



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“ESTIMULACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS  
*Scenedesmus spp*, BAJO DOS MEDIOS DE CULTIVOS CONTROLADOS  
DE NPK”.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

ANTHONY DANIEL DELGADO SANTIANA

**TUTOR:**

Ing. JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO, MSc.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2025

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA

DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“ESTIMULACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS  
*Scenedesmus spp.*, BAJO DOS MEDIOS DE CULTIVOS CONTROLADOS  
DE NPK”.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

ANTHONY DANIEL DELGADO SANTIANA

**TUTOR:**

Ing. JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO, MSc

LA LIBERTAD – ECUADOR

2025

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “**ESTIMULACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS *SCENEDESMUS SPP*, BAJO DOS MEDIOS DE CULTIVOS CONTROLADOS DE NPK**”, elaborado por **DELGADO SANTIANA ANTHONY DANIEL**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



---

Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.

**DOCENTE TUTOR**

C.I. 0913270153

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “ESTIMULACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS *SCENEDESMUS* SPP, BAJO DOS MEDIOS DE CULTIVOS CONTROLADOS DE NPK”, elaborado por DELGADO SANTIANA ANTHONY DANIEL, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



---

Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D.  
**DOCENTE DE ÁREA**  
**C.I. 090769418-6**

## DEDICATORIA

A Jehová Dios por darme la sabiduría y conocimiento, sin su guía nada de lo alcanzado fuera posible. A pesar de los obstáculos presentados, mi confianza en Él me fortalece, siguiendo con determinación por el camino de la vida.

A mis padres Orlando Delgado y Maritza Santiana, les agradezco infinitamente, por mostrarme siempre su amor incondicional, superando juntos los problemas económicos y los golpes de la vida, velando siempre por el bienestar físico y espiritual de nuestra familia. A mis hermanos Carolina y Samuel Delgado, por ser mi apoyo, fuente de ánimo y el motivo para seguir adelante.

A mi querido hermano Kevin Delgado (+), a quien extraño mucho, gracias por ser un ejemplo de superación y trabajar con esfuerzo, sé que estarías muy feliz de ver tu nombre en este agradecimiento. A mis abuelos Gerardo Santiana (+) y Mariana Santiana por haberme criado en su regazo durante mis años de infancia. Finalmente, gracias a mis amigos, Luis Rodríguez, Nohelia Rosales, Lilia Rosales, Esteban Arias, Fernanda de Arias, Nelson Borbor, Darío Jiménez, Andrés Tomala y Eduardo Castro, por acompañarme en los momentos difíciles y ser una fuente de ánimo.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco inmensamente a la Universidad Estatal Península de Santa Elena y sus respectivas autoridades, por su capacidad formación y liderar el proceso de formación académica. De manera especial a cada uno de los docentes de la Facultad Ciencias del Mar, por impartir de manera idónea sus conocimientos y saberes.

En particular, a la Doctora Janeth Galarza y al departamento CIPBA, por ser pieza esencial en mi vida universitaria, abriéndome las puertas a nuevos conocimientos, siendo aquellas importantes en la base de este trabajo y experimentación.

De manera especial, al Ing. Jimmy Villón Moreno, tutor de tesis, por su excelente apoyo, orientación y tiempo dedicado, puesto que su profundo conocimiento e ideas fueron fundamentales para guiar la culminación de este trabajo de investigación.

# TRIBUNAL DE GRADO

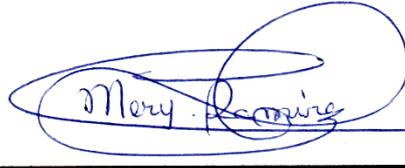
Trabajo de Integración Curricular presentado por **Delgado Santiana Anthony Daniel** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 11 de diciembre 2024



---

Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.  
**DIRECTOR DE CARRERA**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



---

Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D.  
**PROFESOR DE ÁREA**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.  
**DOCENTE TUTOR**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Blgo. Richard Duque Marin, M.Sc.  
**DOCENTE GUÍA DE LA UIC II**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

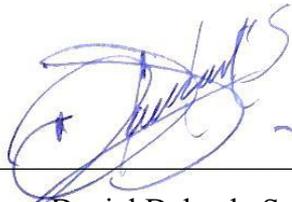


---

Lic. Pascual Roca Silvestre, MSc  
**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

Yo, **Anthony Daniel Delgado Santiana**, declaro que la responsabilidad de las ideas, contenido y análisis de resultados en este Trabajo de Integración Curricular, me pertenecen en exclusividad y el patrimonio intelectual del mismo le corresponde, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).



---

Anthony Daniel Delgado Santiana

**CI:** 2450040460

## INDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>PROBLEMÁTICA.....</b>	<b>5</b>
<b>JUSTIFICACION .....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
OBJETIVO GENERAL .....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>10</b>
Hipótesis nula .....	10
Hipótesis alternativa .....	10
<b>MARCO TEORICO.....</b>	<b>11</b>
Las microalgas.....	11
<i>Importancia de las microalgas.....</i>	<i>11</i>
<i>Características del género Scenedesmus .....</i>	<i>13</i>
Medios de cultivo utilizados para microalgas .....	14
<i>Medio Guillard F/2 .....</i>	<i>15</i>
<i>Medio Conway .....</i>	<i>16</i>
<i>Medio BG-11.....</i>	<i>17</i>
Nitrofoska foliar (NPK).....	17

Medio de cultivo basado en Nitrofoska (NPK) .....	18
<i>Nitrofoska (20-19-19)</i> .....	19
<i>Nitrofoska (30-10-10)</i> .....	20
<i>Nitrofoska (10-40-10)</i> .....	21
Producción lipídica en microalgas.....	21
Factores clave para el desarrollo y producción de lípidos en microalgas .....	24
<i>Nitrógeno (N)</i> .....	24
<i>Fósforo (P)</i> .....	24
<i>Potasio (K)</i> .....	25
Parámetros que influyen en el crecimiento microalgal. ....	27
<i>Luminosidad</i> .....	27
<i>pH</i> .....	27
<i>Agitación</i> .....	28
<i>Temperatura</i> .....	29
<i>Salinidad</i> .....	29
Cinética de crecimiento .....	30
<i>Fase de adaptación o latencia</i> .....	30
<i>Fase exponencial</i> .....	31
<i>Fase de desaceleración</i> .....	31

<i>Fase estacionaria</i> .....	32
<i>Fase de muerte</i> .....	32
<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>33</b>
Fase de laboratorio.....	34
<i>Cepas de microalga</i> .....	34
<i>Diseño experimental</i> .....	34
<i>Condiciones de cultivo</i> .....	36
<i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	37
<i>Recolección de biomasa</i> .....	38
<i>Extracción de lípidos por el método Bligh &amp; Dyer adaptado para microalgas</i> .....	39
Análisis estadístico .....	42
<i>Recuento celular en los cultivos de Scenedesmus spp</i> .....	42
<i>Determinación de concentración celular</i> .....	42
<i>Curva de crecimiento</i> .....	43
<i>Determinación de variables biocinéticas</i> .....	44
<i>Productividad de la biomasa</i> .....	45
<i>Cuantificación de lípidos</i> .....	45
<i>Análisis de varianza (ANOVA) multifactorial</i> .....	46
<b>ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADO</b> .....	<b>47</b>

Aplicación de Nitrógeno, Fósforo y Potasio para el cultivo de	
Microalgas .....	47
<i>Medio de cultivo a base de Nitrofoska.</i> .....	47
<i>Fertilización del medio de cultivo con Nitrofoska.</i> .....	47
Concentración celular NPK 20-19-19 – Medio control.....	48
Cinética de crecimiento NPK 20-19-19 .....	<b>50</b>
<i>Tasa de crecimiento (<math>\mu</math>)</i> .....	50
<i>Tiempo de duplicación (Td)</i> .....	50
Concentración celular NPK 30-10-10 – Medio experimental 1 .....	51
Cinética de crecimiento NPK 30-10-10.....	53
<i>Tasa de crecimiento (<math>\mu</math>)</i> .....	53
<i>Tiempo de duplicación (Td)</i> .....	54
Concentración celular NPK 10-40-10 – Medio experimental 2 .....	55
Cinética de crecimiento NPK 10-40-10.....	56
<i>Tasa de crecimiento (<math>\mu</math>)</i> .....	56
<i>Tiempo de duplicación (Td)</i> .....	57
Concentración celular en diferentes cultivos de NPK .....	58
Cinética de crecimiento en concentraciones de NPK.....	60
Obtención de biomasa en <i>Scenedesmus spp</i> .....	62
Productividad de biomasa obtenida en <i>Scenedesmus spp</i> .....	64

Lípidos extraídos en <i>Scenedesmus spp.</i> .....	67
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>75</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>89</b>

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>Figura 1.</b> Representación de la cepa <i>Scenedesmus spp.</i> Obtenida del microscopio óptico (10x).....	14
<b>Figura 2.</b> Cinética de crecimiento a través de un periodo de tiempo.....	30
<b>Figura 3.</b> Lugar de investigación. Ubicación del laboratorio CIBPA, mapa de la provincia de Santa Elena.....	33
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental. Escalamiento del cultivo <i>Scenedesmus spp.</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> Diseño experimental. Grupo control y cultivos con diferentes niveles de NPK.....	36
<b>Figura 6.</b> Obtención de biomasa seca de <i>Scenedesmus spp.</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> Recuento celular a través de la cámara Neubauer.....	43
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento para <i>Scenedesmus spp.</i> , bajo el medio control de cultivo NPK 20-19 -19.....	49
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento para <i>Scenedesmus spp.</i> , bajo el medio experimental de cultivo NPK 30-10 10.....	53

<b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento para <i>Scenedesmus spp</i> , bajo el medio experimental de cultivo NPK 10-40-10.....	56
<b>Figura 11.</b> Comparación de la curva de crecimiento para <i>Scenedesmus spp</i> , en las diferentes concentraciones de NPK (20-19-19), (30-10-10) y (10-40-10).....	58
<b>Figura 12.</b> Obtención de biomasa en <i>Scenedesmus spp</i> , según los medios de cultivos de Nitrofoska en diferentes concentraciones.....	64
<b>Figura 13.</b> Productividad de biomasa en <i>Scenedesmus spp</i> , según los medios de cultivos de Nitrofoska en diferentes concentraciones.....	66
<b>Figura 14.</b> Extracción lipídica proveniente de <i>Scenedesmus spp</i> , en medios de cultivos Nitrofoska en diferentes concentraciones.....	67

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de algas, su almacenamiento de energía y sus hábitats.....	12
<b>Tabla 2.</b> Nutrientes y Concentraciones del Medio Guillard F/2.....	15
<b>Tabla 3.</b> Nutrientes y Concentraciones del Medio Conway.....	16
<b>Tabla 4.</b> Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 20-19-19.....	20
<b>Tabla 5.</b> Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 30-10-10.....	20
<b>Tabla 6.</b> Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 10-40-10.....	21
<b>Tabla 7.</b> Especies de microalgas y sus contenidos lipídicos.....	22
<b>Tabla 8.</b> Composición en porcentajes de NPK en diferentes medios de cultivo. Grupo control, experimental T1 y experimental T2.....	37
<b>Tabla 9.</b> Concentración celular en medio control de cultivo NPK 20-19-19.....	48

<b>Tabla 10.</b> Tasa de crecimiento de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska 20-19-19. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	50
<b>Tabla 11.</b> Tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska .20-19-19. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	51
<b>Tabla 12.</b> Concentración celular en medio de cultivo experimental NPK 30-10-10.....	52
<b>Tabla 13.</b> Tasa de crecimiento de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	54
<b>Tabla 14.</b> Tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	54
<b>Tabla 15.</b> Concentración celular en medio de cultivo experimental NPK 10-40-10.....	55
<b>Tabla 16.</b> Tasa de crecimiento de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska 10-40-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	57

<b>Tabla 17.</b> Tiempo de duplicación de <i>Scenedesmus spp</i> , en medio de cultivo Nitrofoska 10-40-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	57
<b>Tabla 18.</b> Variables cinéticas de crecimiento en diferentes medios de cultivo NPK.....	60
<b>Tabla 19.</b> Obtención de biomasa en <i>Scenedesmus spp</i> , según los medios de cultivos de Nitrofoska. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	62
<b>Tabla 20.</b> Productividad de biomasa obtenida en <i>Scenedesmus spp</i> . C= medio control. T. T1= Tratamiento 1. T2= Tratamiento 2. SD=Desviación estándar.....	64
<b>Tabla 21.</b> Lípidos extraídos en <i>Scenedesmus spp</i> , según los medios de cultivos de Nitrofoska. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.....	68

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio control NPK 20-19-19.....	89
<b>Anexo 2.</b> Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio experimental T1 NPK 30-10-10.....	90
<b>Anexo 3.</b> Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio experimental T2 NPK 10-40-10.....	91
<b>Anexo 4.</b> Obtención y productividad de biomasa del medio control NPK 20-19-19.....	92
<b>Anexo 5.</b> Obtención y productividad de biomasa del medio experimental T1 NPK 30-10-10.....	93
<b>Anexo 6.</b> Obtención y productividad de biomasa del medio experimental T2 NPK 10-40-10.....	94
<b>Anexo 7.</b> Estadística descriptiva en la concentración celular del medio control NPK 20-19-19.....	95
<b>Anexo 8.</b> Estadística descriptiva en la concentración celular del medio experimental T1 NPK 30-10-10.....	95
<b>Anexo 9.</b> Estadística descriptiva en la concentración celular del medio experimental T2 NPK 10-40-10.....	95

<b>Anexo 10.</b> Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio control de NPK 20-19-19.....	96
<b>Anexo 11.</b> Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio experimental T1 de NPK 30-10-10.....	97
<b>Anexo 12.</b> Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio experimental T2 de NPK 10-40-10.....	98
<b>Anexo 13.</b> Prueba del análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05, para la extracción de lípidos.....	99
<b>Anexo 14.</b> Prueba HSD de Tukey entre los diferentes medios de cultivo con NPK.....	99
<b>Anexo 15.</b> Esterilización de los materiales de cultivo a través de autoclave.....	100
<b>Anexo 16.</b> Fertilización de los medios de cultivos con Nitrofoska.....	100
<b>Anexo 17.</b> Recolección de biomasa, utilizando centrifugadora Hermel Z366.....	101
<b>Anexo 18.</b> Secado de biomasa de <i>Scenedesmus spp</i> , utilizando la estufa.....	101
<b>Anexo 19.</b> Obtención de biomasa seca en <i>Scenedesmus spp</i> en los diferentes medios de cultivos.....	102

<b>Anexo 20.</b> Preparación de la muestra para la extracción de lípidos por el método Bligh & Dyer adaptado para microalga.....	102
<b>Anexo 21.</b> Cuantificación de lípidos extraído de <i>Scenedesmus spp</i> por peso.....	103

## GLOSARIO

**Fototrópicos:** Organismos que utilizan fuentes de energía naturales para su desarrollo de manera independiente.

**Cepa:** Especie de microalga que se encuentra aislada en estado sólido, para su posterior cultivo en laboratorios.

**Medio de cultivo:** Soluciones que contienen nutrientes, permitiendo un desarrollo y crecimiento óptimo de cepas.

**Nitrofoska:** Fertilizante agrícola utilizado para el desarrollo de plantas suministrando principalmente nitrógeno, fósforo y potasio.

**Estrés:** Cambios fisiológicos y químicos presentados por determinada especie, reacción a los cambios del medio de cultivo.

**Tasa de crecimiento:** Velocidad de incremento en la concentración celular de microorganismo, tomando en cuenta su fase exponencial.

**Biomasa:** Materia producida provenientes de microorganismos en un medio de cultivo, se puede extraer en seco o líquido.

**Biocombustibles:** combustibles alternativos y renovables, reduciendo su impacto en el medio ambiente.

**Contenido lipídico:** relación de lípidos presentes en biomasa seca de microorganismos.

**Lípidos:** Biomoléculas orgánicas y heterogéneas presentes en tejido vegetal, siendo fuente de energía y transporte de nutrientes.

## ABREVIATURAS

**C:** Grupo control.

**T1:** Grupo experimental 1.

**T2:** Grupo experimental 2.

**R1:** Replica 1.

**R2:** Replica 2.

**R3:** Replica 3.

**10<sup>4</sup>:** Factor de dilución

**Cel:** Células.

**Vol:** Volumen.

**mL:** Mililitro.

**L:** Litro.

**mg:** Miligramo.

**G:** Gramo.

**NPK:** Nitrofoska.

**N:** Nitrógeno.

**F:** Fósforo.

**K:** Potasio.

**TAGs:** Triacilgliceroles.

**SD:** Desviación estándar.

*d:* días.

*d<sup>-1</sup>:* tasa de crecimiento.

*cél/mL:* Células por mililitro.

*gr/L:* Gramos por litro.

*gr/L\*d:* Gramos por litro por día.

*mg/g:* Miligramos por gramos.

## RESUMEN

Las microalgas, han ganado atención en las últimas décadas por su potencial como fuentes sostenibles de lípidos, contribuyendo a la búsqueda de energías limpias y captura de CO<sub>2</sub>. En particular, *Scenedesmus spp*, se destaca por su capacidad para producir biodiesel, tratar aguas residuales y sintetizar lípidos. El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio CIBPA de UPSE en Santa Elena, Ecuador, donde se establecieron nueve unidades experimentales: un grupo de control (NPK 20-19-19), dos grupos de tratamiento: T1 (NPK 30-10-10) y T2 (NPK 10-40-10), cada uno con tres réplicas. Se evaluaron los efectos de estas diferentes proporciones de nutrientes sobre el crecimiento y producción de lípidos en *Scenedesmus spp*, inoculadas a una concentración de  $2,50 \times 10^5$  células/mL. El medio T1, con mayor proporción de nitrógeno, registro una mayor concentración en la fase exponencial ( $1.15 \times 10^6$  células/mL), el medio T2, con mayor fósforo, logró un crecimiento moderado ( $1.06 \times 10^6$  células/mL), ambos superaron al medio de control. La mayor cinética de crecimiento, se registró en el medio NPK 30-10-10, con una tasa de  $0,087 \text{ d}^{-1}$  y menor tiempo de duplicación, además de obtener biomasa  $0,56 \text{ g/L}$  y una productividad de  $0,018 \text{ g/L} \cdot \text{d}$ . El medio NPK 10-40-10 presentó una producción intermedia, registrando un promedio de biomasa  $0,48 \text{ g/L}$  con una productividad  $0,015 \text{ g/L} \cdot \text{d}$ , siendo T1 y T2 superior al medio control. En cuanto a la producción lipídica el medio NPK 10-40-10 presentó la mayor acumulación ( $213 \text{ mg/g}$ ). El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias significativas en la acumulación de lípidos en *Scenedesmus spp*. cultivadas en diferentes medios de NPK ( $> 0.05$ ). En conclusión, se establece que el medio NPK con concentraciones de nitrógeno 10%, fósforo 40% y potasio 10% estimula una mayor producción de lípidos.

**Palabras claves:** Microalgas, *Scenedesmus spp*, tasa de crecimiento, biomasa, Nitrofoska, productividad lipídica.

## ABSTRACT

Microalgae have gained attention in recent decades for their potential as sustainable sources of lipids, contributing to the search for clean energy and CO<sub>2</sub> capture. In particular, *Scenedesmus spp.* stands out for its ability to produce biodiesel, treat wastewater and synthesize lipids. The present study was carried out at the CIBPA laboratory of UPSE in Santa Elena, Ecuador, where nine experimental units were established: a control group (NPK 20-19-19), two treatment groups: T1 (NPK 30-10-10) and T2 (NPK 10-40-10), each with three replicates. The effects of these different nutrient ratios on the growth and lipid production in *Scenedesmus spp.*, inoculated at a concentration of  $2.50 \times 10^5$  cells/mL, were evaluated. The T1 medium, with a higher proportion of nitrogen, recorded a higher concentration in the exponential phase ( $1.15 \times 10^6$  cells/mL), the T2 medium, with higher phosphorus, achieved moderate growth ( $1.06 \times 10^6$  cells/mL), both outperforming the control medium. The highest growth kinetics were recorded in the NPK 30-10-10 medium, with a rate of  $0.087 \text{ d}^{-1}$  and a shorter doubling time, in addition to obtaining biomass 0.56 g/L and a productivity of 0.018 g/L\*d. The NPK 10-40-10 medium presented an intermediate production, recording an average biomass of 0.48 g/L with a productivity of 0.015 g/L\*d, with T1 and T2 being higher than the control medium. Regarding lipid production, the NPK 10-40-10 medium presented the highest accumulation (213 mg/g). Analysis of variance (ANOVA) revealed significant differences in lipid accumulation in *Scenedesmus spp.* grown in different NPK media ( $> 0.05$ ). In conclusion, it is established that the NPK medium with concentrations of 10% nitrogen, 40% phosphorus and 10% potassium stimulates greater lipid production.

**Keywords:** Microalgae, *Scenedesmus spp.*, growth rate, biomass, nitrophoska, lipid productivity.

## INTRODUCCION

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que han despertado un creciente interés en las últimas décadas debido a su potencial como fuentes sostenibles de lípidos (Castillo et al., 2018). La búsqueda de fuentes de energía limpia para el futuro representa uno de los desafíos primordiales en la sociedad actual. Un enfoque prometedor es el uso de microalgas fotosintéticas para capturar CO<sub>2</sub>, estas microalgas contienen alrededor del 50% de carbono en su biomasa (Hakalin & Paz, 2014), este proceso puede llevarse a cabo utilizando tanto luz natural como artificial. Además, la biomasa seca puede transformarse en una amplia gama de productos de gran valor, tales como biocombustibles, aditivos alimentarios y productos destinados a la salud. (Zambrano et al., 2022). Por ende, los biocombustibles se perfilan como actores clave en reducir la dependencia por parte de los combustibles fósiles. *Scenedesmus spp* es una especie de microalgas prometedoras para la producción de biodiesel, tratamiento de aguas residuales y síntesis de lípidos (Flor, 2023).

Las diferentes condiciones de cultivo, composición de los medios, además de una correcta distribución de los nutrientes, afectan las tasas de crecimiento, el rendimiento de biomasa, la productividad y contenido nutricional en las microalgas (Yaakob et al., 2021). Se destacan el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), debido a que desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las microalgas, además de potenciar el medio de cultivo y tener un impacto directo en

la acumulación de lípidos, por ende, una distribución apropiada de estos elementos es esencial para estimular una mayor producción lipídica (Ortiz et al., 2023).

Li, Hu, Gan y Sun en (2010), mostraron que el consumo de nitrógeno y fósforo por parte de las microalgas está vinculado a la concentración en la que estos elementos están disponibles, es decir, la relación N:P. Los hallazgos de su investigación sugieren que *Scenedesmus spp* es capaz de asimilar adecuadamente estos compuestos. Por otro lado, Hena, Fatima y Tabassum (2015), emplearon los efluentes de industrias lácteas como sustrato para cultivar *Scenedesmus spp* y *Chlorella spp*, especies obtenidas de aguas residuales. Logrando alcanzar una productividad máxima de biomasa de 0,21 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, aunque los lípidos representaron menos del 18% del total de biomasa obtenida.

González y Guerrero en (2023), evidencio que la fuente de nitrógeno y fósforo afectó el crecimiento y la producción de lípidos de *Scenedesmus spp*. En particular, se encontró que la fuente de nitrógeno más efectiva para la producción de lípidos fue el nitrato de amonio, resultando en la mayor producción de lípidos. En Ecuador (2022) Mercado describió la composición bioquímica de la biomasa, se registró 272,8 ± 10,4 mg g<sup>-1</sup> de carbohidratos, 307,7 ± 16,8 mg g<sup>-1</sup> de proteínas y 351,0 ± 55,0 mg g<sup>-1</sup> de lípidos. Además, se observó una asimilación del 85% de nitrógeno y más del 96% del fósforo.

El género *Scenedesmus* registra un potencial en la producción de lípidos y TAGs, no obstante, en comparación con otras microalgas utilizadas en laboratorios ecuatorianos, su aplicación práctica se encuentra limitada por un escaso interés y falta de investigación enfocadas principalmente en su optimización lipídica, representando esta problemática un impedimento para su producción.

*Scenedesmus spp* se ha convertido en un objeto de investigación debido a su capacidad para producir lípidos en diferentes medios de cultivo, llegando a obtener porcentajes significativos en cuanto a su biomasa en peso seco o húmeda. Además, representan una alternativa para el medio ambiente, tomando en cuenta los métodos convencionales de obtención de aceites vegetales y producción lipídica, las microalgas pueden llegar a obtener porcentajes de acumulación que oscilan entre el 16% y el 40% (Andrade et al., 2009).

Las condiciones óptimas de temperatura para este género oscilan entre 20°C a 25°C, llevando un ciclo de iluminación (12 horas), con oxigenación constante. Se llevo a cabo un diseño experimental, considerando tres réplicas para los diferentes medios de cultivo: control NPK 20-19-19, experimental T1 NPK 30-10-10 y experimental T2 NPK 10-40-10, mostrando diferentes niveles de nitrógeno, fósforo y potasio requeridos para la estimulación de lípidos producidos. Posteriormente el método Bligh & Dyer adaptado para microalgas fue empleado para la extracción de lípidos. Para respaldar los resultados, se realizaron análisis estadístico para la curva

de crecimiento, variables biocinéticas, productividad de biomasa, además de la implementación de ANOVA multifactorial para medir el efecto de las diferentes concentraciones de NPK en la producción lipídica.

El objetivo de este estudio es investigar y comparar la producción de lípidos en *Scenedesmus spp* bajo dos diferentes medios de cultivos de NPK.

## PROBLEMÁTICA

Aunque *Scenedesmus spp* tiene potencial en la producción lipídica, existe poco interés en su aplicación e investigación, debido a que las microalgas comúnmente utilizadas en laboratorios en Ecuador son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Spirulina*, *Nannochloropsis* e *Isochrysis*. Cabe destacar que la producción de lípidos en microalgas es un proceso que presenta diferentes desafíos, entre ellos relacionados con la disponibilidad y concentración de nutrientes en los diferentes medios de cultivo. La limitación o aumento de nitrógeno, fósforo y potasio presenta efectos en relación al crecimiento celular y posteriormente la acumulación de lípidos.

La falta de estudios realizados en *Scenedesmus spp* genera adversidades para su desarrollo y aplicación, específicamente en territorio ecuatoriano existe poca investigación, registrando un estudio centrado en la producción lipídica, limitando las estrategias, implementaciones y protocolos viables para la estimulación de lípidos en microalgas. Determinada situación restringe la comprensión y aplicación de *Scenedesmus spp* en áreas como la producción de biocombustibles, síntesis de compuestos y producción lipídica.

En el marco actual, los lípidos son implementados frecuentemente en las industrias alimentaria y acuícolas, resaltando la importancia de encontrar

alternativas que sean sostenibles y amigables al medio ambiente, debido a que la producción tradicional de aceites conlleva la explotación de recursos naturales, extracción de petróleo y deforestación, suponiendo un impacto negativo en el ecosistema. A pesar de aquello, la demanda sigue creciendo a medida que pasa el tiempo, en consecuencia, es vital desarrollar formas de maximizar y estimular la producción de lípidos a partir de la biomasa obtenida en microalgas.

## JUSTIFICACION

Con el transcurso del tiempo, las microalgas han ido ganando interés en la comunidad científica e industrial, como resultando de su adaptabilidad en diferentes medios de cultivos y capacidad de producir una amplia variedad de lípidos. Tomando en cuenta la demanda de estos compuestos, el potencial de especies como *Scenedesmus spp* para acumular lípidos lo convierte un recurso de gran valor, brindando una solución alternativa para tratar los diferentes desafíos globales en campos relacionados, la producción de energía renovable, estimulación de lípidos y la acuicultura.

En diferentes partes del mundo, el género *Scenedesmus* es objeto de investigación, destacando por su productividad lipídica, siendo esta de interés industrial como nutricional. Esta capacidad de acumulación lipídica puede alcanzar hasta un 16% en relación al peso seco de la biomasa, convirtiéndose en una alternativa para la producción de biodiesel y productos derivados de lípidos, siendo más amigable para el medio ambiente en comparación con métodos convencionales de producción y extracción de TAGs.

En consecuencia, para estimular la producción de lípidos en microalgas y superar un factor limitante como la disponibilidad de nutrientes, se debe aplicar métodos que promuevan una mayor productividad lipídica, centrándose en

diferentes niveles NPK presentes en el medio de cultivo. De manera particular, la presencia adecuada de nitrógeno, fósforo y potasio en el medio de cultivo ejercen un impacto en el crecimiento celular, reproducción, fortalecimiento de membranas celulares, enzimas, equilibrio osmótico, factores determinantes para la acumulación y síntesis de lípidos en las células de *Scenedesmus*.

Al estudiar la relación entre disponibilidad de nutrientes nitrógeno, fósforo, potasio y como afecta la producción lipídica en *Scenedesmus spp*, se pueden desarrollar estrategias para la estimulación mejorando la producción, utilizando medios de cultivos no tradicionales, a base de Nitrofoska.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar diferentes concentraciones de Nitrógeno, fósforo y Potasio en dos cultivos controlados de microalga *Scenedesmus spp*, como estimulante para la producción de lípidos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar diferentes niveles de Nitrógeno, fósforo y potasio mediante dos medios de cultivos controlados.
- Analizar la cinética de crecimiento de *Scenedesmus spp* empleando los diferentes niveles de Nitrógeno, fósforo y potasio para conocer su concentración celular.
- Cuantificar la producción de lípidos en los dos medios de cultivo por medio de extracción.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis nula**

**HO:** La productividad de lípidos en la microalga *Scenedesmus spp*, no muestra diferencias significativas entre los medios de cultivo con distintas proporciones de nutrientes NPK.

### **Hipótesis alternativa**

**H1:** La productividad de lípidos en la microalga *Scenedesmus spp*, muestra diferencias significativas entre los medios de cultivo con distintas proporciones de nutrientes NPK.

## **MARCO TEORICO**

### **Las microalgas**

Organismos microscópicos que habitan principalmente en ambientes acuáticos (Agua dulce y salada), se destacan por participación directa en el ciclo de oxígeno vital para los demás seres vivos, además son productores primarios, convierten la luz solar en energía y el dióxido de carbono en compuestos orgánicos, de esta manera forman la base en la cadena alimentaria acuática. (Otero et al., 2020). Estos organismos son increíblemente diversos, cuentan con más de 300.000 especies, sin embargo, hasta la actualidad se han identificado y estudiado alrededor de 50.000. Se clasifican en diversos grupos, tomando en cuenta su función y características, entre ellas su pigmentación, composición de la pared celular y maquinaria fotosintéticas (Irwin & Finkel, 2018). Los principales grupos de microalgas, la conforman clorofitas (algas verdes) y Bacillariophytas (diatomea).

### **Importancia de las microalgas**

Con el aumento de la población mundial y demanda de energía, la búsqueda de recursos energéticos renovables se ha vuelto crítica. Las microalgas se han reconocido como una fuente potencial de alimento para el ganado, productos farmacéuticos, combustibles alternativos, tienen la capacidad para proporcionar una gran cantidad de productos con valor agregado y, recientemente, el interés se ha centrado en los lípidos y sus derivados (Banerjee et al., 2018).

**Tabla 1.**

*Tipos de algas, su almacenamiento de energía y sus hábitats.*

<b>Algas</b>	<b>Especies conocidas</b>	<b>Material almacenado</b>	<b>Hábitats</b>
Diatomeas (Bacillariophyceae)	100,000	Crisolaminarina (polímeros de carbohidratos) y TAGs	Océanos, agua dulce y salobres
Algas verdes (Chlorophyceae)	8,000	Almidón y TAGs	Agua dulce
Algas verde-azul (Cyanophyceae)	2,000	Almidón y TAGs	Diferentes hábitats
Algas doradas (Chrysophyceae)	1,000	TAGs y carbohidratos	Agua dulce

*Nota.* Obtenido por Khan *et al.*, (2009).

Las microalgas constan de diverso material almacenado, entre ellos sustancias de reserva, la tabla 1 muestra varios tipos de microalgas y sus respectivos productos, por ejemplo, las diatomeas, se localizan en océanos, agua dulce y salada, se caracterizan por almacenar crisolaminarina y TAGs. Las algas verdes (8000 especies) y verde-azul (2000 especies) guardan almidón y TAGs, el primer grupo se encuentran en agua dulce mientras que el segundo grupo habitan en distintos lugares. Por último, las algas doradas con 1000 especie conocidas, almacenan TAGs y carbohidratos, encontrándose en agua dulce. Otro producto son los carotenoides, responsables de la captación de luz en el metabolismo fotosintético. La energía absorbida puede transferirse a las clorofilas mediante un carotenoide primario como la luteína, ampliando así el espectro de absorción de luz de las

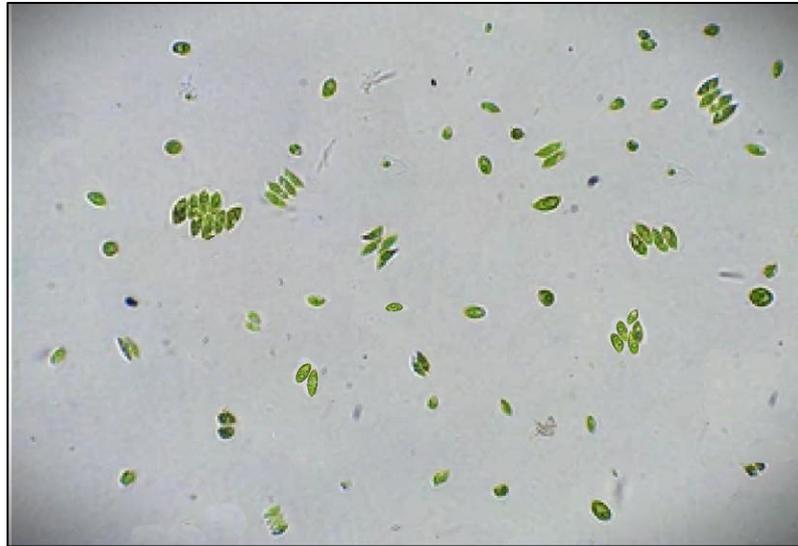
microalgas. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, los carotenoides desempeñan un papel importante en el alivio de ciertos cánceres, el envejecimiento prematuro, las enfermedades cardiovasculares y la artritis (Sun et al., 2018). Los carotenoides también se utilizan a menudo como colorantes y tintes debido a su color intrínseco. Entre los carotenoides de microalgas más conocidos, el  $\beta$ -caroteno, la astaxantina y la luteína tienen el mayor potencial de mercado actual.

### **Características del género *Scenedesmus***

El género *Scenedesmus* se caracteriza por formar colonias con un número reducido de células, generalmente entre 2 y 4, aunque en algunos casos pueden llegar a tener hasta 8, 16 o incluso 32 células, y poco común se pueden encontrar formas unicelulares (figura 1). Las células que componen estas colonias suelen tener una forma cilíndrica, aunque también se pueden encontrar formas semilunares, ovoideas o fusiformes. (Akgül, Tüney Kızılkaya, Akgül, & Erduğan, 2017).

Estas algas habitan en cuerpos de agua eutróficos, lo que incluye lagos, estanques y ríos, en dichos entornos logran proliferar debido a la disponibilidad de nutrientes. Cabe destacar que se reproducen principalmente por fisión binaria, es decir, una célula madre se divide para formar nuevas células hijas, dicho proceso toma lugar dentro de la pared celular de la célula madre, dando paso a una estructura

conocida como cenobio, siendo dependientes de condiciones nutricionales, intensidad de luz y temperatura constante (Trainor, 2006).



**Figura 1.**

*Representa la cepa Scenedesmus spp. Obtenida del microscopio óptico (10x).*

### **Medios de cultivo utilizados para microalgas**

Tomando en cuenta la capacidad autotrófica de las microalgas, estas pueden crecer y desarrollarse en medios líquidos simples, compuestos por agua, sales inorgánicas básicas e iluminación. Sin embargo, en casos determinados se requiere añadir elementos traza, y factores de crecimiento orgánicos, como el acetato o nutrientes, de esta manera se estandariza un desarrollo óptimo para la especie, por ende, la elección del medio es dependiente de las condiciones y propósito del cultivo.

## Medio Guillard F/2

- Este medio se compone de una mezcla de nutrientes y sales que se disuelven en agua destilada (Tabla 2). Macronutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio. Micronutrientes: hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno. Vitaminas: tiamina, biotina y vitamina B12 (Vélez, 2016).

**Tabla 2.**

*Nutrientes y Concentraciones del Medio Guillard F/2.*

<b>MEDIO GUILLARD F/2</b>			
<b>Solución 1</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>Solución 2</b>	<b>(g/100 mL)</b>
Nitrato de sodio	7,5 g	Metasilicato de sodio nonahidratado	3 g
Fosfato monobásico de sodio monohidratado	0,5 g		
<b>Solución 3</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>Solución 4 vitaminas</b>	<b>(g/100 mL)</b>
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	0,32 g	Cianocobalamina (B12)	0,5 g
EDTA disódico	0,44 g	Tiamina HCL (B1)	0,1 g
<b>Metales traza</b>	<b>0,10 mL</b>	Biotina (vit. H)	1 g
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0,49 g		
Sulfato de zinc heptahidratado	1,1 g		
Cloruro de zinc	0,53 g		
Cloruro de cobalto (III) hexahidratado	0,5 g		
Cloruro de manganeso (III) tetrahidratado	9 g		
Molibdato de sodio dihidratado	0,32 g		

### Medio Conway

- Suministra los nutrientes esenciales y necesarios para los procesos metabólicos que favorecen el crecimiento óptimo de las microalgas. Entre los macronutrientes se incluyen el nitrato de potasio y el fosfato de sodio, mientras que en los micronutrientes se encuentran varios compuestos, EDTA, zinc, manganeso, cobre etc. (Tabla 3). Además, contiene vitaminas como tiamina, biotina y cianocobalamina, así como silicato, fundamental para la estructura de la frústula.

**Tabla 3.**

*Nutrientes y Concentraciones del Medio Conway.*

<b>MEDIO CONWAY</b>			
<b>Solución 1</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>Solución 2</b>	<b>(g/100 mL)</b>
EDTA-disódico	4,5 g	Cloruro de zinc	0,21 g
Ácido bórico	3,36 g	Cloruro de cobalto (II) hexahidratado	0,2 g
Nitrato de sodio	10 g	Molibdato de amonio tetrahidratado	0,09g
Fosfato disódico	2 g	Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0,2 g
Cloruro de manganeso (II) Tetrahidratado	0,36 g		
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	0,13 g		
Nitrato de potasio	11,6 g		
<b>Solución 3</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>Solución 4</b>	<b>(g/100 mL)</b>
Metasilicato de sodio nonahidratado	2 g	Tiamina	0,2 g
		Cianocobalamina	0,02 g
		Biotina h	0,02g

## **Medio BG-11**

- Este medio posee un bajo contenido de nitrógeno, lo que reduce la contaminación por bacterias. Además, contiene micronutrientes esenciales como hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno, necesarios para el crecimiento y desarrollo de las microalgas (Touloupakis, 2023).

En particular, cepas del género *Scenedesmus* han sido cultivadas con éxito en varios medios sintéticos en el laboratorio, incluyendo BG11, Bold's Basal, N-11, N-9 y TAP. Además, se han realizado estudios sobre la adaptación de esta especie en agua residual sintética, se ha investigado su potencial para remover nutrientes como nitrógeno y fósforo en aguas residuales domésticas e industriales (Park et al., 2010).

## **Nitrofoska foliar (NPK)**

Denominado como un fertilizante foliar, especialmente utilizado en la agricultura, no produce residuos y se disuelve rápidamente en el agua. Además, en algunas ocasiones se distingue por tener un código de colores para facilitar su reconocimiento.

Está compuesta por una mezcla única de nutrientes, principalmente de Nitrógeno (N), fósforo (F) y Potasio (K), generalmente también suele ser elaborada con sulfato de potasio, magnesio y microelementos, convirtiéndola en un material

adecuado para fertilizar una amplia variedad de cultivos (Agroalsa, 2021). Su bajo contenido de cloro asegura un crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, sin efectos adversos.

### **Medio de cultivo basado en Nitrofoska (NPK)**

En comparación con las plantas terrestres, las microalgas se caracterizan por su capacidad para crecer y desarrollarse a un ritmo acelerado, lo que les permite producir cantidades significativas de biomasa en un período de tiempo relativamente corto. Además, estos microorganismos ofrecen una mayor frecuencia de cosecha y una tasa de fijación de carbono más alta, siendo ideales para una variedad de aplicaciones, destacando la producción de biomasa y disminución de gases pertenecientes al efecto invernadero (Shahid et al., 2020). Para aprovechar el potencial económico de las microalgas, es fundamental su producción a gran escala y en menor tiempo, esto permite la extracción de valiosos compuestos como lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos, que pueden ser comercializados en diversas industrias alimenticias, entre ellas la producción creciente de camarón (Sanchez, 2022).

Los medios de cultivos enriquecidos con fertilizantes Nitrofoska, contienen una mezcla de nutrientes primarios (Nitrógeno, fósforo y potasio). Estudios han mostrado que los fertilizantes foliares pueden ser utilizados como una alternativa viable a los medios nutritivos preparados a partir de reactivos químicos

convencionales, como el BG11 y F/2. Según la cinética de crecimiento, un cultivo celular presenta diferentes tiempos de duración acorde al medio de cultivo empleado, especialmente la fase de crecimiento exponencial se llega a expandir de 12 a 20 días en los medios Nitrofoska, mostrando mayor longevidad en comparación con medios tradicionales, en donde esta fase acaba entre los 6 a 10 días, además en medio Guillard F2, la fase de retardo puede extenderse hasta los 22 días (Brito et al., 2013).

Según Aponte (2019) para el género *Scenedesmus*, se ha identificado una mejor cinética al emplear Nitrofoska verde en el medio de cultivo, llegando a obtener producciones de biomasa con cantidades como 0,56 g/L (N1), 0,83 g/L (N2) y 0,447 g/L (N3), superiores a las obtenidas por los métodos tradicionales, además de implementar bicarbonato de sodio, evidenciando la buena adaptación de las microalgas en medios de cultivo con Nitrofoska, sin requerir una fuente de carbono adicional. Al ser un método no tradicional, se destaca la importancia de una dosificación controlada y monitoreo adecuados, evitando una sobre fertilización y contaminación del medio ambiente.

### **Nitrofoska (20-19-19)**

NPK 20-19-19 es un fertilizante foliar, su principal característica es tener contener cantidades similares de nutrientes, 20% de nitrógeno, 19% de fósforo y 19% de potasio, debido a su fórmula equilibrada favorece el desarrollo integral (tabla 4).

**Tabla 4.***Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 20-19-19.*

<b>Medio Nitrofoska 20-19-19</b>			
<i>Macronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>		<i>Proporción</i>	
Nitrógeno		200 g/kg	
Fósforo		190 g/kg	
Potasio		190 g/kg	
<i>Micronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>	<i>Proporción</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Proporción</i>
Magnesio	0,5 g/kg	Hierro *	0,10 g/kg
SO <sub>3</sub>	2,0 g/kg	Magnesio	0,10 g/kg
Boro	0,01 g/kg	Zinc *	0,04 g/kg

(\*) Quelatizados con EDTA

**Nitrofoska (30-10-10)**

Nitrofoska (30-10-10) es un producto fertilizante, utilizados especialmente para suelos y cultivos, que requieran altas necesidades de nitrógeno y menores necesidades de potasio y fosfato (tabla 5).

**Tabla 5.***Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 30-10-10.*

<b>Medio Nitrofoska 30-10-10</b>			
<i>Macronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>		<i>Proporción</i>	
Nitrógeno		300 g/kg	
Fósforo		100 g/kg	
Potasio		100 g/kg	
<i>Micronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>	<i>Proporción</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Proporción</i>
Magnesio	6 g/kg	Boro	0,11 g/kg
Hierro *	0,5 g/kg	Cobre *	0,19 g/kg
Cinc *	0,19 g/kg	Molibdeno	0,01 g/kg

(\*) Quelatizados con EDTA

### Nitrofoska (10-40-10)

Fertilizante rico en fósforo (40%) que promueve desarrollo radicular profundo, floración y fructificación intensa. Contiene 10% de nitrógeno para crecimiento vegetativo y 10% de potasio para resistencia a enfermedades (tabla 6).

**Tabla 6.**

*Nutrientes y Concentraciones del medio Nitrofoska 10-40-10.*

<b>Medio Nitrofoska 30-10-10</b>			
<i>Macronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>		<i>Proporción</i>	
Nitrógeno		100 g/kg	
Fósforo		400 g/kg	
Potasio		100 g/kg	
<i>Micronutrientes</i>			
<i>Compuesto</i>		<i>Proporción</i>	
Azufre	7 g/kg	Boro	0,02 g/kg
Hierro *	0,01 g/kg	Cobre *	0,01 g/kg
Zinc *	0,02 g/kg	Molibdeno	0,005 g/kg
Manganeso *	0,01 g/kg		

### Producción lipídica en microalgas

Se ha informado que las microalgas pueden aportar alrededor del 40% del oxígeno atmosférico y, posteriormente, utilizar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), nitrógeno y fosfato para crecer de forma autótrofa. Esta capacidad hace que las microalgas sean atractivas para la mitigación del CO<sub>2</sub> y la reducción de la contaminación ambiental (Joun et al., 2021).

Además, el biocombustible de microalgas tiene una ventaja sobre la materia prima de petróleo debido a su mayor contenido de oxígeno (10-12%) en comparación con el combustible de petróleo (4%), Un mayor contenido de oxígeno ayuda a acelerar el proceso de combustión. Se ha estimado que alrededor del 16% de las necesidades mundiales de combustible para el transporte se cubrirán con biocombustibles en 2040 (Udayan et al., 2021). Algunas de las especies de microalgas más cultivadas son *Chlorella spp*, *Dunaliella spp* y *Isochrysis spp*, las cuales tienen niveles de aceites que varían entre el 1-85% de su peso seco (May Cua, 2015).

**Tabla 7.**

*Especies de microalgas y sus contenidos lipídicos.*

<b>Especie de microalga</b>	<b>Contenido lipídico (% peso seco de biomasa)</b>	<b>Productividad lipídica (<math>mg L^{-1}d^{-1}</math>)</b>
<i>Botryococcus spp.</i>	25.0-75.0	-
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8
<i>Chlorella calcitrans</i>	14.6-16.4/39.8	17.6
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3 - 50.0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2 - 40.0
<i>Chlorella spp.</i>	10.0-48.0	42.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	-
<i>Chlorella spp.</i>	18.0-57.0	18.7
<i>Chlorococcum spp.</i>	19.3	53.7
<i>Ellipsoidion spp.</i>	27.4	47.3

Las microalgas tienen una eficiencia un 10% superior en la conversión de la luz (en comparación con las plantas superiores) para la síntesis de almidón, aceites y azúcares que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles; en comparación con el 1-2% que se puede obtener del maíz para la producción de bioetanol. Además, presentan una mejor asimilación del CO<sub>2</sub>, agua y otros nutrientes, lo que les permite producir 30 veces más aceite por unidad de área en comparación con las semillas oleaginosas (Parakh et al, 2023).

La tabla 7, muestra el contenido lipídico (se expresa como un porcentaje del peso seco) y la productividad de diferentes especies de microalgas (se expresa en miligramos por litro por día). El contenido lipídico de las especies de microalgas puede variar significativamente, desde un 2.0% hasta un 75.0%, en el mismo lineamiento, la productividad de las especies de microalgas demuestra una varianza significativa, desde 10.3 mg L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> hasta 1214 mg\*L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Los estudios sugieren que *Chlorella protothecoides* es la especie de microalgas más productiva, con un contenido lipídico del 14.6-57.8% y una productividad de 1214 mg\*L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Por ende, el uso de las microalgas promete un ámbito ideal para la producción y productividad lipídica.

## **Factores clave para el desarrollo y producción de lípidos en microalgas**

### **Nitrógeno (N)**

El nitrógeno es un componente crítico de las proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, que son esenciales para la estructura y la función celular, un suministro adecuado de nitrógeno promueve un crecimiento celular saludable y una mayor biomasa (Leon, 2020). En años recientes, estudios demostraron que las especies de microalgas crecieron mejor en medios de cultivo con nitrógeno en comparación con aquellos que tuvieron ausente este compuesto. Las especies *Ankistrodesmus spp.*, *A. nannosele* y *Scenedesmus spp.* se adaptaron bien a las condiciones de cultivo, alcanzando densidades más altas (Cobos et al., 2015).

Este nutriente representa un elemento importante para estimular el material lipídico presente en microalgas, normalmente, debido a que cuando el nitrógeno se vuelve limitante para el crecimiento, la acumulación de lípidos puede aumentar o disminuir. Sin embargo, utilizar la restricción de nitrógeno representa disminuir la concentración celular, en decir, que un alto contenido de lípidos y una alta productividad pueden ser mutuamente excluyentes (Hernández & Labbé, 2014).

### **Fósforo (P)**

Componente esencial de los ácidos nucleicos, las membranas celulares y el ATP (adenosín trifosfato) molécula que almacena y transporta energía en las células. La disponibilidad de fósforo afecta la síntesis de lípidos y la acumulación

de reservas de energía, lo que es fundamental para la producción de lípidos en microalgas (Aguilar, 2014). La cantidad de fósforo presente en las microalgas suele ser menor al 1%, no obstante, la escasez de este nutriente en los diferentes medios de cultivos, puede convertirse en una limitante, por lo tanto, para suplir esta deficiencia se suele incorporar en forma de  $\text{HPO}_4^-$  (Martínez, 2008).

Aunque las microalgas consuman diferentes cantidades de fósforo su crecimiento de biomasa sigue una tendencia similar, debido a que pueden adaptarse a la limitación de fósforo reduciendo su demanda fisiológica de fósforo hasta en un 50%, lo que influye en una correcta síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Belotti et al., 2013). Por otro lado, algunas microalgas tienen la capacidad de sintetizar y almacenar fósforo en forma de polifosfatos como reserva de energía, que se puede utilizar posteriormente en caso de limitación de nutrientes en el medio de cultivo. Por lo tanto, una deficiencia de fósforo no necesariamente se considera en una diferencia significativa que afecte la concentración final de biomasa (Gómez et al., 2023).

### **Potasio (K)**

El fósforo es un compuesto esencial en el desarrollo de las algas, la producción de lípidos, el rendimiento de ácidos grasos y varios procesos metabólicos, entre ellos la transferencia de energía, señalización celular y fotosíntesis. Este nutriente, que constituye cerca del 1% de la biomasa total de las

algas, es necesario en una proporción de aproximadamente 0,03-0,06% en el medio para sostener su crecimiento (Ota et al., 2016). Es fundamental para las células de microalgas en la producción de componentes celulares como fosfolípidos, ADN, ARN y ATP, siendo estas indispensable para las rutas metabólicas que implican la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos, cabe recalcar que las microalgas absorben fósforo en forma de polifosfato u ortofosfato, lo que favorece su crecimiento y mejora su contenido nutricional (Atiku et al., 2016).

Por otro lado, el potasio es un catión importante para el equilibrio iónico y la presión osmótica en las células. También está involucrado en la regulación de enzimas y procesos metabólicos. Un nivel adecuado de potasio en el medio de cultivo es necesario para mantener la homeostasis celular y promover un crecimiento saludable de las microalgas (Rojo, 2018). Aunque las microalgas no necesitan grandes cantidades de potasio para crecer, la disponibilidad de este elemento puede ser un factor limitante del crecimiento en entornos naturales y la disponibilidad lipídica, especialmente en áreas con bajas densidades de células algales, por lo tanto, este nutriente es crucial para las características fotosintéticas - fisiológicas de las microalgas, y la limitación de fósforo puede reducir la biosíntesis de clorofila y la tasa fotosintética (Kumari et al., 2021).

## **Parámetros que influyen en el crecimiento microalgal.**

### **Luminosidad**

Las microalgas captan energía luminosa para oxidar el agua, generando electrones que pueden seguir diferentes rutas. Este proceso debe estar cuidadosamente regulado, ya que, de lo contrario, puede dañar las células, provocando fotoinhibición y estrés oxidativo (Packer et al., 2011). Las microalgas fototrópicas absorben la luz solar y el CO<sub>2</sub> para producir materia orgánica, al igual que las plantas. La luz es la fuente de energía que impulsa esta reacción, y su intensidad, calidad espectral y fotoperíodo son fundamentales. La producción artificial debe tratar de replicar y mejorar estas condiciones naturales. En sistemas de producción, se emplea iluminación artificial utilizando lámparas fluorescentes, lo que permite una producción continua con una entrada de energía significativamente mayor. La intensidad de la luz juega un papel importante, pero los requisitos varían según la profundidad del cultivo y la densidad celular; a mayores profundidades y concentración celular, la intensidad de la luz debe aumentarse para que alcance a ser penetrada a través del cultivo (Chen et al., 2011). Altas intensidades de luz pueden causar fotoinhibición, además del recalentamiento del cultivo debido a demasiada iluminación natural y artificial. La duración de la luz artificial debe ser como mínimo 12 horas de luz por día, a pesar de que los cultivos se desarrollan normalmente bajo iluminación constante.

### **pH**

El pH del medio de cultivo afecta la solubilidad tanto del CO<sub>2</sub> como de los nutrientes, además de influir en las formas inorgánicas del carbono, lo que repercute

directamente en el metabolismo de las especies, en la mayoría de microalgas, el pH óptimo se encuentra entre 7 y 9, siendo el intervalo ideal de 8,2 a 8,7 (Yu et al., 2022). Si el pH no se mantiene dentro de los límites adecuados, el cultivo puede colapsar por completo. Para evitar esto, es necesario airear o agitar el cultivo. En situaciones de alta densidad celular, la adición de CO<sub>2</sub> puede corregir los aumentos de pH, teniendo como valor límite un pH de 9 durante el desarrollo de la especie en cultivo.

### **Agitación**

El desarrollo microalgal se ve significativamente favorecida por la aireación, evitando la sedimentación de las microalgas, garantizando que todas las células estén expuestas a la luz y a los nutrientes, de esta manera se promueve un correcto intercambio de gases, este último contiene la fuente de carbono necesaria para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono (0,03% de CO<sub>2</sub>). Además, el CO<sub>2</sub> ayuda a amortiguar el cultivo contra cambios de pH resultantes del equilibrio CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, por aquello una tasa de aireación moderada de 3vvm ha demostrado tener un impacto positivo en la cinética de crecimiento (Rey, 2021). El método de agitación depende de la escala del cultivo, que va desde la mezcla manual hasta la aireación a través de blowers o el uso de ruedas de paletas (estanques), sin embargo, es importante tener en cuenta que no todas las especies de microalgas pueden tolerar una agitación vigorosa (Maldonado, 2011).

## **Temperatura**

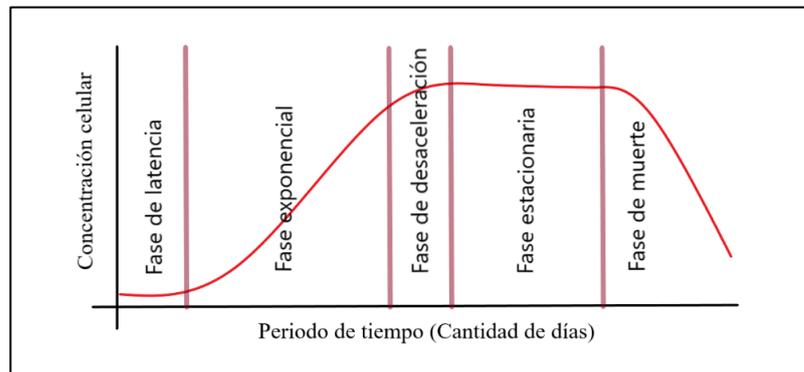
La temperatura ideal para el cultivo de microalgas suele estar entre 20 y 30 °C, aunque puede variar según la composición del medio de cultivo y las especies que se estén cultivando. Las especies más comúnmente cultivadas pueden tolerar temperaturas que oscilan entre 16 y 30 °C. No obstante, cuando las temperaturas caen por debajo de 16 °C, el crecimiento se ve ralentizado, mientras que temperaturas superiores a 35 °C pueden resultar letales para algunas especies, lo que puede llegar a causar estrés. En caso de ser necesario, se puede enfriar el cultivo de microalgas utilizando un flujo de agua fría sobre su superficie o controlando la temperatura del aire mediante unidades de aire acondicionado. Específicamente para una mejora en el crecimiento de las microalgas y productividad de biomasa en *Chlorella* y *Scenedesmus spp*, se sugiere mantener una temperatura de cultivo de 29–32 °C (Kalinina et al., 2023).

## **Salinidad**

Las especies pertenecientes al género *Scenedesmus* realizan procesos fisiológicos y moleculares, permitiendo adaptarse a cambios moderados en la concentración salina, lo que influye en la composición de la biomasa algal modificando la composición bioquímica. Por consiguiente, una baja salinidad en el medio de cultivo contribuye a una mayor acumulación de biomasa, por el contrario, un aumento en la concentración a un rango de 0,4 M puede inhibir el crecimiento, reduciendo la cantidad de pigmentos fotosintéticos (Elloumi et al., 2020).

## Cinética de crecimiento

Un cultivo estático de microalgas se caracteriza por constar de cinco fases (Maldonado, 2009), en donde se refleja el desarrollo de las microalgas (Figura 2).



**Figura 2.**

*Cinética de crecimiento a través de un periodo de tiempo.*

### Fase de adaptación o latencia

El cultivo presenta un leve incremento en su densidad celular, debido al aumento de niveles enzimáticos necesarios para la división celular y fijación de carbono evidente en los primeros días, sin embargo, cuando los cultivos son inoculados provenientes de una fase exponencial, se reduce considerablemente el tiempo requerido en esta fase de adaptación (García et al., 2017). Particularmente si las células del inóculo no están en óptimas condiciones metabólicas, esto representa un retraso en la adaptación del cultivo. Además, cabe recalcar que las transferencias de medios sólidos agar a cultivos líquidos, tiene como consecuencia, prolongar la fase de adaptación aún más en función del tiempo.

### **Fase exponencial**

En esta etapa, se incrementa notoriamente la velocidad de crecimiento, llegando a alcanzar su valor máximo en concentración celular, manteniéndose de manera constante y reduciendo la presencia de factores limitantes. Se sigue una función logarítmica, para calcular la tasa de crecimiento tomando en cuenta la concentración celular y el tiempo requerido (Vega & Voltolina, 2007).

$$C_t = C_0 * e^{\mu t}$$

Donde  $C_t$  y  $C_0$  representan la concentración celular en los tiempos  $t$  y  $0$ , respectivamente, y  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico. Esta tasa depende principalmente de factores como la especie, la intensidad lumínica y la temperatura. Con el objetivo de usar estas células como inóculos para otros cultivos, es recomendable cosecharlas durante su crecimiento exponencial, ya que se dividen rápidamente en comparación con las células tomadas de otras fases, destacando los cultivos que se encuentran en la tasa de crecimiento general más viable.

### **Fase de desaceleración**

Se comienza a detectar una disminución notoria en la disponibilidad de factores que promueven el crecimiento como los nutrientes, luz, pH, carbono u otros elementos físicos químicos, generando condiciones adversas para el cultivo. Por otro lado, la concentración celular alcanza su valor máximo tomando en cuenta el número de células presente, pero la tasa de división celular y crecimiento disminuye (Maldonado, 2011).

### **Fase estacionaria**

Las condiciones del cultivo se vuelve un factor limitante, en consecuencia, las tasas de natalidad y mortalidad se igualan, además, la concentración celular y su composición, no presentan cambios significativos en el cultivo. Dicho comportamiento es característico de una baja concentración en los nutrientes, excesiva concentración de oxígeno y alteraciones en el pH, disminuyendo la disponibilidad del sustrato fotosintético, impidiendo la penetración de luz, siendo esta última fundamental para los procesos fisiológicos (García et al, 2017).

### **Fase de muerte**

La calidad del agua y nutrientes se deteriora, impidiendo sostener el crecimiento, como consecuencia la mortalidad es mayor a la natalidad, evidenciando una disminución en la concentración celular, finalmente el cultivo llega a colapsar, permitiendo la presencia de bacterias y hongos en el medio de cultivo (Barrado, 2016). Adicionalmente, la muerte de los cultivos también está relacionada con la falta de oxígeno, sobrecalentamiento, el desequilibrio del pH o la contaminación.

## MARCO METODOLÓGICO

### Tipo de investigación

La presente investigación se llevó a cabo utilizando un método experimental con enfoques tanto cualitativos como cuantitativos, el estudio implicó la recopilación de datos numéricos sobre diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio en el medio de cultivo y la producción de lípidos en microalga *Scenedesmus spp.* El experimento se realizó en frascos de 2 litros, con un medio de cultivo control y dos experimentales. Se controlaron los parámetros físicos y químicos durante la cinética de crecimiento, cosecha de biomasa y posterior extracción lipídica.

### Área de estudio

Se llevo a cabo en el laboratorio CIBPA, ubicado dentro de las instalaciones de UPSE, edificio INCYT, provincia de Santa Elena, Ecuador (figura 3).



**Figura 3.**

*Lugar de investigación. Ubicación del laboratorio CIBPA, mapa de la provincia de Santa Elena.*

## **Fase de laboratorio**

### **Cepas de microalga**

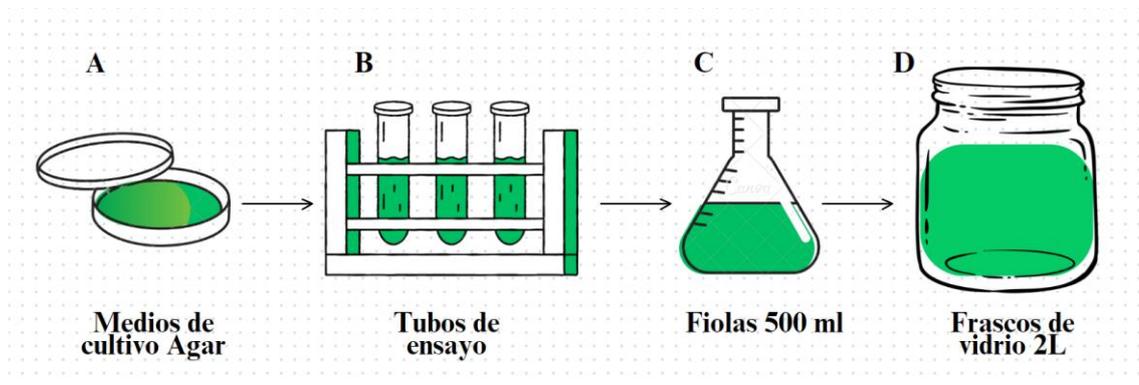
Se maneja la microalga *Scenedesmus spp* con código PMO22, procedente del CIBPA. Esta cepa fue obtenida a partir de muestras recogidas en 2022 como parte del proyecto "BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS AISLADAS DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA COMO UN POTENCIAL RECURSO BIOTECNOLÓGICO", con código CUP: 91870000.0000.384095, y contó con la autorización del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), bajo el permiso DBI-CM-2022-0264.

### **Diseño experimental**

El experimento en su etapa inicial, se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo AGAR, el cual fue sometido a un proceso de esterilización a 121 °C y 15 psi durante 16 minutos. Posteriormente, alcanzando una temperatura de 45 °C, se vertió 25 mL del medio estéril en una placa de Petri, una vez solidificado el agar, con la ayuda de un asa o hisopo se agregó un inóculo de *Scenedesmus spp* esparciéndose de forma uniforme para su incubación [A].

Se prepararon tubos de ensayo estériles de 10 mL con medio de cultivo Guillard F2. Después de 3 días, se seleccionaron colonias de microalgas, verificando su pureza. Las colonias seleccionadas se transfirieron a los tubos, reemplazando el medio de cultivo sólido por uno líquido [B], agitándose

constantemente. Utilizando frascos estériles de 500 mL, se seleccionaron 3 tubos de ensayos que contenían *Scenedesmus spp* en crecimiento óptimo, se inoculo cada frasco con 10 Ml de la suspensión algal [D].

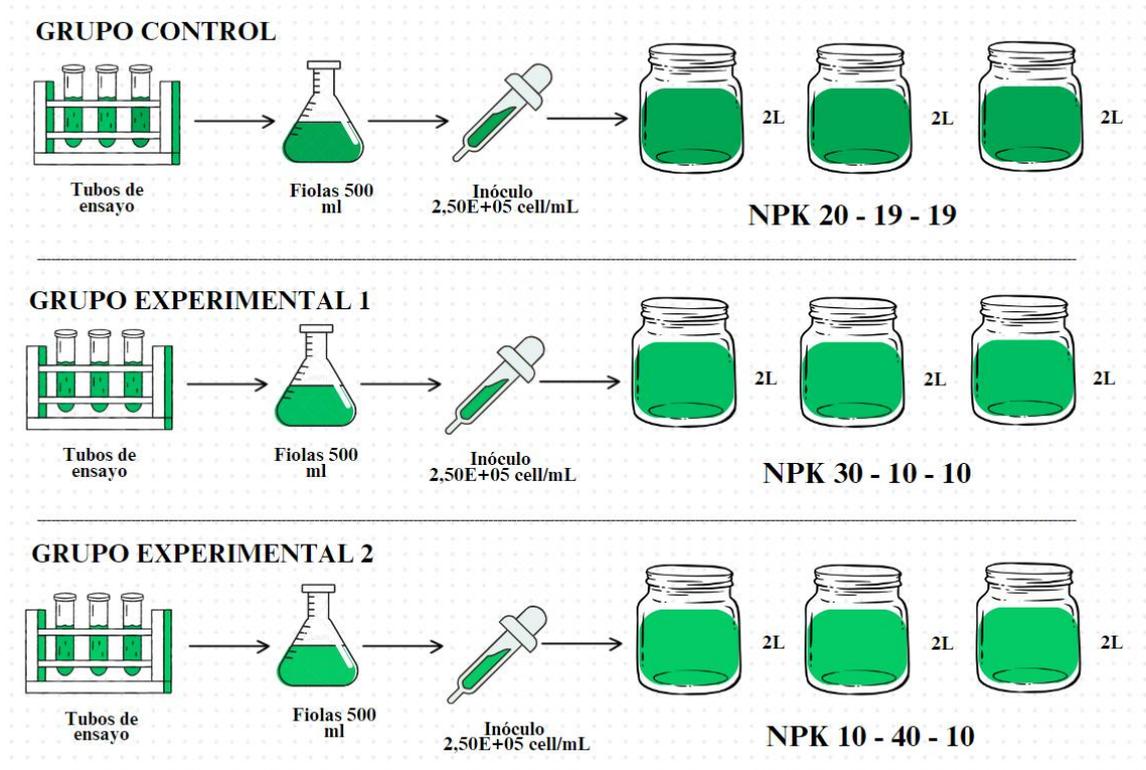


**Figura 4.**

*Diseño experimental. Escalamiento del cultivo Scenedesmus spp.*

Se establecieron nueve unidades experimentales, divididas en un grupo de control y dos grupos de tratamiento, cada uno con tres réplicas (Figura 5) en estos grupos, el medio de cultivo a base del fertilizante Nitrofoska. El grupo de control utilizó el medio estándar NPK 20-19-19, que sirvió como punto de referencia para comparar los resultados de los grupos experimentales. Los tratamientos T1 y T2 consistieron en la aplicación de diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio: NPK 30-10-10 y NPK 10-40-10, respectivamente. De esta forma, se evaluaron los efectos de las distintas proporciones de nutrientes sobre el crecimiento, desarrollo y producción de lípidos en *Scenedesmus spp*. Los frascos

de cultivo fueron inoculados con una concentración de  $2,50 \times 10^5$  células/mL de cepa.



**Figura 5.**

*Diseño experimental. Grupo control y cultivos con diferentes niveles de NPK.*

### Condiciones de cultivo

Para mantener el cultivo en un entorno controlado es esencial que cumpla con condiciones óptimas para su desarrollo. Esto implica mantener una temperatura constante dentro del rango de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , lo que proporciona un clima propicio para el crecimiento de las microalgas (Contreras et al., 2003). Los cultivos a nivel

de laboratorio se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 20 °C, y aireación manual diaria en volúmenes pequeños (200 mL). En cultivos de mayor volumen (1 a 2 L), se utilizó aireación continua. Se garantizó una iluminación constante, que suele lograrse mediante la utilización de luces fluorescentes, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad, a una iluminación de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Este régimen de iluminación es fundamental para promover la fotosíntesis las microalgas (Lopez, 2018).

### **Preparación del medio de cultivo**

Los cultivos experimentales utilizarán distintos niveles de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), que son los nutrientes esenciales para la producción de lípidos, experimentalmente los niveles de NPK será: 30-10-10 y 10-40-10, mientras que el grupo de control se mantendrá con una relación NPK de 20-19-19.

**Tabla 8.**

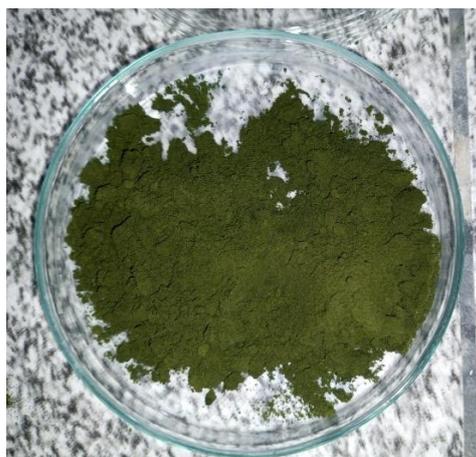
*Composición en porcentajes de NPK en diferentes medios de cultivo. Grupo control, experimental 1 y experimental 2.*

<i>Composición de NPK en medios de cultivo</i>			
<b>Componentes</b>	<b>Grupo Control</b>	<b>Experimental 1</b>	<b>Experimental 2</b>
<b>Nitrógeno (N)</b>	20%	30%	10%
<b>Fósforo (P)</b>	19%	10%	40%
<b>Potasio (K)</b>	19%	10%	10%

En particular, se utiliza dos medios con proporciones de NPK diferentes (tabla 8): N 10% - P 40% - K 10% y N 30% - P 10% - K 10%. Estos números representan las cantidades relativas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) presentes en cada medio, respectivamente (tabla 8). Estos nutrientes se consideran limitantes para el crecimiento y producción lipídica de microalgas, fueron seleccionados por su afinidad (Arias et al., 2013). Un exceso o deficiencia de cualquiera de estos nutrientes puede afectar negativamente el crecimiento celular y la producción lipídica.

### **Recolección de biomasa**

En el proceso de separación de la biomasa de las microalgas durante la fase estacionaria, se llevará a cabo la transferencia de la biomasa a tubos Falcon. Para eliminar el exceso de agua presente en la muestra, se empleará una centrifugadora Hermel Z366 a una velocidad de 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante un período de 5 minutos. Posteriormente, la muestra será sometida a un proceso de secado en una estufa a una temperatura constante de 37°C a lo largo de un período de 24 horas (Figura 5). Luego de completar el proceso de secado, se procederá a determinar el peso de la biomasa seca mediante la realización de tres mediciones independientes (Andrade et al., 2009).



**Figura 6.**

*Obtención de biomasa seca de Scenedesmus spp.*

### **Extracción de lípidos por el método Bligh & Dyer adaptado para microalgas**

Dentro del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas, las fases críticas son la disrupción celular y la extracción de lípidos, ya que estas etapas resultan fundamentales para obtener triglicéridos que posteriormente pueden ser sometidos a una reacción de transesterificación para producir biodiesel y glicerina. En esta adaptación, se evaluaron simultáneamente dos enfoques: el pretratamiento utilizando el método organosolv o la hidrólisis ácida, ambos destinados a romper las células de las microalgas.

Además, se emplearon como solventes el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), el metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y el agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). El proceso de extracción mediante el método Bligh & Dyer, contempla las etapas de agitación, centrifugación, separación y volatilización

(Delgado, Galindo, Gonzales, & Peralta, 2012). Los equipos a utilizar para la extracción de lípidos con el método adaptado para microalgas son:

**Equipos:**

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Refrigerador
- ✓ Sonificador
- ✓ Centrifuga con tubos de 100 ml
- ✓ Vortex

**Materiales de laboratorio**

- ✓ Papel aluminio
- ✓ Vidrio reloj
- ✓ Recipientes Winkler/ámbar
- ✓ Probeta 100 ml
- ✓ Pipetas
- ✓ Pera de succión
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Embudo de separación

**Reactivos y soluciones**

- ✓ Agua destilada
- ✓ Hielo
- ✓ Cloroformo 98%
- ✓ Metanol 98%

El protocolo de extracción de lípidos por el método Bligh & Dyer adaptado para microalgas, a seguir es el siguiente:

1. Se pesaron, aproximadamente, dos gramos de microalgas secas y se colocaron en un Winkler color ámbar para protegerlas de la luz.
2. Se preparó una mezcla anhidra de solventes cloroformo-metanol (1:2) volumen-volumen y se colocó en el frasco ámbar. Por cada gramo de biomasa 60 mL de solvente.
3. Se sonificó el Winkler durante 15 minutos en un baño de hielo.
4. Esta suspensión se refrigeró durante 24 horas a 4°C.
5. Se sonificó el Winkler por 3 ciclos de 15 minutos cada uno.
6. Se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos, y se recuperó el extracto.
7. A la biomasa residual se le agregó la mitad del primer volumen de mezcla cloroformo-metanol (1:2) y se volvió a centrifugar a 2000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el extracto y se repitió por una vez más.
8. Todos los extractos se combinaron en un solo recipiente y se agregó un volumen de agua destilada en una relación 40:1 con respecto al peso de microalgas inicial.
9. Se agitó en un vortex por 2 minutos, se colocó la solución en un embudo de separación y se esperó que la emulsión se separe.
10. La fase clorofórmica se evaporó en una campana extractora de gases a temperatura ambiente en cajas Petri taradas.

Los resultados de lípidos obtenidos en los dos medios de cultivos con diferentes concentraciones de NPK, será formulados en porcentaje con relación a su biomasa seca.

## **Análisis estadístico**

### **Recuento celular en los cultivos de *Scenedesmus spp***

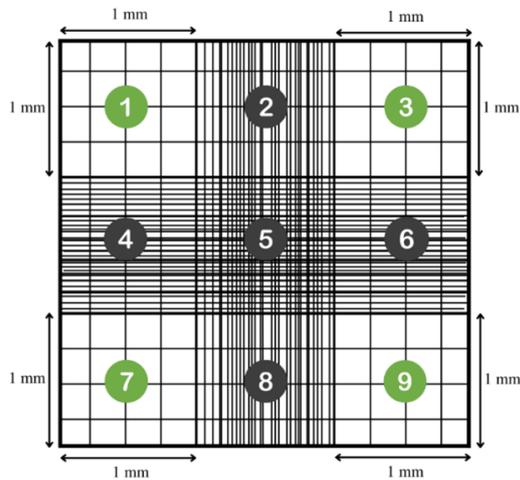
Se extraerá una muestra de 100 ml cada 24 horas, la cual será visualizada bajo un microscopio empleando una cámara de Neubauer, para contar las células presentes (Miranda, 2021). Para el recuento celular se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentracion celular} = \frac{\text{Total celulas contadas}}{\text{Numero de cuadros}} * 10000$$

### **Determinación de concentración celular**

El recuento de células es considerado uno de los métodos más efectivos para evaluar la densidad de microalgas, proporcionando información precisa sobre la cantidad de células presentes en el medio de cultivo. Se utilizó un hemocitómetro para la enumeración de células en una determinada región, la cual se caracteriza por estar dividida en nueve cuadrantes principales, para el conteo y análisis de microalgas se utilizaron los cuadrantes 1, 3, 7 y 9, además se recomienda una vista de 40x para una óptima observación (figura 7). Una vez distinguida las muestras, se transfirieron a la cámara de Neubauer utilizando una micropipeta con capacidad de 100 µl. Consecutivamente, se colocó la muestra en un cuadrante del hemocitómetro,

cuidadosamente se ubicó sobre ella el cubreobjetos, permitiendo ser observadas a través del microscopio.



**Figura 7.**

*Recuento celular a través de la cámara Neubauer.*

### **Curva de crecimiento**

A través de un conteo diario, se registran los valores de concentración celular, es decir, el número de células en función del tiempo, estos datos pueden ser representados en un gráfico (eje X= tiempo empleado; eje Y= concentración celular observada) obteniendo la curva de crecimiento, mostrando las diferentes fases de desarrollo y cinética de crecimiento en los diferentes cultivos de NPK (Sánchez et al., 2019).

## Determinación de variables biocinéticas

A fin de evaluar los efectos del cultivo con dos diferentes niveles NPK, se medirá los parámetros cinéticos (Gómez & Pérez, 2020): tasa de crecimiento, conociendo la densidad celular en dos puntos en el tiempo y el intervalo de tiempo transcurrido, se empleará la siguiente formula:

$$\mu = \frac{(\ln \frac{X_2}{X_1})}{(t_2 - t_1)}$$

- $\mu$  es la tasa de crecimiento.
- $N_1$  es la densidad celular en el tiempo inicial.
- $N_2$  es la densidad celular en el tiempo final.
- $t_1$  es el tiempo inicial.
- $t_2$  es el tiempo final.
- $\ln$  es la función de logaritmo natural.

Se tomará el tiempo de duplicación ( $T_d$ ), para indicar cuánto tiempo les toma a las células de *Scenedesmus spp* duplicar su número en un entorno de crecimiento específico, empleando la siguiente formula:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

- $T_d$  representa el tiempo de duplicación, es decir, el tiempo necesario para que una población se duplique en tamaño.
- $\ln(2)$  es el logaritmo natural de 2, que es aproximadamente igual a 0.6931.

- $\mu$  es la tasa de crecimiento, que es la velocidad a la que una población está aumentando.

Tanto la tasa de crecimiento como el tiempo de duplicación es útil para comprender la cinética de crecimiento y evaluar la capacidad del organismo para proliferar.

### **Productividad de la biomasa**

Se utilizará el método gravimétrico, cosechando muestras al final de fase exponencial, centrifugando la muestra, para su posterior secado. La productividad de biomasa se obtendrá al aplicar la siguiente fórmula:

$$Pb = \frac{Pf - Pi}{T \times Vol}$$

- $Pb$  representa el coeficiente de productividad de biomasa en microalgas
- $Pf$  es el peso final de biomasa seca y  $Pi$  es el peso inicial de biomasa seca.
- $Vol$  representa el volumen del sistema de cultivo de microalgas.
- $T$  es el tiempo de cultivo.

### **Cuantificación de lípidos**

Las muestras de biomasa seca en *Scenedesmus spp* fueron enviadas al laboratorio de análisis Multianalityca S.A, para su posterior extracción y cuantificación lipídica.

La cuantificación de los lípidos extraídos de biomasa seca, se obtendrá siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{PL}{PM} * 100$$

- *PL* es el peso seco de los lípidos totales, expresada en *mg*.
- *PM* es el peso seco de la biomasa *gr*.

#### **Análisis de varianza (ANOVA) multifactorial**

Se utilizará esta técnica estadística para evaluar el efecto de dos los dos medios de cultivos con diferentes niveles de NPK en la producción lipídica. Se recopilarán los datos obtenidos en los grupos experimentales 30-10-10 y 10-40-10, además del grupo control 20-19-19. Utilizando el software estadístico Minitab 19, para realizar un ANOVA tomando en cuenta las concentraciones de NPK y producción de lípidos obtenidos, optando por un nivel de significación del 0,05, además, la prueba HSD de Tukey para determinar el mejor tratamiento de NPK estimulando la acumulación de lípidos en *Scenedesmus spp* (Zubcoff, 2021).

## **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADO**

### **Aplicación de Nitrógeno, Fósforo y Potasio para el cultivo de Microalgas**

#### ***Medio de cultivo a base de Nitrofoska.***

1. Previamente se esterilizan los frascos de vidrios y materiales de laboratorio (pipetas, puntas, vidriería).
2. Se disuelve 1 gramo de Nitrofoska por cada litro de agua empleada, evitando la formulación de grumos (dependiendo de la microalga se utiliza agua salada o dulce).
3. La solución se esteriliza, colocándose en el autoclave a 121 grados centígrados (15 PSI) durante 20 minutos, posteriormente a temperatura ambiente se lleva a refrigeración hasta su uso.
4. Con la ayuda de un mechero para evitar contaminación, se vierte el medio de cultivo NPK en un frasco con capacidad de 2L, por consiguiente, se coloca el inóculo de *Scenedesmus spp.*
5. El medio de cultivo debe mantenerse con fotoperiodo (12 horas de luz y 12 en ausencia de luz) además se debe mantener una aireación constante.

#### ***Fertilización del medio de cultivo con Nitrofoska.***

6. Previamente esterilizado los materiales, se disuelve 2 gramos de Nitrofoska por cada litro de agua, (Depende del hábitat de la especie puede ser agua dulce o salada). Se debe evitar la formación de grumos.

7. Con la ayuda de una micropipeta se colocan 100  $\mu$ l por cada litro del medio de cultivo.
8. Se debe realizar la fertilización del cultivo cada 24 h.

### Concentración celular NPK 20-19-19 – Medio control

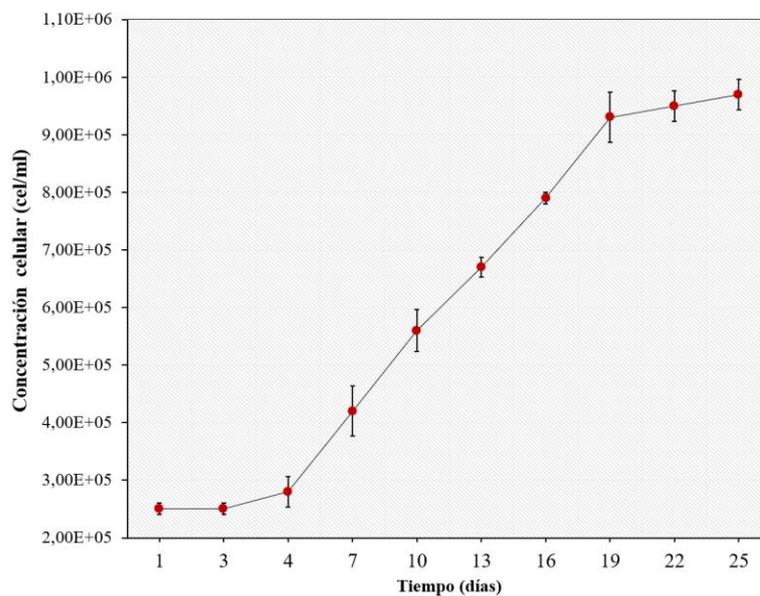
Considerando un inóculo inicial promedio de  $2,50E+05$  células/mL, además de promediar las concentraciones de las 3 réplicas, se alcanzó una máxima concentración celular de  $9,70E+05$  células/mL en el día 24, tras una fase de crecimiento exponencial que se extendió hasta el día 19, donde se registró una concentración de  $9,30E+05$  células/mL, lo que representa un incremento de  $6,80E+05$  células/mL (Tabla 9).

**Tabla 9.**

*Concentración celular en medio control de cultivo NPK 20-19-19.*

<b>Medio de cultivo: NPK 20-19-19</b>					
<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>
1	25	<b>2,50E+05</b>	14	70	<b>7,00E+05</b>
2	25	<b>2,50E+05</b>	15	74	<b>7,40E+05</b>
3	25	<b>2,50E+05</b>	16	79	<b>7,90E+05</b>
4	28	<b>2,80E+05</b>	17	84	<b>8,40E+05</b>
5	31	<b>3,10E+05</b>	18	89	<b>8,90E+05</b>
6	37	<b>3,70E+05</b>	19	93	<b>9,30E+05</b>
7	42	<b>4,20E+05</b>	20	95	<b>9,50E+05</b>
8	47	<b>4,70E+05</b>	21	95	<b>9,50E+05</b>
9	51	<b>5,10E+05</b>	22	95	<b>9,50E+05</b>
10	56	<b>5,60E+05</b>	23	96	<b>9,60E+05</b>
11	59	<b>5,90E+05</b>	24	97	<b>9,70E+05</b>
12	63	<b>6,30E+05</b>	25	97	<b>9,70E+05</b>
13	67	<b>6,70E+05</b>			

A continuación, se inició la fase estacionaria, que se extendió hasta el día 25, durante la cual se observó un aumento mínimo de  $4,00E+04$  células/mL en un periodo de 5 días (ver anexo 1), aumento relativamente bajo, en comparación con la fase de crecimiento exponencial. Durante esta etapa, la tasa de crecimiento celular disminuyó gradualmente hasta detenerse por completo, tal como se observa en la representación gráfica del crecimiento de *Scenedesmus spp* en el medio de cultivo NPK 20-19-19, por lo tanto, la saturación celular al día 24 sugiere que la población alcanzó su límite máximo, comenzando la fase de muerte celular (ver figura 8).



**Figura 8.**

*Curva de crecimiento para Scenedesmus spp, bajo el medio control de cultivo NPK 20-19-19.*

## Cinética de crecimiento NPK 20-19-19

### Tasa de crecimiento ( $\mu$ )

La tasa de crecimiento de *Scenedesmus spp.* en un medio de cultivo Nitrofoska 20-19-19 se obtuvo tomando en cuenta la fase exponencial la cual se extendió 14 días a través de tres réplicas (R1, R2 y R3), con un promedio de  $0.080 d^{-1}$ . Las réplicas muestran valores similares, con una desviación estándar de  $0.00742$ , lo que indica una baja variabilidad entre ellas y sugiere que el experimento es reproducible (tabla 10). Aunque R3 presenta un valor ligeramente menor ( $0.072 d^{-1}$ ) en comparación con R1 ( $0,083 d^{-1}$ ) y R2 ( $0,086 d^{-1}$ ) los resultados son consistentes en general, reflejando un crecimiento estable bajo las condiciones del cultivo.

#### Tabla 10.

*Tasa de crecimiento de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 20-19-19. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

Tasa de crecimiento NPK 20-19-19				
R1	R2	R3	Promedio	DS
$0,083 d^{-1}$	$0,086 d^{-1}$	$0,072 d^{-1}$	$0,080 d^{-1}$	0,007427402

### Tiempo de duplicación (Td)

La tabla 11 muestra los tiempos de duplicación de *Scenedesmus spp.*, en un medio de cultivo con Nitrofoska 20-19-19, registrando los valores en tres réplicas:

R1 (8,373 días), R2 (8,065 días) y R3 (9,655 días), tomando en cuenta la tasa de crecimiento anteriormente descrita. El tiempo de duplicación promedio es de 8,698 días, con una desviación estándar de 0,8431, lo que indica una variabilidad moderada entre las réplicas. Estos resultados reflejan que el crecimiento de *Scenedesmus spp* para el medio de control, evidencio pequeñas diferencias en los tiempos de duplicación entre las réplicas.

**Tabla 11.**

*Tiempo de duplicación de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 20-19-19. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Tiempo de duplicación NPK 20-19-19</b>				
<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
8,373 d	8,065 d	9,655 d	8,698 d	0,843098608

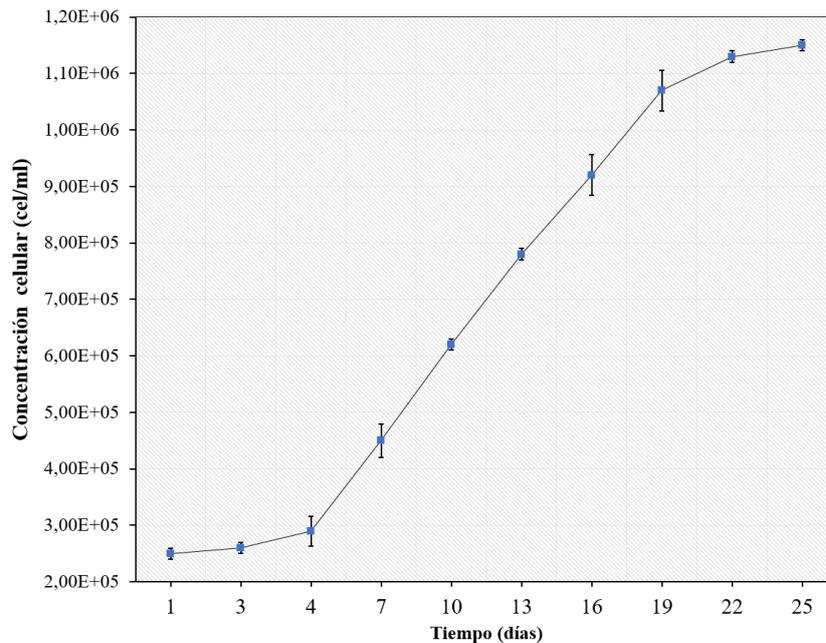
### **Concentración celular NPK 30-10-10 – Medio experimental 1**

Considerando un inóculo inicial promedio de  $2,50E+05$  células/mL, además de promediar las concentraciones de las 3 réplicas, se mantuvo un medio de cultivo a base de Nitrofoska 30-10-10, durante 25 días (Tabla 12).

**Tabla 12.***Concentración celular en medio de cultivo experimental NPK 30-10-10.*

<b>Medio de cultivo: NPK 30-10-10</b>					
<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>
1	25	<b>2,50E+05</b>	14	82	<b>8,20E+05</b>
2	26	<b>2,60E+05</b>	15	87	<b>8,70E+05</b>
3	26	<b>2,60E+05</b>	16	92	<b>9,20E+05</b>
4	29	<b>2,90E+05</b>	17	96	<b>9,60E+05</b>
5	33	<b>3,30E+05</b>	18	103	<b>1,03E+06</b>
6	38	<b>3,80E+05</b>	19	107	<b>1,07E+06</b>
7	45	<b>4,50E+05</b>	20	109	<b>1,09E+06</b>
8	51	<b>5,10E+05</b>	21	110	<b>1,10E+06</b>
9	56	<b>5,60E+05</b>	22	113	<b>1,13E+06</b>
10	62	<b>6,20E+05</b>	23	113	<b>1,13E+06</b>
11	68	<b>6,80E+05</b>	24	115	<b>1,15E+06</b>
12	73	<b>7,30E+05</b>	25	115	<b>1,15E+06</b>
13	78	<b>7,80E+05</b>			

La fase exponencial se extendió hasta el día 19, alcanzando una concentración celular de  $1,07E+06$  células/mL, lo que representa un incremento de  $8,20E+05$  células/mL desde el inicio del cultivo, durante esta fase exponencial, el crecimiento celular fue constante y acelerado. A partir del día 19, el crecimiento celular comenzó la fase estacionaria, marcando un cambio en la dinámica del cultivo, donde el aumento de células fue mucho más moderado, pasando de  $1,07E+06$  células/mL a  $1,15E+06$  células/mL en un lapso de 6 días (ver anexo 2), con un incremento neto de apenas  $8,00E+04$  células/mL. La fase estacionaria se mantuvo hasta el día 25, donde la curva de crecimiento se estabiliza (figura 9). Durante esta fase, el cultivo sigue vivo, pero el número de células comienza a disminuir, comenzando la muerte celular para el medio de cultivo NPK 30-10-10.



**Figura 9.**

*Curva de crecimiento para Scenedesmus spp, bajo el medio experimental de cultivo NPK 30-10-10.*

### **Cinética de crecimiento NPK 30-10-10**

#### **Tasa de crecimiento ( $\mu$ )**

Basándose en la fase exponencial para el medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10, en las tasas de crecimiento de *Scenedesmus spp*, se evidencio una desviación estándar de 0.00537, lo que indica una baja variabilidad entre las réplicas (R1, R2 y R3), reflejando una consistencia en el comportamiento. La tasa de crecimiento en R1 fue de  $0,089 d^{-1}$ , en R2 ligeramente superior con  $0,091 d^{-1}$ , y en R3 mostro una tasa de  $0,0811 d^{-1}$ , siendo esta ultima la más baja. El promedio de las réplicas es de  $0,087 d^{-1}$  (tabla13).

**Tabla 13.**

*Tasa de crecimiento de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Tasa de crecimiento NPK 30-10-10</b>				
<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
0,089 $d^{-1}$	0,091 $d^{-1}$	0,0811 $d^{-1}$	0,087 $d^{-1}$	0,005370466

### **Tiempo de duplicación (Td)**

En el medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10 para *Scenedesmus spp*, se observó una desviación estándar (DS) de 0.5065, lo que indica una variabilidad moderada entre las réplicas, aunque estas se mantienen dentro de un rango razonablemente consistente. Esto sugiere que, si bien los tiempos de duplicación no son idénticos entre réplicas, las diferencias no son extremas. Los tiempos de duplicación fueron de 7.766 días en R1, 7.599 días en R2 y 8.548 días en R3, con un promedio de 7.971 días (tabla 14).

**Tabla 14.**

*Tiempo de duplicación de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 30-10-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Tiempo de duplicación NPK 30-10-10</b>				
<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
7,766 <i>d</i>	7,599 <i>d</i>	8,548 <i>d</i>	7,971 <i>d</i>	0,506553517

## Concentración celular NPK 10-40-10 – Medio experimental 2

Con un inóculo promedio inicial de  $2,50E+05$  células/mL, se logró alcanzar una concentración celular máxima de  $1,06E+06$  células/mL para el día 24, promediando los datos obtenidos de las 3 réplicas, bajo una concentración NPK 10-40-10 (Tabla 15).

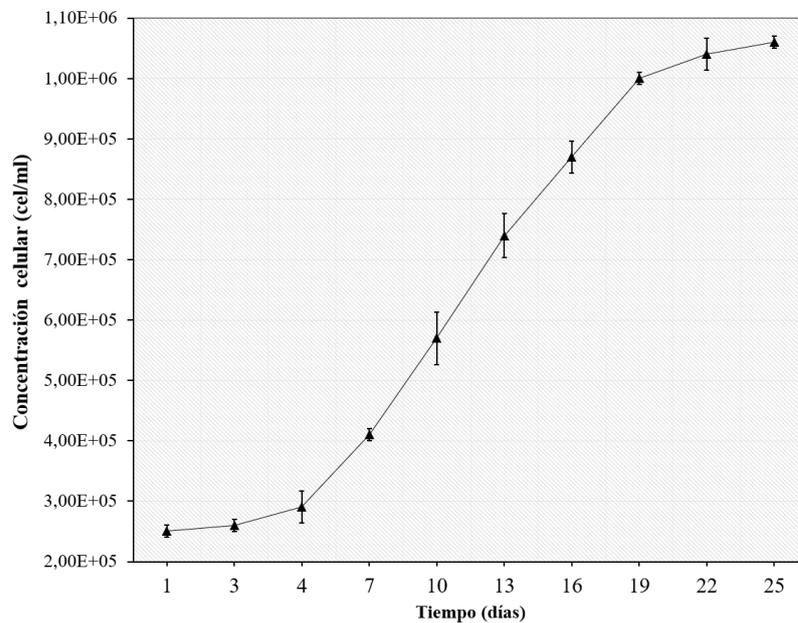
**Tabla 15.**

*Concentración celular en medio de cultivo experimental NPK 10-40-10.*

<b>Medio de cultivo: NPK 10-40-10</b>					
<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Días</i>	<i>Promedio de células contabilizadas</i>	<i>Concentración Celular</i>
1	25	<b>2,50E+05</b>	14	78	<b>7,80E+05</b>
2	25	<b>2,50E+05</b>	15	83	<b>8,30E+05</b>
3	26	<b>2,60E+05</b>	16	87	<b>8,70E+05</b>
4	29	<b>2,90E+05</b>	17	92	<b>9,20E+05</b>
5	31	<b>3,10E+05</b>	18	96	<b>9,60E+05</b>
6	37	<b>3,70E+05</b>	19	100	<b>1,00E+06</b>
7	41	<b>4,10E+05</b>	20	102	<b>1,02E+06</b>
8	47	<b>4,70E+05</b>	21	103	<b>1,03E+06</b>
9	53	<b>5,30E+05</b>	22	104	<b>1,04E+06</b>
10	57	<b>5,70E+05</b>	23	105	<b>1,05E+06</b>
11	66	<b>6,60E+05</b>	24	106	<b>1,06E+06</b>
12	70	<b>7,00E+05</b>	25	106	<b>1,06E+06</b>
13	74	<b>7,40E+05</b>			

La fase de crecimiento exponencial se prolongó hasta el día 19, alcanzando una densidad celular de  $1,00E+06$  células/mL, lo que corresponde a un incremento neto de  $7,50E+05$  células/mL respecto al inóculo inicial, (ver anexo 3). A partir de este punto, se dio inicio a la fase estacionaria, que se extendió hasta el día 25,

durante la cual el crecimiento celular fue significativamente reducido, con un incremento marginal de solo  $6,00E+04$  células/mL en un lapso de 6 días (figura 10).



**Figura 10.**

*Curva de crecimiento para Scenedesmus spp, bajo el medio experimental de cultivo NPK 10-40-10.*

### **Cinética de crecimiento NPK 10-40-10**

#### **Tasa de crecimiento ( $\mu$ )**

La tasa de crecimiento de *Scenedesmus spp.* en un medio de cultivo (limitando el nitrógeno) Nitrofoska 10-40-10 se calculó tomando la fase exponencial, con tres réplicas (R1, R2, R3). Las correspondientes tasas de crecimiento en cada réplica son  $0,087 d^{-1}$ ,  $0,086 d^{-1}$  y  $0,075 d^{-1}$  respectivamente, con un promedio de  $0,083 d^{-1}$  (tabla 16). La desviación estándar calculada es de

0.006477982, lo que refleja una variabilidad moderada en las tasas de crecimiento entre las réplicas.

**Tabla 16.**

*Tasa de crecimiento de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 10-40-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Tasa de crecimiento NPK 10-40-10</b>				
<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
0,087 d <sup>-1</sup>	0,086 d <sup>-1</sup>	0,075 d <sup>-1</sup>	0,083 d <sup>-1</sup>	0,006477982

#### **Tiempo de duplicación (Td)**

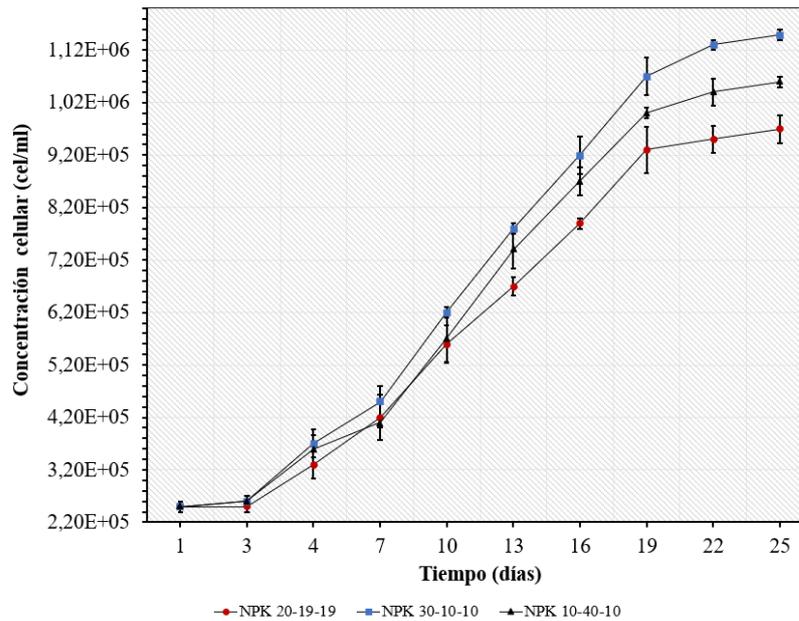
El tiempo de duplicación de *Scenedesmus spp.* en un medio de cultivo Nitrofoska 10-40-10, con tres réplicas (R1, R2, R3) se llevó a cabo durante la fase exponencial, registrando tiempos de 7,941 días, 8,104 días y 9,206 días, con un promedio de 8,417 días, con una desviación estándar de 0,688161774 días (tabla 17).

**Tabla 17.**

*Tiempo de duplicación de Scenedesmus spp, en medio de cultivo Nitrofoska 10-40-10. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Tiempo de duplicación NPK 10-40-10</b>				
<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
7,941 d	8,104 d	9,206 d	8,417 d	0,688161774

## Concentración celular en diferentes cultivos de NPK



**Figura 11.**

*Comparación de la curva de crecimiento para Scenedesmus spp, en las diferentes concentraciones de NPK (20-19-19), (30-10-10) y (10-40-10).*

Los medios de cultivo con diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio, se evaluaron tomando en cuenta el crecimiento celular de *Scenedesmus spp*, mostrando diferencias en la fase de crecimiento exponencial. El medio de control NPK 20-19-19, con un inóculo de  $2.50E+05$  células/mL alcanzó una fase exponencial que inició el día 4 y se extendió al día 19, registrando una concentración en el medio de cultivo de  $9.30E+05$  células/mL, teniendo un aumento de  $6.80E+05$  células/mL, durante esta fase. Por consiguiente, en la fase de desaceleración y estacionaria, se observó un crecimiento reducido en la concentración ( $4.00E+04$  células/mL) en un periodo de cinco días, finalmente se

obtuvo una concentración máxima de  $9.70E+05$  células/mL registrado en el día 24 de la experimentación. Luego de aquello, comenzó la fase de muerte celular reduciendo notoriamente la concentración celular.

En el medio experimental T1, con mayor proporción de nitrógeno (30%) pero baja concentración de fósforo (10%) y potasio (10%), registró un crecimiento en la fase exponencial mayor en comparación con el medio control, obteniendo una concentración celular de  $1.07E+06$  células/mL en esta fase, lo que representa un incremento de  $8.20E+05$  células/mL comprendido entre el día 4 al 19, de esta manera se destaca el nitrógeno como fuente para la síntesis de proteínas y crecimiento celular. La fase estacionaria y desaceleración, que se observó del día 20 a 25, mostró un incremento notorio ( $8.00E+04$  células/mL), de esta manera se registró una concentración máxima de  $1.15E+06$  células/mL, posteriormente inicio la fase de muerte celular en el cultivo. Por otro lado, el medio experimental T2, con una alta concentración de fósforo (40%) pero baja concentración de nitrógeno (10%) y potasio (10%), registró un desarrollo superior al medio control e intermedio en comparación con T1, debido a que el inóculo inicial de  $2.50E+05$  células/mL en la fase de latencia alcanzó una concentración de  $1.00E+06$  células/mL en el día 19 de la fase exponencial, representa un aumento de  $7.50E+05$  células/mL en el medio de cultivo, sin embargo, este desarrollo disminuyo una vez comenzado la fase de desaceleración y estacionaria, registrando un incremento moderado ( $6.00E+04$  células/mL), por lo tanto en T2, se obtuvo una concentración máxima de  $1.06E+06$  células/mL.

Por consiguiente, el medio experimental 1 (NPK 30-10-10), con mayor concentración de nitrógeno, promovió un mayor crecimiento en la fase exponencial, mientras que el medio experimental 2 (NPK 10-40-10), con mayor concentración de fósforo, se destacó por un crecimiento más prolongado en la fase estacionaria, aunque más moderado. Es importante destacar que los medios experimentales 1 (Media=740,800; SD=327,858) y 2 (Media=697,200; SD=301,407) superaron la concentración celular de *Scenedesmus spp*, en comparación con el medio de control (Media=648,000; SD=266,255).

### Cinética de crecimiento en concentraciones de NPK

**Tabla 18.**

*Variables cinéticas de crecimiento registradas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de NPK.*

<i>Medio de cultivo</i>	<b>Variables</b>		
	<b>Biocinéticas</b>		
	<i>X<sub>m</sub> (Cell/mL)</i>	<i>μ (d<sup>-1</sup>)</i>	<i>T<sub>d</sub> (d)</i>
<b>NPK 30-10-10 (T1)</b>	1,15E+06	0,087 d <sup>-1</sup>	7,971 d
<b>NPK 20-19-19 (C)</b>	9,70E+05	0,080 d <sup>-1</sup>	8,698 d
<b>NPK 10-40-10 (T2)</b>	1,06E+06	0,083 d <sup>-1</sup>	8,417 d

La cinética de crecimiento mostrada en *Scenedesmus spp*, en los medios experimentales T1 y T2 junto comparado con el medio control, registraron diferentes tasas de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (Td) (tabla 18).

Tomando en cuenta el medio NPK 30-10-10 (T1), con una alta concentración de nitrógeno (30%), se obtuvo una tasa de crecimiento promedio de  $0,087 d^{-1}$ , lo que indica un crecimiento celular mayor en el medio de cultivo durante la fase exponencial, se calculó el tiempo de duplicación, teniendo como promedio de 7,971 días, siendo este último el tiempo en que las células duplicaron su número, además se registró una baja variabilidad entre las réplicas (DS= 0,00537) mostrando consistencia en el medio y óptimo para un desarrollo eficaz de *Scenedesmus spp*, superando a las demás concentraciones de NPK.

El medio de control NPK 20-19-19 (C), el cual se destaca por una proporción equilibrada de nitrógeno, fósforo y potasio, registró un crecimiento sostenido pero inferior a T1, debido a que el registro de la tasa de crecimiento es inferior, con un promedio de  $0,080 d^{-1}$  entre las réplicas, por consiguiente, el tiempo de duplicación obtuvo un promedio de 8,698 días, reflejando un ritmo de crecimiento más lento en comparación con el medio NPK 30-10-10. Cabe destacar que se indica una estabilidad de resultados debido a la baja desviación estándar entre las réplicas (0,00742). El medio NPK 10-40-10, el cual se caracteriza por una concentración fósforo (40%) y limitación de nitrógeno (10%), obtuvo como resultado una tasa de crecimiento promedio entre las réplicas de  $0,083 d^{-1}$ , siendo este valor superior al medio control, pero inferior si se lo compara con T1, un medio enriquecido en nitrógeno, por consiguiente, aunque el fósforo es esencial para una correcta síntesis de ácidos nucleicos y transferencia de energía, no compensa la baja disponibilidad de nitrógeno en el medio, limitando el crecimiento celular, lo cual se

evidencia en el tiempo de duplicación promedio fue de 8,417 días, resultado intermedio entre T1 y el medio control, indicando que las células tardaron más tiempo en duplicarse.

### Obtención de biomasa en *Scenedesmus spp*

**Tabla 19.**

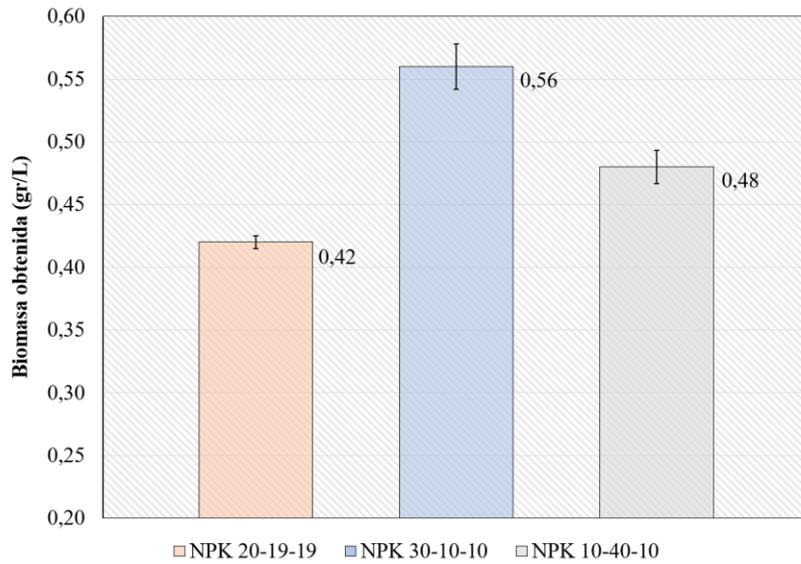
*Obtención de biomasa en Scenedesmus spp, según los medios de cultivos de Nitrofoska. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<b>Biomasa obtenida</b>					
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Obtención de biomasa (gr/L)</b>			<b>Promedio</b>	<b>SD</b>
	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>		
NPK 20-19-19 (C)	0,42 gr/L	0,41 gr/L	0,42 gr/L	0,42 gr/L	0,005
NPK 30-10-10 (T1)	0,58 gr/L	0,54 gr/L	0,57 gr/L	0,56 gr/L	0,018
NPK 10-40-10 (T2)	0,49 gr/L	0,47 gr/L	0,47 gr/L	0,48 gr/L	0,013

El medio NPK 30-10-10, caracterizado por su alto contenido de nitrógeno, alcanzó la mayor productividad promedio de biomasa (0.56 g/L) (ver anexo 6). Aunque presentó una desviación estándar de 0.018 g/L, lo que indica una moderada variabilidad entre las réplicas, este medio demostró ser consistente, con ligeras fluctuaciones, pero manteniendo una tendencia general favorable para la producción de biomasa.

El medio NPK 20-19-19, con proporciones equilibradas en sus nutrientes, registró una productividad de biomasa de 0.42 g/L (ver anexo 4), siendo esta menor en comparación con los medios T1 y T2 (Figura 12). No obstante, cabe destacar que, a pesar de la baja producción de biomasa en este medio comparado con T1 y su mayor proporción de nitrógeno, el medio control muestra una alta consistencia en su productividad, la cual es evidenciada por una desviación estándar baja de 0.005 entre sus réplicas, indicando que este medio de cultivo ofrece condiciones uniformes para el desarrollo de *Scenedesmus spp.*

Por otro lado, el medio de cultivo con un elevado contenido de fósforo (NPK 10-40-10), obtuvo una productividad de biomasa presente en el cultivo de 0.48 g/L (ver anexo 5) siendo este resultado intermedio entre T1 y control, en cuanto a su desviación estándar se registró en 0.013, estos resultados verifican un buen desarrollo en la productividad de biomasa en un medio con mayor contenido fosfórico, sin embargo, en comparación con la disposición de nitrógeno presente en T1, no se observa un aumento significativo en la biomasa obtenida.



**Figura 12.**

*Obtención de biomasa en Scenedesmus spp, según los medios de cultivos de Nitrofoska en diferentes concentraciones.*

### **Productividad de biomasa obtenida en Scenedesmus spp**

**Tabla 20.**

*Productividad de biomasa obtenida en Scenedesmus spp. C= medio control.*

*T1= Tratamiento 1. T2= Tratamiento 2. SD=Desviación estándar.*

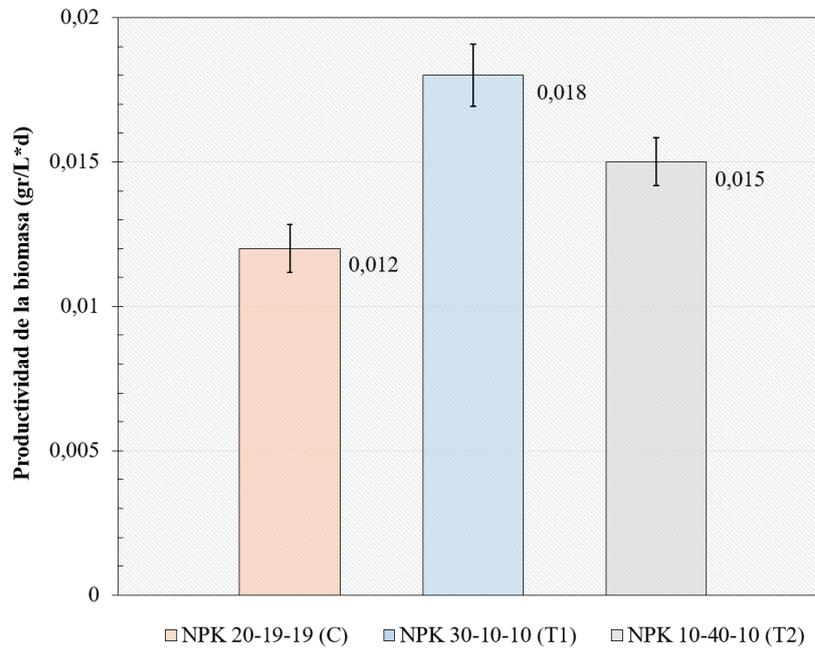
<b>Productividad de la biomasa</b>		
<i>Medio de cultivo</i>	<i>Productividad final (Pb)</i>	<i>SD</i>
NPK 20-19-19 (C)	0,0124 gr/L*d	0,00023094
NPK 30-10-10 (T1)	0,0176 gr/L*d	0,00046188
NPK 10-40-10 (T2)	0,01466 gr/L*d	0,00023094

Los tres tratamientos de fertilizantes NPK (20-19-19, 30-10-10, y 10-40-10) presentan diferentes efectos sobre la productividad y el crecimiento de biomasa. En el caso del NPK 20-19-19, se observó un incremento moderado en la biomasa final ( $R_1=0,84 \text{ gr}$ ;  $R_2=0,82 \text{ gr}$ ;  $R_3=0,84 \text{ gr}$ ) con un promedio de  $0,83 \text{ gr}$ , obteniendo una productividad final consistente de  $0,012 \text{ gr/L*d}$ , la desviación estándar baja de  $0,00023094$  indica una alta consistencia entre las réplicas. Este tratamiento promueve un crecimiento balanceado, la proporción de nitrógeno, fósforo y potasio es adecuada para un desarrollo equilibrado, pero no óptimo para una máxima productividad.

Por otro lado, el fertilizante NPK 30-10-10 mostró los mejores resultados en términos de biomasa final, alcanzando valores superiores a los de los otros tratamientos ( $R_1=1,16 \text{ gr}$ ;  $R_2=1,08 \text{ gr}$ ;  $R_3=1,14 \text{ gr}$ ) con un promedio de  $1,12 \text{ gr}$ , con una productividad final de  $0,018 \text{ gr/L*d}$ . La combinación de un contenido más alto de nitrógeno favorece un mayor crecimiento de biomasa, lo que lo convierte en el tratamiento más eficaz para generar mayor cantidad de biomasa total, se registró una desviación estándar moderada ( $0,00046188$ ) aunque no representa un valor alto, registra la mayor desviación comparada con el medio de cultivo control y T1.

Por último, el NPK 10-40-10 mostró una productividad intermedia, con un promedio de biomasa final registrada en  $0,15 \text{ gr}$  ( $R_1=0,98 \text{ gr}$ ;  $R_2=0,94 \text{ gr}$ ;  $R_3=0,94 \text{ gr}$ ) y una productividad de  $0,015 \text{ gr/L*d}$ , aunque la biomasa final fue menor que en

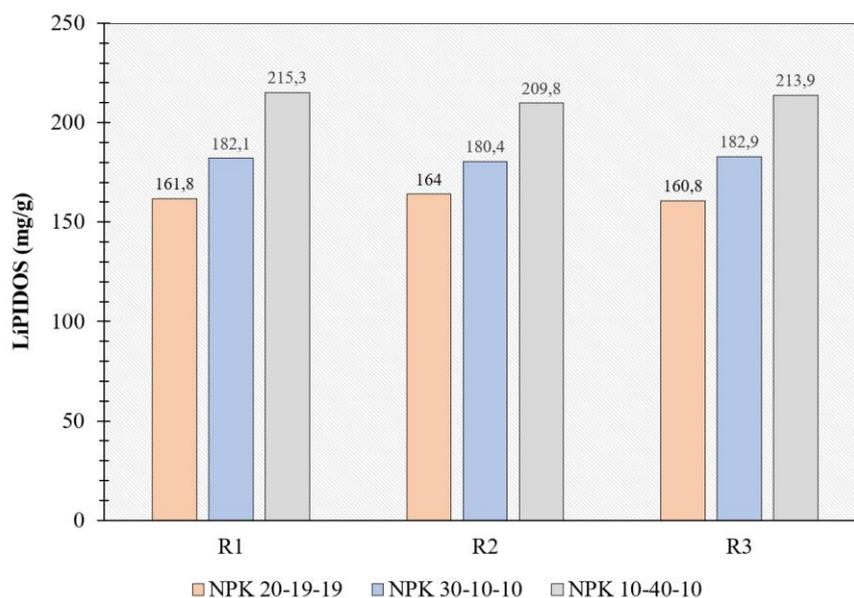
el caso del NPK 30-10-10, la productividad fue muy consistente entre las réplicas, con una desviación estándar igualmente baja 0,00023094 igualando al medio control.



**Figura 13.**

*Productividad de biomasa en Scenedesmus spp, según los medios de cultivos de Nitrofoska en diferentes concentraciones.*

### Lípidos extraídos en *Scenedesmus spp.*



**Figura 14.**

*Extracción lipídica proveniente de Scenedesmus spp, en medios de cultivos Nitrofoska en diferentes concentraciones.*

El medio NPK 20-19-19, presentó resultados consistentes, obteniendo un promedio de 162,2 mg/g de lípidos entre las réplicas (R1=161,8 mg/g; R2=164 mg/g; R3=160,8 mg/g), además se registró una desviación estándar de 1,637, dichos resultados muestran que este medio ofrece una extracción de lípidos moderada, tomando en cuenta la poca variabilidad. En comparación, en el medio T1 se observa un incremento en la acumulación lipídica, alcanzado un promedio de 181,8 mg/g (R1=182,1 mg/g; R2=180,4 mg/g; R3=182,9 mg/g) y una desviación estándar menor al control (1,276) siendo NPK 30-10-10 un medio estimulante para la producción lipídica. Sin embargo, el medio T2 con una mayor proporción de fósforo, obtuvo el promedio más alto de lípidos extraídos de 213 mg/g entre las

réplicas (R1=215,3 gr; R2=209,8 mg/g; R3=213,9 mg/g), sin embargo, registro una desviación estándar alta (2,858), indicando una mayor variabilidad. Por lo tanto, una mayor concentración de fósforo seguida de una limitación de nitrógeno y potasio, está relacionado a estimular la acumulación de lípidos en *Scenedesmus spp.*

**Tabla 21.**

*Lípidos extraídos en Scenedesmus spp, según los medios de cultivos de Nitrofoska. R1=Réplica 1. R2=Réplica 2. R3=Réplica 3. SD=Desviación estándar.*

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Lípidos (%)</i>			<i>Promedio</i>	<i>SD</i>
	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>		
NPK 20-19-19 (C)	16,18 %	16,40 %	16,08 %	16,22 %	0,16371
NPK 30-10-10 (T1)	18,21 %	18,04 %	18,29 %	18,18 %	0,12767
NPK 10-40-10 (T2)	21,53 %	20,98 %	21,39 %	21,30 %	0,28583

En cuanto al porcentajes de lípidos extraídos de *Scenedesmus spp.*, en las diferentes concentraciones de Nitrofoska, como resultado se obtuvo que NPK 20-19-19 (C) obtuvo un promedio de lípidos del 16,22% en la biomasa obtenida, además de una baja variabilidad (SD = 0,16371). Por consiguiente, el tratamiento T1 alcanzo un promedio de 18,18%, con la desviación estándar más baja (0,12767) resultado constante y mayor al medio control. Finalmente, el medio T2 (40% fósforo), alcanzó el mayor porcentaje de lípidos extraídos en relación a la biomasa con un 21,30% (SD = 0,28583). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) indican que existen diferencias significativas en la acumulación de lípidos en *Scenedesmus spp*, cultivado en distintos medios de NPK (F= 473,35; p= <0,05) (ver

anexo 13), además se realizó la prueba HSD de Tukey ( $p=0.00000$ ) indicando que T2 (NPK 10-40-10) es la mejor concentración para una acumulación de lípidos, mostrando una diferencia de  $50,80 \text{ mg/g}$  sobre el medio control y  $31,20 \text{ mg/g}$  sobre T1(NPK 30-10-10) (ver anexo 14).

## DISCUSION

En el presente estudio, el medio experimental 1 (NPK 30-10-10), con una alta proporción de nitrógeno, favoreció un rápido incremento en la fase exponencial, alcanzando una concentración máxima de  $1.15 \times 10^6$  células/mL, siendo este resultado consistente con estudios que destacan la importancia del nitrógeno en el crecimiento celular de microalgas. De acuerdo con Xin et al. (2010), el nitrógeno es un nutriente importante para la síntesis de proteínas, necesario para la replicación celular y el aumento de la biomasa en cultivos de microalgas. Una mayor proporción de fósforo, también permitió un crecimiento considerable, aunque de manera más moderada ( $1.06 \times 10^6$  células/mL) medio experimental 2 (NPK 10-40-10), debido a la función del fósforo en la síntesis de ATP y otros compuestos energéticos esenciales para la transferencia de energía en procesos celulares.

Según investigaciones como las de Yaakob et al. (2021), el fósforo es esencial para el metabolismo energético, aunque su influencia en la densidad celular máxima es menos pronunciada que la del nitrógeno, sugieren que, si bien un aporte elevado de fósforo es fundamental para sostener el crecimiento y la actividad metabólica, no es suficiente por sí solo para superar la limitante de crecimiento asociada a la disponibilidad de nitrógeno en *Scenedesmus spp*, para alcanzar altos rendimientos en cultivos de microalgas, es necesario ajustar la proporción de

nutrientes de acuerdo con las necesidades específicas del organismo en cultivo, donde el balance entre nitrógeno y fósforo es clave para optimizar el crecimiento y prevenir desbalances nutricionales. Por último, el medio control (NPK 20-19-19), con proporciones balanceadas de nutrientes, mostró un crecimiento intermedio, lo que sugiere que un equilibrio en los nutrientes permite un desarrollo celular estable pero no maximiza la densidad celular en la misma medida que el aumento específico de nitrógeno. Este resultado se alinea con la teoría de Liebig, que sostiene un desarrollo óptimo de un organismo está limitado por el recurso menos disponible en relación con su necesidad (2010).

Los resultados obtenidos en cuanto a la tasa de crecimiento muestran semejanza con estudios previos, por ejemplo, Duan et al. (2020) resalta lo importante de suministrar diferentes niveles en nitratos y fosfatos correspondiente al medio BG11, las microalgas absorben de manera eficaz el amonio, una forma de nitrógeno que *Scenedesmus obliquus* asimila, de esta manera se logró una tasa de crecimiento, registrando un valor de  $0.266 d^{-1}$ , tomando en cuenta un medio de cultivo rico en nitrógeno y fosfato, de igual manera, la alta concentración de nitrógeno presente en el medio NPK 30-10-10 obtuvo como resultado la mayor tasa de crecimiento  $0.087 d^{-1}$  y por ende el menor tiempo de duplicación (7.967 días) en la microalga *Scenedesmus spp.* Por otro lado, el estudio de Pudaite (2015) complementa esta observación, indicando que la ausencia de nitrógeno en el medio Chu-10 provocó una reducción significativa en la tasa de crecimiento de *Scenedesmus spp* ( $0.0528 d^{-1}$ ), representando una inhibición del 72.84 % respecto

al control ( $0.1944 d^{-1}$ ). La ausencia de fósforo, en comparación, resultó en una inhibición menor (10.24 %) y una tasa de crecimiento de  $0.1745 d^{-1}$ . Este comportamiento resalta la dependencia de *Scenedesmus spp* en fuentes de nitrógeno para optimizar su crecimiento, como también se observó en el presente estudio, donde el fertilizante NPK 10-40-10, con una menor concentración de nitrógeno, resultó en una tasa de crecimiento intermedia ( $0.083 d^{-1}$ ), diferenciando del medio de control NPK 20-19-19, a pesar de un equilibrado en nutrientes, obtuvo como resultado en una tasa de crecimiento de  $0.080 d^{-1}$ , siendo esta menor a T1 y T2.

De acuerdo con, Quevedo et al. (2008) la disponibilidad de los nutrientes afecta la estabilidad crecimiento en la fase exponencial, en su estudio, el Medio Estándar 1 enriquecidas con concentraciones de  $KNO_3$  y  $KH_2PO_4$ , obtuvo una tasa de crecimiento de  $0.059 d^{-1}$ , la cual se vio limitada por el agotamiento de los nutrientes. De la misma forma, el Medio Estándar 2, con concentraciones de carbono y nitrógeno, mostro una tasa de crecimiento de  $0.035 d^{-1}$  pero en una fase exponencial más prolongada. Por otro lado, en el estudio de Mercado et al. (2020) se utilizó aguas residuales provenientes de la industria láctea, las cuales fueron enriquecidas con Bayfolan®, resultando una alternativa viable a los medios de cultivos tradicionales, sin afectar la tasa de crecimiento. En el medio control (BG11), *Scenedesmus spp* alcanzó una tasa de crecimiento de  $0.51 d^{-1}$ , mientras que en el medio compuesto por aguas residuales y Bayfolan® la tasa de crecimiento fue de  $0.54 d^{-1}$ , siendo ligeramente superior, por lo tanto, los medios de cultivos no

convencionales enriquecidos con nitrógeno, fósforo y potasio tienen la capacidad de ofrecer tasas de crecimiento iguales o mejor que los medios tradicionales.

Estudios previos confirman la sensibilidad de *Scenedesmus spp.* a las variaciones en los macronutrientes, influyendo directamente en la acumulación de lípidos. Cobos et al. (2015) reportaron que la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo CHU10 maximiza la acumulación de lípidos, alcanzando 243,3 mg/g de biomasa seca en *Scenedesmus spp.*, un valor comparable con los obtenidos en este estudio para el medio NPK 10-40-10 (213 mg/g), resultados semejantes a los obtenidos por Pancha et al. (2014), destacando que *Scenedesmus spp.*, aumenta su contenido lipídico en medios de cultivos limitados por la ausencia de nitrógeno, siendo superior en comparación con medios tradicionales como BG-11. En la misma línea, Uslu et al. (2022) mostraron que limitar el nitrógeno incrementa la productividad lipídica, sin embargo, esta ausencia llega a afectar el crecimiento celular y productividad de biomasa. En contraste, una deficiencia de fósforo y potasio en el medio de cultivo no muestra impactos considerables para el contenido de lípidos, sugiriendo que la acumulación de estos es más sensible a las variaciones de nitrógeno. Por su parte, Mercado et al. (2020) observaron que la adición de fertilizantes agrícolas en medios a base de aguas residuales, junto con el ajuste en los niveles de nitrógeno y fosfatos, incrementa tanto la biomasa como el contenido de lípidos de *Scenedesmus spp.* bajo condiciones de estrés. De manera similar, Gonzales et al. (2021) evaluaron medios de cultivo no convencionales para *Scenedesmus spp.* usando distintos tipos de aguas residuales tratadas y enriquecidas, el medio BCAM, que consiste en agua residual tratada y enriquecida

solo con nitrógeno, alcanzó un contenido lipídico del 15% al 16%. El medio PAM, enriquecido con nitrógeno y fósforo, mostró una acumulación de lípidos más alta, entre el 16% y el 22%. Finalmente, el medio BM, suplementado con Bayfolan®, registró un contenido de lípidos entre el 9% y el 13%, estos valores son similares a los alcanzados (NPK 20-19-19 = 16,22%; NPK 30-10-10 = 18,18%, NPK 10-40-10 = 21,30%). Estos estudios sugieren que la manipulación de los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio en los medios de cultivo puede estimular la producción de lípidos en *Scenedesmus spp.*

## CONCLUSIONES

Las diferentes concentraciones de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio tienen un impacto en la dinámica de crecimiento celular en los medios cultivos de *Scenedesmus spp.* El medio experimental T1 con una concentración de nitrógeno (30%), obtuvo mejores resultados en la fase exponencial, con una concentración máxima de  $1.15E+06$  células/mL, a diferencia del medio experimental T2, con un mayor incremento de fósforo (40%) con una máxima concentración celular de  $1.06E+06$  células/mL, obteniendo un desarrollo intermedio, ambos medios T1 y T2, superaron al medio de control (NPK 20-19-19).

La cinética de crecimiento en el medio NPK 30-10-10, mostró la mayor tasa y el menor tiempo de duplicación ( $0,087 d^{-1}$ ; 7,967 días), resaltando la importancia del nitrógeno como nutriente. En cambio, en una distribución equilibrada de NPK (20-19-19), se observó un crecimiento lento en comparación con T1 ( $0,080 d^{-1}$ ; 8,664 días), en cambio, una alta concentración de fósforo (40 %) en el medio T2, obtuvo rendimiento intermedio, ligeramente superior al medio control, con una tasa de crecimiento  $0,083 d^{-1}$ ; y un tiempo de duplicación 8,351 días, siendo el fósforo y potasio nutrientes esenciales en los medios de cultivos, sin embargo se destaca el nitrógeno para una mayor cinética de crecimiento.

En términos de biomasa obtenida y productividad en *Scenedesmus spp*, el medio con mayor nitrógeno (NPK 30-10-10) alcanzó la mayor producción de biomasa (0,56 g/L), y la mejor productividad (0,018 g/L\*d), lo que lo convierte en el tratamiento más efectivo para el desarrollo, mientras que el medio control NPK 20-19-19 mostró un promedio menor (0,42 g/L) y una productividad baja de 0,012 g/L\*d, ligeramente por debajo del medio T2, con alta concentración de fósforo (NPK 10-40-10), presentó una producción intermedia (0,48 g/L) y una productividad y (0,015 g/L\*d).

Las diferentes concentraciones de NPK en el medio de cultivo estimulan la productividad lipídica en *Scenedesmus spp*, acorde a los resultados obtenidos, el medio NPK 20-19-19, mostrando un equilibrio de nutrientes, obtuvo un promedio de 162,2 mg/g con baja variabilidad entre las réplicas; el medio NPK 30-10-10, con mayor nitrógeno, incremento su acumulación lipídica a 181,8 mg/g; por último, el medio NPK 10-40-10, con mayor fósforo, obtuvo el mayor promedio de lípidos con 213 mg/g, superando el 20% en relación con la biomasa obtenida, de esta manera se demuestra que el aumento de fosforo, limitando el nitrógeno y potasio, estimulan la producción de lípidos en *Scenedesmus spp*.

## RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones sobre la limitación de nitrógeno y sus efectos del estrés nutricional en *Scenedesmus spp.*
- Explorar el uso de fertilizantes y medios de cultivo no convencionales en microalgas de agua salada.
- Examinar el potencial de los lípidos producidos, incluyendo su uso en biocombustibles y alimentación acuícola.

## BIBLIOGRAFIA

- Agroalsa. (10 de Febrero de 2021). *AGRO ALPANSEQUE S.L.* Obtenido de <https://www.fertilizanteagricola.com/nitrofoska.html>
- Aguilar, M. (2014). *Análisis del cultivo de la microalga chlorella vulgaris a diferentes fotoperiodos y concentraciones de nitrógeno*. Chiapas: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
- Akgül, F., Tüney Kızılkaya, I., Akgul, R., & Erduğan, H. (2017). Morphological and molecular characterization of Scenedesmus-like species from Ergene River Basin. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17(3), 609-619. doi:10.4194/1303-2712-v17\_3\_17
- Andrade , C., Vera , A., Cárdenas , C., & Morales , E. (2009). *Biomass production of microalga Scenedesmus sp. with wastewater from fishery*. Maracaibo: SCIELO.
- Aponte, G. M. (2019). Efecto del nitrofoska verde y suero de leche como medios de cultivo en la producción de biomasa de Scenedesmus acuminatum IMP-LBA-008, en fotobiorreactor de tanque agitado. *Red de Repositorios Latinoamericanos*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12692/40847>
- Arias Peñaranda, M., Cañizares Villanueva, R., & Martínez Roldán, A. (2013). *Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos*. Universidad Nacional de Colombia,

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Obtenido de  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/42975>

Atiku, H., Mohamed, R., Al-Gheethi, A., Wurochekke , A., & Hashim, A. (2016).  
*Harvesting of microalgae biomass from the phycoremediation process of greywater*. Environ Sci Pollut Re.

Banerjee, A., Kumar, N., Varjani, S., Guria, C., Bandopadhyay, R., Shukla , P., &  
Banerjee, C. (2018). Computational Modelling and Prediction of  
Microalgae Growth Focused Towards Improved Lipid Production.  
*Biosynthetic Technology and Environmental Challenges. Energy,  
Environment, and Sustainability*. Obtenido de [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_13)

Barrado, M. (2016). *ELIMINACIÓN DE MICROALGAS DE LAS AGUAS  
MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOS Y QUÍMICOS*.

Barraza, C. R. (2011). “*INDUCCION LIPIDICA POR LIMITACION DE  
NUTRIENTES EN LAS MICROALGAS Scenedesmus dimorphus y  
Chlorella sorokiniana*”. Chihuahua: Cimav.

Belotti, G., Bravi, M., Caprariis, B., Filippis, P., & Scarsella, M. (2013). *Effect of  
Nitrogen and Phosphorus Starvations on Chlorella vulgaris Lipids  
Productivity and Quality under Different Trophic Regimens for Biodiesel  
Production*. American Journal of Plant Sciences.  
doi:10.4236/ajps.2013.412A2006

- Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E., & Mora, R. (2013). *Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas Hyaloraphidium contortum y Pseudokirchneriella subcapitata*. Interciencia. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33928557009>
- Castillo, O., Torres, C., Núñez, C., Herrera, M., & Rodríguez, N. (2018). *Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects*. Guanajuato: HIDROBIOLÓGICA.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T., & Salley, S. (2011). *Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae Dunaliella tertiolecta*. Bioresour Technol. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.062
- Cobos, R., Paredes, J., & Castro, J. (2015). *Induction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress*. Iquitos: Acta biol. Colomb.
- Contreras, F., Peña, M., Flores, L., & Cañizares, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442003000800004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000800004&lng=es&tlng=es).
- Delgado, A., Galindo, L., Gonzales, S., & Peralta, Y. (2012). Adaptación del Método Bligh & Dyer a la Extracción de Lípidos de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel de Tercera Generación. 25-34. doi:10.22490/25394088.1093
- Duan, Y., Guo, X., Yang, J., Zhang, M., & Li, Y. (2020). Nutrients recycle and the growth of Scenedesmus obliquus in synthetic wastewater under different

sodium carbonate concentrations. *Royal Society Open Science* ,  
doi/10.1098/rsos.191214.

Elloumi, W., Jebali, A., Maalej, A., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2020). *Effect of Mild Salinity Stress on the Growth, Fatty Acid and Carotenoid Compositions, and Biological Activities of the Thermal Freshwater Microalgae Scenedesmus sp.* *Biomolecules*.  
doi:doi.org/10.3390/biom10111515

Flor, T. (2023). *OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE Scenedesmus sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA*. Quito: Universidad Internacional SEK .

García, J., Pavía, M., García, T., Chirivella, J., & Serrano, A. (2017). *Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica*. Nereis. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.22386/ca.v8i2.293>

Gómez , J., & Pérez, J. (2020). *Efecto del fotoperiodo sobre la producción de carotenoides y la morfología de la microalga Tetraselmis gracilis*. Monteria: Universidad de Cordoba.

Gómez, N. A., Lugo, C. A., & Peñuela, M. (2022). *Evaluación de la relación Carbono Nitrógeno y Carbono Fósforo para mejorar la producción de biomasa y ácidos grasos en Chlorella sorokiniana*. *Hidrobiológica* 32.  
doi:10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2022v32n1/Lugo

- González Falfán, K. A., Guerrero Barajas, C., Badillo Corona, J. A., & Fernández Linares, L. C. (2021). *Production of metabolites from Scenedesmus sp. and a microalgal consortium cultured in unconventional media*. Ciencias Marinas. doi:doi.org/10.7773/cm.v47i2.3138
- Hakalin, N., & Paz, A. (2014). *Mejora del crecimiento celular y el contenido de lípidos de una microalga de agua dulce Scenedesmus sp. optimizando las concentraciones de nitrógeno, fósforo y vitaminas para la producción de biodiesel*. Brasilia.
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). *Microalgae, culture and benefits*. Región Metropolitana: Revista de biología marina y oceanografía.
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios*. Revista de biología marina y oceanografía, 49(2).  
doi:https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001
- Ideagro. (2019). *La importancia de la actividad enzimática en el suelo para la agricultura*. Murcia: Alltech Company.
- Irwin, A., & Finkel, Z. (2018). *Phytoplankton functional types: a trait perspective*. Sackville: Biorxiv.
- Jimenez Escobedo, M., & Castillo Calderón, A. (2021). *Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles*. Trujillo: Scientia Agropecuaria.

- Joun , J., Hong , M., Sirohi , R., & Sim , S. (2021). *Producción mejorada de biomasa a través de un modo de cultivo auto y heterótrofo secuencial repetido en Chlorella protothecoides*. Tecnología de biorrecursos.
- Kalinina, A., Naumov, V., Verakhina, A., Ovchinnikova, S., Yakovleva, D., Dobrov, A., . . . Afanasieva, P. (2023). *Study of the Influence of the Temperature and Time of Microalgae Cultivation on the Reproduction Rate of Chlorella and Scenedesmus Microalgae When Cultured in a Tubular Photobioreactor*. Nizhny Novgorod: Department of Nanotechnology and Biotechnology.
- Kumari, K., Samantaray, S., Sahoo, D., & Tripathy, B. (2021). *Nitrogen, phosphorus and high CO<sub>2</sub> modulate photosynthesis, biomass and lipid production in the green alga Chlorella vulgaris*. Photosynth Res.
- Leon, K. (2020). *Fertilizantes nitrogenados en el desarrollo y producción en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.), en el cantón Babahoyo*. Babahoyo: Universidad Técnica de Babahoyo.
- Liebig, J. (2010). *Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie* . Friedrich Vieweg und Sohn.
- Loera, M., & Olguín, E. (2010). *Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades*. Red de Manejo Biotecnológico de Recursos: Veracruz.

Lopez, T. R. (2018). *Growth kinetics and lipid productivity of algae Tetradesmus wisconsinensis* S. Asunción: Departamento de Biotecnología. Universidad Nacional de Asunción.

Maldonado, C. (2011). *Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas scenedesmus dimorphus y chlorella sorokiniana*. Red de Repositorios Latinoamericanos. Obtenido de <http://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/2306>

Martínez, L. (2008). *Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas*. León: Universidad de Leon.

May Cua, E. R. (2015). *Cultivo de la microalga Scenedesmus sp. en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa*. CICY. Obtenido de <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/700>

Mercado, I., Álvarez, X., Eloiza, M., & Cruz, A. (2020). Enhancement of Biomass and Lipid Productivities of Scenedesmus sp. Cultivated in the Wastewater of the Dairy Industry. *MPDI*.

Miranda, A. S. (2021). *Productividad de la biomasa y producción de metabolitos secundarios en el co-cultivo de las microalgas dulceacuícolas Chlorella sorokiniana y Desmodesmus communis*. Heredia: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Ortiz, C., Rivadeneira Arias, V., Herrera Feijoo, R., & Andrade, J. C. (2023). *Biotecnología Ambiental, Aplicaciones y Tendencias*. Santo Domingo: Editorial AEA.

- Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., . . . Hattori, M. (2016). *eciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga Parachlorella kessleri*. Scientific Reports.
- Otero, J., Bode, A., & Álvarez, X. (2020). *Phytoplankton Diversity Effect on Ecosystem Functioning in a Coastal Upwelling System*. Vigo: Instituto de Investigaciones Marinas.
- Packer, A., Li, Y., Andersen, T., Hu, Q., Kuang, Y., & Sommerfeld, M. (2011). *Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: a mathematical model*. Bioresour Technol. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.029
- Parakh, S., Tian, Z., & Zhi, J. (2023). *From Microalgae to Bioenergy: Recent Advances in Biochemical Conversion Processes*. Singapore: MPDI.
- Park, J., Jin, F., Lim, R., Park, Y., & Lee, K. (2010). *Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga Scenedesmus sp.* Bioresource Technol. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.142
- Pillco, B., Salazar, E., & Cedeño, S. (2020). *Cleaner production as a preventive environmental strategy In the cocoa paste production process. A case in the Ecuadorian Amazon*. Morona Santiago: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Pudaite, J. (2015). Effects of the absence of nitrogen and phosphorus on the growth rate and total chlorophyll content of a freshwater microalgae Scenedesmus sp. *Science Vision*.

- QUEVEDO, C., MORALES, S., & ACOSTA, A. (2008). Scenedesmus sp  
GROWTH IN DIFFERENT CULTURE mediums FOR MICROALGAL  
PROTEIN PRODUCTION. *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICA*.
- Rey, T. (2021). *Evaluación del Efecto de la Aireación y el Fotoperiodo para la  
Obtención de Biomasa a Partir de la Microalga Chlorella vulgaris*. .  
Bucaramanga: Microbiología Industria.
- Rojo, J. L. (2018). *Producción de triacilglicéridos a partir de cepas de  
microalgas marinas en condiciones nutricionales limitantes*. CICY.  
Obtenido de <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1435>
- Sanchez, A. (2022). EFECTO DE DIFERENTES FERTILIZANTES  
COMERCIALES EN EL CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE  
NITRÓGENO DE DOS ESPECIES DE MICROALGAS. *Editorial  
EAFIT*.
- Sánchez, Y., Tobío, I., Romero, J., Díaz, Y., Melo, E., & Piloto, R. (2019).  
Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción  
de biomasa a partir de la microalga Chlorella vulgaris. *Afinidad. Journal  
of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*. Obtenido de  
<https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/353445>.
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M., Nawaz, S., . . . Mehmood, M.  
(2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production,

pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation. *Science of the Total Environment*.

Sun, X., Ren, L., & Zhao, Q. (2018). *Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation*.

Biotechnol Biofuels. doi:10.1186/s13068-018-1275-9

Touloupakis, E. (2023). *Growth and photosynthetic performance of Nostoc linckia (formerly N. calcicola) cells grown in BG11 and BG110 media*. *Photochem Photobiol Sci* 22. doi:https://doi.org/10.1007/s43630-022-00353-6

Photobiol Sci 22. doi:https://doi.org/10.1007/s43630-022-00353-6

Trainor, F. (2006). Reproduction in Scenedesmus. *Ecology and Evolutionary*.

Udayan, A., Pandey, A., & Sirohi, R. (2021). *Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals*. Korea:

NCBI.

Uslu, L., Işık, O., Barış, Y., & Sayın, S. (2022). *Effects of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and lipid accumulation of*

*microalgae Scenedesmus obliquus*. *Marine Science and Technology*

Bulletin. doi:doi.org/10.33714/masteb.1100624

Vega, B., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y Herramientas Analíticas En La*

*Evaluación de La Biomasa*. Ciudad de Mexico: Centro de investigaciones

biologicas del noroeste S.C.

- Vélez, R. P. (2016). *Crecimiento de las microalgas Chaetoceros gracilis e Isochrysis galbana con fertilizantes agrícolas, en laboratorio*. Revista La Técnica. doi:10.33936/la\_tecnica.v0i16.535
- Xin, L., Hong, H., Ke, G., & Ying, S. (2010). *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* Beijing : Bioresource Technology.
- Yaakob, A., Radin, M., Al-Gheethi , A., Ravishankar , G., & Rao , R. (2021). *Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview*.
- Yu, H., Kim, J., Rhee, C., Shin, J., Gu , S., & Lee, C. (2022). *Effects of Different pH Control Strategies on Microalgae Cultivation and Nutrient Removal from Anaerobic Digestion Effluent*. Microorganisms 10. doi:doi.org/10.3390/microorganisms10020357
- Zambrano, E., Peña, S., Correa, W., & Baquerizo, J. (2022). *Sistemas aplicados al cambio de matriz productiva de combustibles fósiles por Biocombustibles en el Ecuador*. Guayaquil: Revista Ibérica de Sistemas e Tecnologias de Informação.
- Zubcoff, J. (2021). *ANOVA multifactorial paso a paso*. Alicante: Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada.

## ANEXOS

**Anexo 1.** *Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio control NPK 20-19-19.*

<b>Medio de cultivo: NPK 20-19-19</b>									
<i>Días</i>	<i>Replica #1 Promedio</i>	<i>Replica #2 Promedio</i>	<i>Replica #3 Promedio</i>	<i>Promedio de células</i>	<i>Replica #1 Total</i>	<i>Replica #2 Total</i>	<i>Replica #3 Total</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Desviacion estandar</i>
1	26	25	24	25	2,60E+05	2,50E+05	2,40E+05	<b>2,50E+05</b>	1,00E+04
2	26	24	25	25	2,60E+05	2,40E+05	2,50E+05	<b>2,50E+05</b>	1,00E+04
3	25	26	24	25	2,50E+05	2,60E+05	2,40E+05	<b>2,50E+05</b>	1,00E+04
4	26	27	31	28	2,60E+05	2,70E+05	3,10E+05	<b>2,80E+05</b>	2,65E+04
5	28	32	33	31	2,80E+05	3,20E+05	3,30E+05	<b>3,10E+05</b>	2,65E+04
6	35	36	40	37	3,50E+05	3,60E+05	4,00E+05	<b>3,70E+05</b>	2,65E+04
7	39	40	47	42	3,90E+05	4,00E+05	4,70E+05	<b>4,20E+05</b>	4,36E+04
8	44	46	51	47	4,40E+05	4,60E+05	5,10E+05	<b>4,70E+05</b>	3,61E+04
9	47	51	55	51	4,70E+05	5,10E+05	5,50E+05	<b>5,10E+05</b>	4,00E+04
10	52	57	59	56	5,20E+05	5,70E+05	5,90E+05	<b>5,60E+05</b>	3,61E+04
11	56	60	61	59	5,60E+05	6,00E+05	6,10E+05	<b>5,90E+05</b>	2,65E+04
12	61	63	65	63	6,10E+05	6,30E+05	6,50E+05	<b>6,30E+05</b>	2,00E+04
13	66	66	69	67	6,60E+05	6,60E+05	6,90E+05	<b>6,70E+05</b>	1,73E+04
14	69	69	72	70	6,90E+05	6,90E+05	7,20E+05	<b>7,00E+05</b>	1,73E+04
15	73	74	75	74	7,30E+05	7,40E+05	7,50E+05	<b>7,40E+05</b>	1,00E+04
16	78	80	79	79	7,80E+05	8,00E+05	7,90E+05	<b>7,90E+05</b>	1,00E+04
17	83	86	83	84	8,30E+05	8,60E+05	8,30E+05	<b>8,40E+05</b>	1,73E+04
18	87	92	88	89	8,70E+05	9,20E+05	8,80E+05	<b>8,90E+05</b>	2,65E+04
19	90	98	91	93	9,00E+05	9,80E+05	9,10E+05	<b>9,30E+05</b>	4,36E+04
20	92	99	94	95	9,20E+05	9,90E+05	9,40E+05	<b>9,50E+05</b>	3,61E+04
21	93	98	94	95	9,30E+05	9,80E+05	9,40E+05	<b>9,50E+05</b>	2,65E+04
22	94	98	93	95	9,40E+05	9,80E+05	9,30E+05	<b>9,50E+05</b>	2,65E+04
23	96	99	93	96	9,60E+05	9,90E+05	9,30E+05	<b>9,60E+05</b>	3,00E+04
24	97	100	94	97	9,70E+05	1,00E+06	9,40E+05	<b>9,70E+05</b>	3,00E+04
25	98	99	94	97	9,80E+05	9,90E+05	9,40E+05	<b>9,70E+05</b>	2,65E+04

**Anexo 2. Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio experimental T1 NPK 30-10-10.**

<b>Medio de cultivo: NPK 30-10-10</b>									
<i>Días</i>	<i>Replica #1 Promedio</i>	<i>Replica #2 Promedio</i>	<i>Replica #3 Promedio</i>	<i>Promedio de células</i>	<i>Replica #1 Total</i>	<i>Replica #2 Total</i>	<i>Replica #3 Total</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Desviacion estandar</i>
1	24	25	26	25	2,40E+05	2,50E+05	2,60E+05	<b>2,50E+05</b>	1,00E+04
2	25	26	27	26	2,50E+05	2,60E+05	2,70E+05	<b>2,60E+05</b>	1,00E+04
3	25	26	27	26	2,50E+05	2,60E+05	2,70E+05	<b>2,60E+05</b>	1,00E+04
4	27	28	32	29	2,70E+05	2,80E+05	3,20E+05	<b>2,90E+05</b>	2,65E+04
5	31	33	35	33	3,10E+05	3,30E+05	3,50E+05	<b>3,30E+05</b>	2,00E+04
6	37	37	40	38	3,70E+05	3,70E+05	4,00E+05	<b>3,80E+05</b>	1,73E+04
7	42	45	48	45	4,20E+05	4,50E+05	4,80E+05	<b>4,50E+05</b>	3,00E+04
8	50	50	53	51	5,00E+05	5,00E+05	5,30E+05	<b>5,10E+05</b>	1,73E+04
9	56	55	57	56	5,60E+05	5,50E+05	5,70E+05	<b>5,60E+05</b>	1,00E+04
10	61	62	63	62	6,10E+05	6,20E+05	6,30E+05	<b>6,20E+05</b>	1,00E+04
11	67	68	69	68	6,70E+05	6,80E+05	6,90E+05	<b>6,80E+05</b>	1,00E+04
12	74	73	72	73	7,40E+05	7,30E+05	7,20E+05	<b>7,30E+05</b>	1,00E+04
13	77	78	79	78	7,70E+05	7,80E+05	7,90E+05	<b>7,80E+05</b>	1,00E+04
14	81	83	82	82	8,10E+05	8,30E+05	8,20E+05	<b>8,20E+05</b>	1,00E+04
15	86	89	86	87	8,60E+05	8,90E+05	8,60E+05	<b>8,70E+05</b>	1,73E+04
16	88	93	95	92	8,80E+05	9,30E+05	9,50E+05	<b>9,20E+05</b>	3,61E+04
17	94	96	98	96	9,40E+05	9,60E+05	9,80E+05	<b>9,60E+05</b>	2,00E+04
18	100	105	104	103	1,00E+06	1,05E+06	1,04E+06	<b>1,03E+06</b>	2,65E+04
19	103	110	108	107	1,03E+06	1,10E+06	1,08E+06	<b>1,07E+06</b>	3,61E+04
20	108	111	108	109	1,08E+06	1,11E+06	1,08E+06	<b>1,09E+06</b>	1,73E+04
21	109	111	110	110	1,09E+06	1,11E+06	1,10E+06	<b>1,10E+06</b>	1,00E+04
22	112	114	113	113	1,12E+06	1,14E+06	1,13E+06	<b>1,13E+06</b>	1,00E+04
23	112	114	113	113	1,12E+06	1,14E+06	1,13E+06	<b>1,13E+06</b>	1,00E+04
24	114	116	115	115	1,14E+06	1,16E+06	1,15E+06	<b>1,15E+06</b>	1,00E+04
25	114	115	116	115	1,14E+06	1,15E+06	1,16E+06	<b>1,15E+06</b>	1,00E+04

**Anexo 3. Conteo celular diario, concentración celular y desviación estándar del medio experimental T2 NPK 10-40-10.**

<b>Medio de cultivo: NPK 10-40-10</b>									
<i>Días</i>	<i>Replica #1 Promedio</i>	<i>Replica #2 Promedio</i>	<i>Replica #3 Promedio</i>	<i>Promedio de células</i>	<i>Replica #1 Total</i>	<i>Replica #2 Total</i>	<i>Replica #3 Total</i>	<i>Concentración Celular</i>	<i>Desviacion estandar</i>
1	25	24	26	25	2,50E+05	2,40E+05	2,60E+05	<b>2,50E+05</b>	1,00E+04
2	25	26	27	26	2,50E+05	2,60E+05	2,70E+05	<b>2,60E+05</b>	1,00E+04
3	25	26	27	26	2,50E+05	2,60E+05	2,70E+05	<b>2,60E+05</b>	1,00E+04
4	27	28	32	29	2,70E+05	2,80E+05	3,20E+05	<b>2,90E+05</b>	2,65E+04
5	32	32	35	33	3,20E+05	3,20E+05	3,50E+05	<b>3,30E+05</b>	1,73E+04
6	36	35	40	37	3,60E+05	3,50E+05	4,00E+05	<b>3,70E+05</b>	2,65E+04
7	41	40	42	41	4,10E+05	4,00E+05	4,20E+05	<b>4,10E+05</b>	1,00E+04
8	47	48	46	47	4,70E+05	4,80E+05	4,60E+05	<b>4,70E+05</b>	1,00E+04
9	54	55	50	53	5,40E+05	5,50E+05	5,00E+05	<b>5,30E+05</b>	2,65E+04
10	59	60	52	57	5,90E+05	6,00E+05	5,20E+05	<b>5,70E+05</b>	4,36E+04
11	68	66	64	66	6,80E+05	6,60E+05	6,40E+05	<b>6,60E+05</b>	2,00E+04
12	70	68	72	70	7,00E+05	6,80E+05	7,20E+05	<b>7,00E+05</b>	2,00E+04
13	73	71	78	74	7,30E+05	7,10E+05	7,80E+05	<b>7,40E+05</b>	3,61E+04
14	78	76	80	78	7,80E+05	7,60E+05	8,00E+05	<b>7,80E+05</b>	2,00E+04
15	81	84	84	83	8,10E+05	8,40E+05	8,40E+05	<b>8,30E+05</b>	1,73E+04
16	84	89	88	87	8,40E+05	8,90E+05	8,80E+05	<b>8,70E+05</b>	2,65E+04
17	90	93	93	92	9,00E+05	9,30E+05	9,30E+05	<b>9,20E+05</b>	1,73E+04
18	95	97	96	96	9,50E+05	9,70E+05	9,60E+05	<b>9,60E+05</b>	1,00E+04
19	100	101	99	100	1,00E+06	1,01E+06	9,90E+05	<b>1,00E+06</b>	1,00E+04
20	101	103	102	102	1,01E+06	1,03E+06	1,02E+06	<b>1,02E+06</b>	1,00E+04
21	101	105	103	103	1,01E+06	1,05E+06	1,03E+06	<b>1,03E+06</b>	2,00E+04
22	102	107	103	104	1,02E+06	1,07E+06	1,03E+06	<b>1,04E+06</b>	2,65E+04
23	103	107	105	105	1,03E+06	1,07E+06	1,05E+06	<b>1,05E+06</b>	2,00E+04
24	105	107	106	106	1,05E+06	1,07E+06	1,06E+06	<b>1,06E+06</b>	1,00E+04
25	105	107	106	106	1,05E+06	1,07E+06	1,06E+06	<b>1,06E+06</b>	1,00E+04

**Anexo 4.** *Obtención y productividad de biomasa del medio control NPK 20-19-19.*

<b>Medio de cultivo: NPK 20-19-19</b>							
Días	Concentración Celular (cel/ml)	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)	Días	Concentración Celular	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)
1	2,50E+05	0,31	<b>0,16</b>	14	7,00E+05	0,88	<b>0,44</b>
2	2,50E+05	0,31	<b>0,16</b>	15	7,40E+05	0,93	<b>0,46</b>
3	2,50E+05	0,31	<b>0,16</b>	16	7,90E+05	0,99	<b>0,49</b>
4	2,80E+05	0,35	<b>0,18</b>	17	8,40E+05	1,05	<b>0,53</b>
5	3,10E+05	0,39	<b>0,19</b>	18	8,90E+05	1,12	<b>0,56</b>
6	3,70E+05	0,46	<b>0,23</b>	19	9,30E+05	1,17	<b>0,58</b>
7	4,20E+05	0,53	<b>0,26</b>	20	9,50E+05	1,19	<b>0,60</b>
8	4,70E+05	0,59	<b>0,29</b>	21	9,50E+05	1,19	<b>0,60</b>
9	5,10E+05	0,64	<b>0,32</b>	22	9,50E+05	1,19	<b>0,60</b>
10	5,60E+05	0,70	<b>0,35</b>	23	9,60E+05	1,20	<b>0,60</b>
11	5,90E+05	0,74	<b>0,37</b>	24	9,70E+05	1,22	<b>0,61</b>
12	6,30E+05	0,79	<b>0,39</b>	25	9,70E+05	1,22	<b>0,61</b>
13	6,70E+05	0,84	<b>0,42</b>				

**Anexo 5. Obtención y productividad de biomasa del medio experimental T1 NPK 30-10-10.**

<b>Medio de cultivo: NPK 30-10-10</b>							
Días	Concentración Celular (cel/ml)	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)	Días	Concentración Celular	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)
1	2,50E+05	0,35	<b>0,18</b>	14	8,20E+05	1,16	<b>0,58</b>
2	2,60E+05	0,37	<b>0,18</b>	15	8,70E+05	1,23	<b>0,61</b>
3	2,60E+05	0,37	<b>0,18</b>	16	9,20E+05	1,30	<b>0,65</b>
4	2,90E+05	0,41	<b>0,20</b>	17	9,60E+05	1,35	<b>0,68</b>
5	3,30E+05	0,46	<b>0,23</b>	18	1,03E+06	1,45	<b>0,73</b>
6	3,80E+05	0,54	<b>0,27</b>	19	1,07E+06	1,51	<b>0,75</b>
7	4,50E+05	0,63	<b>0,32</b>	20	1,09E+06	1,54	<b>0,77</b>
8	5,10E+05	0,72	<b>0,36</b>	21	1,10E+06	1,55	<b>0,77</b>
9	5,60E+05	0,79	<b>0,39</b>	22	1,13E+06	1,59	<b>0,80</b>
10	6,20E+05	0,87	<b>0,44</b>	23	1,13E+06	1,59	<b>0,80</b>
11	6,80E+05	0,96	<b>0,48</b>	24	1,15E+06	1,62	<b>0,81</b>
12	7,30E+05	1,03	<b>0,51</b>	25	1,15E+06	1,62	<b>0,81</b>
13	7,80E+05	1,10	<b>0,55</b>				

**Anexo 6. Obtención y productividad de biomasa del medio experimental T2 NPK 10-40-10.**

<b>Medio de cultivo: NPK 10-40-10</b>							
Días	Concentración Celular (cel/ml)	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)	Días	Concentración Celular	Biomasa seca (gr)	Productividad de biomasa (gr/L)
1	2,50E+05	0,34	<b>0,17</b>	14	7,80E+05	1,07	<b>0,54</b>
2	2,50E+05	0,34	<b>0,17</b>	15	8,30E+05	1,14	<b>0,57</b>
3	2,60E+05	0,36	<b>0,18</b>	16	8,70E+05	1,20	<b>0,60</b>
4	2,90E+05	0,40	<b>0,20</b>	17	9,20E+05	1,27	<b>0,63</b>
5	3,10E+05	0,43	<b>0,21</b>	18	9,60E+05	1,32	<b>0,66</b>
6	3,70E+05	0,51	<b>0,25</b>	19	1,00E+06	1,38	<b>0,69</b>
7	4,10E+05	0,56	<b>0,28</b>	20	1,02E+06	1,40	<b>0,70</b>
8	4,70E+05	0,65	<b>0,32</b>	21	1,03E+06	1,42	<b>0,71</b>
9	5,30E+05	0,73	<b>0,37</b>	22	1,04E+06	1,43	<b>0,72</b>
10	5,70E+05	0,79	<b>0,39</b>	23	1,05E+06	1,45	<b>0,72</b>
11	6,60E+05	0,91	<b>0,45</b>	24	1,06E+06	1,46	<b>0,73</b>
12	7,00E+05	0,96	<b>0,48</b>	25	1,06E+06	1,46	<b>0,73</b>
13	7,40E+05	1,02	<b>0,51</b>				

**Anexo 7.** *Estadística descriptiva en la concentración celular del medio control NPK 20-19-19.*

### Estadísticas

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
				media	Desv.Est.					
C3	25	0	648000	53251	266255	250000	395000	670000	940000	970000

**Anexo 8.** *Estadística descriptiva en la concentración celular del medio experimental T1 NPK 30-10-10.*

### Estadísticas

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
				media	Desv.Est.					
C2	25	0	740800	65572	327858	250000	415000	780000	1080000	1150000

**Anexo 9.** *Estadística descriptiva en la concentración celular del medio experimental T2 NPK 10-40-10.*

### Estadísticas

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
				media	Desv.Est.					
C4	25	0	697200	60281	301407	250000	390000	740000	1010000	1060000

**Anexo 10. Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio control de NPK 20-19-19.**



**INFORME DE RESULTADOS**

INF.DIV-  
FQ.105871c

**DATOS DEL CLIENTE**

<b>Cliente:</b>	ANTHONY DELGADO
<b>Dirección:</b>	SANTA ELENA - MANGLARALTO - BARCELONA
<b>Teléfono:</b>	0939398200

**DATOS DE LA MUESTRA**

<b>Descripción:</b>	Biomasa algal N3 NPK 20-19-19		
<b>Lote:</b>	---	<b>Contenido declarado:</b>	100g
<b>Fecha de elaboración:</b>	2024/07/26	<b>Fecha de vencimiento:</b>	---
<b>Fecha de recepción:</b>	2024/10/09	<b>Hora de recepción:</b>	11:59:58
<b>Fecha de análisis:</b>	2024/10/10	<b>Fecha de emisión:</b>	2024/10/14
<b>Material de envase:</b>	---		
<b>Toma de muestra realizada por:</b>	El Cliente		
<b>Procedencia de los datos:</b>	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio.		

**CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

<b>Color:</b>	Característico	<b>Olor:</b>	Característico
<b>Estado:</b>	Sólido	<b>Conservación:</b>	Ambiente
<b>Temperatura de la muestra:</b>	Ambiente		

**RESULTADO FÍSICOQUÍMICO**

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
Lípidos (R1.R2.R3)	16.22	%	MFQ-02	AOAC 2003.06

Se prohíbe la reproducción del presente informe de resultados, excepto en su totalidad previa autorización escrita de Multianalytica S.A.

El Tiempo de Retención de las Muestras en el Laboratorio para ensayos Físico-Químicos e Instrumentales partir de la fecha de ingreso será de 15 días calendario para muestras perecibles, 30 días calendario para muestras medianamente perecibles y estables. Muestras para ensayos microbiológicos será de 5 días laborables para muestras perecibles, 10 días laborables para muestras medianamente perecibles y estables a partir de la fecha de análisis. Posterior a este tiempo, el laboratorio no podrá realizar reensayos para verificación de datos o valores no conformes por parte del cliente.

Toda la información relacionada con datos del cliente e ítems de ensayo (muestras) y que pueda afectar a la validez de los resultados, ha sido proporcionada y son responsabilidad exclusiva del cliente. El laboratorio se responsabiliza únicamente de los resultados emitidos los cuales corresponden a la muestra analizada y descrita en el presente documento.

El laboratorio declina toda responsabilidad, acerca de desvíos encontrados en las muestras entregadas por el cliente y que pueden afectar a la validez de los resultados, particular que es comunicado al cliente en caso de ser detectado por el laboratorio.

El tiempo de almacenamiento de los informes de resultados y toda la información técnica relacionada al mismo para dar trazabilidad será de 5 años a partir de su fecha de emisión. (Punto 8.4.2 CR GA01 Criterios Generales Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según NTE INEN- ISO/IEC 17025:2018).

Quím. Mercedes Parra  
Jefe División Físico-Químico  
Instrumental

JORGE ERAZO NS0-109 Y CRISTOBAL SANDOVAL - EL PINAR - QUITO - PICHINCHA - ECUADOR  
(02) 330 0247, 330 0674, 095 885 0928, 099 428 8140 / informes@multianalytica.com

**Anexo 11. Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio experimental T1 de NPK 30-10-10.**



**INFORME DE RESULTADOS**

INF.DIV-  
FQ.105871b

**DATOS DEL CLIENTE**

<b>Cliente:</b>	ANTHONY DELGADO
<b>Dirección:</b>	SANTA ELENA - MANGLARALTO - BARCELONA
<b>Teléfono:</b>	0939398209

**DATOS DE LA MUESTRA**

<b>Descripción:</b>	Biomasa algal #2 NPK 30-10-10		
<b>Lote:</b>	---	<b>Contenido declarado:</b>	100g
<b>Fecha de elaboración:</b>	2024/07/26	<b>Fecha de vencimiento:</b>	---
<b>Fecha de recepción:</b>	2024/10/09	<b>Hora de recepción:</b>	11:59:58
<b>Fecha de análisis:</b>	2024/10/10	<b>Fecha de emisión:</b>	2024/10/14
<b>Material de envase:</b>	---		
<b>Toma de muestra realizada por:</b>	El Cliente		
<b>Procedencia de los datos:</b>	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio.		

**CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

<b>Color:</b>	Característico	<b>Olor:</b>	Característico
<b>Estado:</b>	Sólido	<b>Conservación:</b>	Ambiente
<b>Temperatura de la muestra:</b>	Ambiente		

**RESULTADO FÍSICOQUÍMICO**

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
Lípidos (R1.R2.R3)	18.28	%	MFQ-02	AOAC 2003.06

Se prohíbe la reproducción del presente informe de resultados, excepto en su totalidad previa autorización escrita de Multianalityca S.A.

El Tiempo de Retención de las Muestras en el Laboratorio para ensayos Físico-Químicos e Instrumentales partir de la fecha de ingreso será de 15 días calendario para muestras perecibles, 30 días calendario para muestras medianamente perecibles y estables. Muestras para ensayos microbiológicos será de 5 días laborables para muestras perecibles, 10 días laborables para muestras medianamente perecibles y estables a partir de la fecha de análisis. Posterior a este tiempo, el laboratorio no podrá realizar reensayos para verificación de datos o valores no conformes por parte del cliente.

Toda la información relacionada con datos del cliente e ítems de ensayo (muestras) y que pueda afectar a la validez de los resultados, ha sido proporcionada y son responsabilidad exclusiva del cliente. El laboratorio se responsabiliza únicamente de los resultados emitidos los cuales corresponden a la muestra analizada y descrita en el presente documento.

El laboratorio declina toda responsabilidad, acerca de desvíos encontrados en las muestras entregadas por el cliente y que pueden afectar a la validez de los resultados, particular que es comunicado al cliente en caso de ser detectado por el laboratorio.

El tiempo de almacenamiento de los Informes de resultados y toda la información técnica relacionada al mismo para dar trazabilidad será de 5 años a partir de su fecha de emisión. (Punto 8.4.2 CR GA01 Criterios Generales Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según NTE INEN- ISO/IEC 17025:2018).

**Quim. Mercedes Parra**  
**Jefe División Físico Químico**  
**Instrumental**

JORGE ERAZO NS0-109 Y CRISTOBAL SANDOVAL - EL PINAR - QUITO - PICHINCHA - ECUADOR  
(02) 330 0247, 330 0674, 095 885 0928, 099 428 8140 / informes@multianalityca.com

**Anexo 12. Informe de resultados para la extracción de lípidos en el medio experimental T2 de NPK 10-40-10.**



**INFORME DE RESULTADOS**

INF.DIV-  
EQJ05871a

**DATOS DEL CLIENTE**

Cliente:	ANTHONY DELGADO
Dirección:	SANTA ELENA - MANGLARALTO - BARCELONA
Teléfono:	0939398200

**DATOS DE LA MUESTRA**

Descripción:	Biomasa algal N1 NPK10-40-10		
Lote:	---	Contenido declarado:	100g
Fecha de elaboración:	2024/07/26	Fecha de vencimiento:	---
Fecha de recepción:	2024/10/09	Hora de recepción:	11:59:58
Fecha de análisis:	2024/10/10	Fecha de emisión:	2024/10/15
Material de envase:	---		
Toma de muestra realizada por:	El Cliente		
Procedencia de los datos:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio.		

**CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

Color:	Característico	Olor:	Característico
Estado:	Sólido	Conservación:	Ambiente
Temperatura de la muestra:	Ambiente		

**RESULTADO FÍSICOQUÍMICO**

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
Lípidos	21.30	%	MFQ-02	AOAC 2003.05/ Gravimetría, Soxhlet

Se prohíbe la reproducción del presente informe de resultados, excepto en su totalidad previa autorización escrita de Multianalityca S.A.

El Tiempo de Retención de las Muestras en el Laboratorio para ensayos Físico-Químicos e Instrumentales partir de la fecha de ingreso será de 15 días calendario para muestras perecibles, 30 días calendario para muestras medianamente perecibles y estables. Muestras para ensayos microbiológicos será de 5 días laborables para muestras perecibles, 10 días laborables para muestras medianamente perecibles y estables a partir de la fecha de análisis. Posterior a este tiempo, el laboratorio no podrá realizar reensayos para verificación de datos o valores no conformes por parte del cliente.

Toda la información relacionada con datos del cliente e ítems de ensayo (muestras) y que pueda afectar a la validez de los resultados, ha sido proporcionada y son responsabilidad exclusiva del cliente. El laboratorio se responsabiliza únicamente de los resultados emitidos los cuales corresponden a la muestra analizada y descrita en el presente documento.

El laboratorio declina toda responsabilidad, acerca de desvíos encontrados en las muestras entregadas por el cliente y que pueden afectar a la validez de los resultados, particular que es comunicado al cliente en caso de ser detectado por el laboratorio.

El tiempo de almacenamiento de los informes de resultados y toda la información técnica relacionada al mismo para dar trazabilidad será de 5 años a partir de su fecha de emisión. (Punto 8.4.2 CR GA01 Criterios Generales Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según NTE INEN- ISO/IEC 17025:2018).

**Quim. Mercedes Parra**  
Jefe División Físico Químico  
Instrumental

JORGE ERAZO NS0-109 Y CRISTOBAL SANDOVAL - EL PINAR - QUITO - PICHINCHA - ECUADOR  
(02) 330 0247, 330 0674, 095 885 0928, 099 428 8140 / Informes@multianalityca.com

**Anexo 13.** Prueba del análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05, para la extracción de lípidos.

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	3938,24	1969,12	473,35	0,000
Error	6	24,96	4,16		
Total	8	3963,20			

**Anexo 14.** Prueba HSD de Tukey entre los diferentes medios de cultivo con NPK.

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
NPK 10-40-10	3	213,00	A
NPK 30-10-10	3	181,800	B
NPK 20-19-19	3	162,200	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
NPK 30-10-10 - NPK 20-19-19	19,60	1,67	(14,49; 24,71)	11,77	0,000
NPK 10-40-10 - NPK 20-19-19	50,80	1,67	(45,69; 55,91)	30,50	0,000
NPK 10-40-10 - NPK 30-10-10	31,20	1,67	(26,09; 36,31)	18,73	0,000

Nivel de confianza individual = 97,80%

**Anexo 15.** *Esterilización de los materiales de cultivo a través de autoclave.*



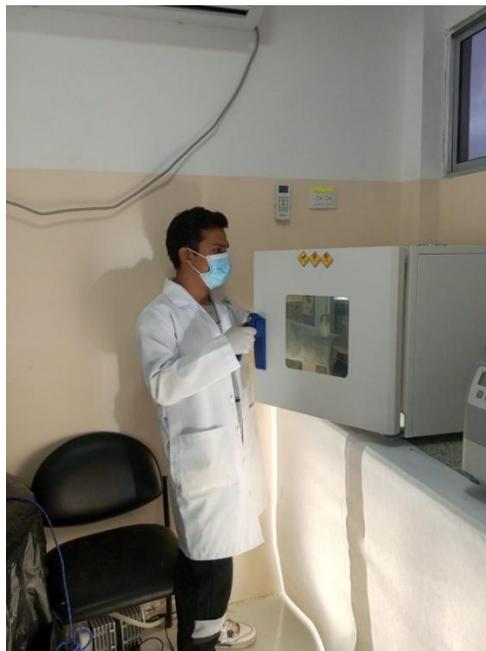
**Anexo 16.** *Fertilización de los medios de cultivos con Nitrofoska.*



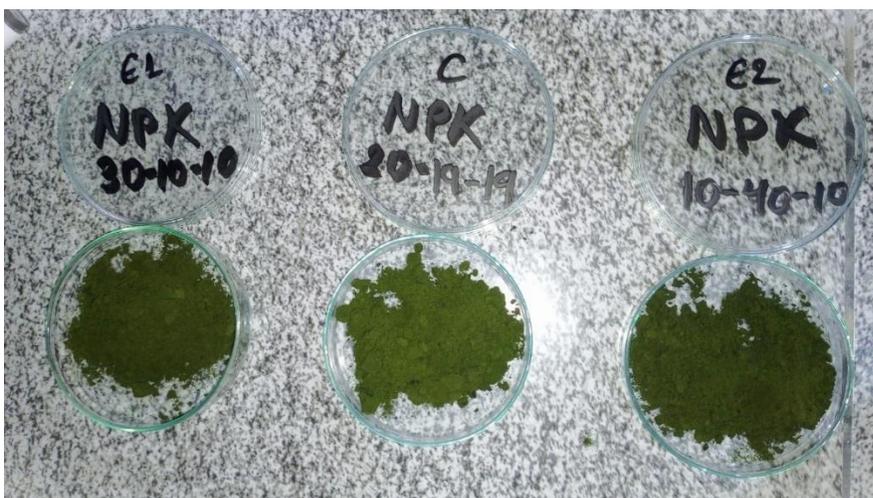
**Anexo 17.** *Recolección de biomasa, utilizando centrifugadora Hermel Z366.*



**Anexo 18.** *Secado de biomasa de Scenedesmus spp, utilizando la estufa.*



**Anexo 19.** *Obtención de biomasa seca en Scenedesmus spp en los diferentes medios de cultivos.*



**Anexo 20.** *Preparación de la muestra para la extracción de lípidos por el método Bligh & Dyer adaptado para microalga.*



**Anexo 20.** *Cuantificación de lípidos extraído de Scenedesmus spp por peso.*

