del Nitrato Sobre la Producción de Biomasa, Pigmentos y Proteínas de la Cianobacteria Anabaena Sp.* *PCC* 7120. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9216/9205>
- Lu, K., Zhao, X., Ho, S. H., Ma, R., Xie, Y., & Chen, J. (2019). Biorefining and the Functional Properties of Proteins from Lipid and Pigment Extract Residue of *Chlorella pyrenoidosa*. *Marine Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/MD17080454>
- Martínez, K. (2019). *Extracción, separación y elucidación estructural de metabolitos de la microalga marina Tetraselmis striata*.
- Merck. (2024). *Protein Determination by the Bicinchoninic Acid (BCA) Method*. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination-by-the-bicinchoninic-acid-bca-method>
- Michelfelder, A. (2009). Soy: A Complete Source of Protein. *American Family Physician*, 79(1), 43–47. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2009/0101/p43.html>
- Murcia, L., & Parra, M. (2018). *Producción de proteínas a partir de la microalga Chlorella vulgaris enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno*. 21, 1–9.
- Nadir, S. (2016). *Introrducing a convenient way*. 1–23.
- Nehete, J., Bhambar, R., Narkhede, M., & Gawali, S. (2013). Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 107. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120508>
- Niccolai, A., Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). *Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>

- Núñez, C. (2013). Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz. *Hidrobiológica*, 13(3), 171–176.
- Ochoa, E. (2017). *Evaluación del crecimiento de cianobacterias en relación a los parámetros físico-químicos del agua en el lago Yahuarcocha*. http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/7586#.YrH-_2p4D6M.mendeley
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development*. <https://www.fao.org/3/cb5670en/cb5670en.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Alimentación sana*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- Ortega, J., & Moronta, R. (2004). Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella Sp*. *Ciencia*, 12(1), 25–31.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus sp*. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.025>
- Piguave, A., & Martínez, J. (2021). Dieta Cetogenica como alternativa para reducir peso efectos en la salud. *Repositorio de La Universidad Estatal de Milagro*. <http://repositorio.unemi.edu.ec/xmlui/handle/123456789/5398>
- Pillard, D., & DuFresne, D. (1999). Toxicity of formulated glycol deicers and ethylene and propylene glycol to *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Selenastrum capricornutum*, and *Lemna minor*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/S002449900486/METRICS>
- Pisal, D., & Lele, S. (2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 476–483. www.bccresearch.com
- Porra, R., Thompson, W., & Kriedemann, P. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of

- chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 975). Springer-Verlag.
- Ranadheer, P., Kona, R., Sreeharsha, R., & Venkata Mohan, S. (2019). Non-lethal nitrate supplementation enhances photosystem II efficiency in mixotrophic microalgae towards the synthesis of proteins and lipids. *Bioresource Technology*, 283, 373–377. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.03.089>
- Rani, V., & Maróti, G. (2021a). Assessment of nitrate removal capacity of two selected eukaryotic green microalgae. *Cells*, 10(9), 2490. <https://doi.org/10.3390/CELLS10092490/S1>
- Rani, V., & Maróti, G. (2021b). Assessment of nitrate removal capacity of two selected eukaryotic green microalgae. *Cells*, 10(9), 2490. <https://doi.org/10.3390/CELLS10092490/S1>
- Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J., & Chen, F. (2021). Carotenoid Production from Microalgae: Biosynthesis, Salinity Responses and Novel Biotechnologies. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 713, 19(12), 713. <https://doi.org/10.3390/MD19120713>
- Rendón, J., Ramírez, E., & Vélez, Y. (2015). *Microalgas para la industria alimenticia*. www.upb.edu.co
- Romagnoli, F., Arachchige, A., Paoli, R., Feofilovs, M., & Ievina, B. (2021). Growth Kinetic Model for Microalgae Cultivation in Open Raceway Ponds: A System Dynamics Tool. *Environmental and Climate Technologies*, 25(1), 1317–1336. <https://doi.org/10.2478/RTUECT-2021-0100>
- Rozi, F., Santoso, A., Mahendri, G., Hutapea, R., Wamaer, D., Siagian, V., Elisabeth, D., Sugiono, S., Handoko, H., Subagio, H., & Syam, A. (2023). Indonesian market demand patterns for food commodity sources of carbohydrates in facing the global food crisis. *Heliyon*, 9(6), e16809. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E16809>
- Rumin, J., Nicolau, E., de Oliveira, R. G., Grünewald, C., & Picot, L. (2020a). Analysis of Scientific Research Driving Microalgae Market Opportunities in Europe. *Marine Drugs*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/MD18050264>

- Rumin, J., Nicolau, E., de Oliveira, R., Grünewald, C., & Picot, L. (2020b). Analysis of Scientific Research Driving Microalgae Market Opportunities in Europe. *Marine Drugs*, *18*(5). <https://doi.org/10.3390/MD18050264>
- Sajadian, S., Morowvat, M., & Ghasemi, Y. (2018). Investigation of autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic modes of cultivation on lipid and biomass production in *Chlorella vulgaris*. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, *594*. <https://doi.org/10.5455/njppp.2018.8.0935625122017>
- Salgueiro, L., & Fernández, J. (2018). Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal. *Universidad de Vigo*, 1–197. <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1158>
- Salvatore, M., Carraturo, F., Salbitani, G., Rosati, L., De Risi, A., Andolfi, A., Salvatore, F., Guida, M., & Carfagna, S. (2023). Biological and metabolic effects of the association between the microalga *Galdieria sulphuraria* and the fungus *Penicillium citrinum*. *Scientific Reports 2023 13:1*, *13*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27827-6>
- Saravanan, P., Rajeshkannan, R., Rajasimman, M., Kamyab, H., & Vasseghian, Y. (2024). Exploring the diverse applications of Carbohydrate macromolecules in food, pharmaceutical, and environmental technologies. *Environmental Research*, *240*, 117521. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.117521>
- Schieber, A., & Weber, F. (2016). Carotenoids. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*, 101–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00005-1>
- Serrano, L., Solano, A., Delgado, Á., & Ferreira, C. (2012). Influencia de la relación carbono/nitrógeno en la producción de proteínas totales en *Chlorella Vulgari* s UTE X 1803. *Publicaciones e Investigación*, *6*, 49. <https://doi.org/10.22490/25394088.1111>
- Simionato, D., Block, M., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., & Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell*, *12*(5), 665–676. <https://doi.org/10.1128/EC.00363-12>

- Singh, T., Pandey, V., Dash, K., Zanwar, S., & Singh, R. (2023). Natural bio-colorant and pigments: Sources and applications in food processing. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100628. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100628>
- Steele, D. (2014). *Cellular viability and the occurrence and significance of chlorophyll allomers during phytoplankton turnover*. <https://core.ac.uk/download/pdf/42141921.pdf>
- Szklarek, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – An overview of methods. *Food Chemistry*, 394, 133466. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133466>
- Tang, D., Khoo, K., Chew, K., Tao, Y., Ho, S., & Show, P. (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource Technology*, 304, 122997. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122997>
- Tavares, R. (2017). *Bacterias fotosintéticas púrpuras aplicadas a bioelectrosíntesis*. <https://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2017/02/10/133029#:~:text=Este tipo de bacterias es,fotosíntesis en ausencia de oxígeno.>
- Teh, K., Loh, S., Aziz, A., Takahashi, K., Effendy, A., & Cha, T. (2021). Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris*. *Scientific Reports*, 11(1), 438. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-79950-3>
- Thepsuthammarat, K., Reungsang, A., & Plangklang, P. (2023). Microalga *Coelastrella* sp. Cultivation on unhydrolyzed molasses-based medium towards the optimization of conditions for growth and biomass production under mixotrophic cultivation. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 3603, 28(8), 3603. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28083603>
- Tibbetts, Sean., Milley, Joyce., & Lall, Santosh. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1109–1119. <https://doi.org/10.1007/S10811-014-0428-X/TABLES/4>

- Transparency Market Research. (2018). *Microalgae-based Products Market* .
<https://www.transparencymarketresearch.com/microalgae-based-products-market.html>
- Villegas, E., Páez, L., Castro, J., Londoño, S., Roperó, J., Martínez, J., & Solano, A. (2020). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la producción de carotenoides en microalgas. *Ingeniería y Competitividad*, 22(1), 1–13.
<https://doi.org/10.25100/iyc.v22i1.8686>
- Vo, T., Pham, M., Dang, B., Tran, C., Le, T., Nguyen, V., Nguyen, T., Lin, C., Varjani, S., Dao, T. S., Bui, T. V., Huynh, K. P. H., & Bui, X. T. (2022). Influence of nitrogen species and biomass retention time on nutrient removal and biomass productivity in a microalgae-based bioreactor. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102880.
<https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102880>
- Wang, Y., Yu, J., Wang, P., Deng, S., Chang, J., & Ran, Z. (2018). Response of energy microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen and phosphorus stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 5762–5770.
<https://doi.org/10.1007/S11356-017-0931-0/METRICS>
- Warburg, O. (1928). Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Über Die Katalytischen Wirkungen Der Lebendigen Substanz*, 308–340. https://doi.org/10.1007/978-3-642-47774-4_25
- Widjaja, A., Chien, C. C., & Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20.
<https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2008.07.007>
- Wood, E., Ross, M., Jubeau, S., Montalescot, V., & Stanley, M. (2022). Progress towards a targeted biorefinery of *Chromochloris zoofingiensis*: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022, 1, 1–26.
<https://doi.org/10.1007/S13399-022-02955-7>
- Yu, X., Ye, X., Hu, C., Xu, N., & Sun, X. (2022). Sodium acetate can promote the growth and astaxanthin accumulation in the unicellular green alga

- Haematococcus pluvialis as revealed by a proteomics approach. *Journal of Oceanology and Limnology*, 40(5), 2052–2067. <https://doi.org/10.1007/s00343-021-1271-y>
- Zambrano, C., Solórzano, L., Vargas, D., & Gómez, S. (2021). Impactos ambientales generados por la ganadería en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. *Publicación Cuatrimestral*, 5(2), 69–78. <https://orcid.org/0000-0001-8339-2051>
- Zhang, L., & Jianguo, L. (2016). Enhanced fatty acid accumulation in *Isochrysis galbana* by inhibition of the mitochondrial alternative oxidase pathway under nitrogen deprivation. *Bioresource Technology*, 211, 783–786. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.03.164>
- Zhang, Z., Chen, Y., Klausen, L., Skaanvik, S., Wang, D., Chen, J., & Dong, M. (2023). The Rational Design and Development of Microalgae-Based Biohybrid Materials for Biomedical Applications. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2022.09.016>
- Zhao, Q., & Huang, H. (2021). Microalgae cultivation. *Advances in Bioenergy*, 6(1), 37–115. <https://doi.org/10.1016/BS.AIBE.2021.05.003>