



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

**“COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE
CAROTENOS Y PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR
Dunaliella sp. SOMETIDA A TRES INTENSIDADES
LUMÍNICAS”.**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR

Previo a la obtención del título de: BIÓLOGO

AUTOR:

NATHALY JUANA ROCA GONZÁLEZ

DOCENTE TUTOR:

Blga. DENNIS TOMALÁ SOLANO, MSc.

CO-TUTOR:

Blga. JANNETH GALARZA TIPÁN, Ph.D

LA LIBERTAD - ECUADOR

2025

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

“COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE
CAROTENOS Y PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR
Dunaliella sp. SOMETIDA A TRES INTENSIDADES
LUMÍNICAS”.

TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

NATHALY JUANA ROCA GONZÁLEZ

DOCENTE TUTOR:

Blga. DENNIS TOMALÁ SOLANO, MSc.

CO-TUTOR:

Blga. JANNETH GALARZA TIPÁN, Ph.D

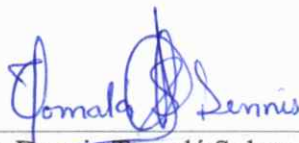
LA LIBERTAD - ECUADOR

2025

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, **“COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOS Y PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR *Dunaliella sp.* SOMETIDA A TRES INTENSIDADES LUMÍNICAS”**, elaborado por **ROCA GONZÁLEZ NATHALY JUANA**, 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 Bióloga, 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 apta para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



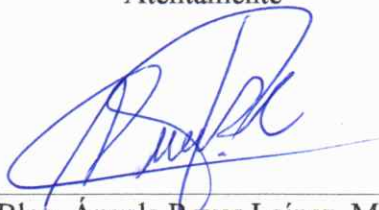
Blga. Dennis Tomalá Solano, MSc.
DOCENTE TUTOR

C.I. 0922584982

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular, **“COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOS Y PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR *Dunaliella sp.* SOMETIDA A TRES INTENSIDADES LUMÍNICAS”**, elaborado por **ROCA GONZÁLEZ NATHALY JUANA**, 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



Blga. Ángela Reyes Laínez, Mgt.
DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0913401014

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza durante toda mi etapa académica, por brindarme de su sabiduría para enfrentar cada desafío en el camino y ser mi refugio en momentos difíciles.

A mis padres, Pascual Roca y Fátima González, por ser mi mayor fuente de inspiración y pilares fundamentales durante toda mi vida, por enseñarme a esforzarme por lo que quiero y nunca rendirme ante los desafíos. Gracias por su amor incondicional, por cada palabra de aliento, por cada regaño, por cada sacrificio, sin duda ustedes han hecho que transitar este camino se mucho más fácil.

A mi querido hermano Danilo, mi compañero de vida y travesuras, gracias por estar siempre presente, por ese apoyo constante, por brindarme ayuda cuando la he necesitado y por las risas que muchas veces hicieron la carga menos pesada.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, autoridades y docentes de la Facultad de Ciencias del Mar por brindarme las herramientas necesarias para formarme profesionalmente.

A la Dra. Janeth Galarza Tipán, por guiarme y compartir conmigo sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo de investigación, agradezco su paciencia, cada una de sus observaciones y por confiar en mis capacidades para el desarrollo de este trabajo.

A la Blga. Dennis Tomalá, por ser mi tutora de tesis, por su apoyo, orientación y disposición durante el desarrollo de esta, gracias por sus valiosos consejos que ayudaron a fortalecer mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su colaboración y los consejos brindados durante el desarrollo de este trabajo.

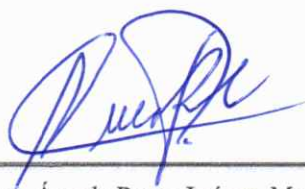
TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Roca González Nathaly Juana** 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: 09 de julio 2025



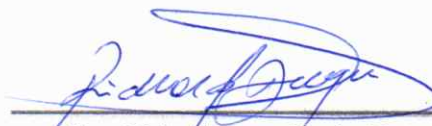
Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.
DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



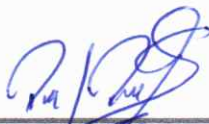
Blga. Ángela Reyes Laínez, Mgt.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blga. Dennis Tomalá Solano, MSc.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lic. Pascual Roca Silvestre, MSc.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

Declaración expresa

Yo, Nathaly Juana Roca González, declaro que los datos, ideas y análisis de resultados expuestos en este trabajo de integración curricular pertenecen exclusivamente a los autores y el patrimonio intelectual de los mismos, a la Universidad Península de Santa Elena.

Nathaly Roca G.

Nathaly Roca González

Estudiante

C.I. 2450611377

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
4. JUSTIFICACIÓN.....	8
5. OBJETIVOS	10
5.1 Objetivo general.....	10
5.2 Objetivos específicos.....	10
6. HIPÓTESIS.....	10
6.1 Hipótesis alterna (H1):.....	10
7. MARCO TEÓRICO.....	11
7.1 Importancia de las microalgas.....	11
7.3 Taxonomía del género <i>Dunaliella</i>	13
7.4 Morfología en fase vegetativa	14
7.5 Morfología en fase de estrés.....	14
7.6 Luz como factor ambiental en el cultivo de microalgas	15
7.6.1 Importancia de la luz en la fotosíntesis.....	15
7.6.2 Efecto de la intensidad luminosa en el crecimiento microalgal.....	16
7.7 Producción de proteínas en microalgas	17
7.8 Producción de carotenos en microalgas.....	19
7.9 Parámetros de estrés	20

7.9.1	Temperatura.....	20
7.9.2	Salinidad.....	21
7.9.3	Luz	22
7.9.4	Nutrientes	23
7.9.5	pH.....	24
7.10	Métodos de cuantificación de carotenoides y proteínas	25
7.10.1	Técnicas de extracción de carotenos y proteínas	25
7.10.2	Métodos espectrofométricos para cuantificación de carotenos y proteínas	26
8.	METODOLOGÍA.....	27
8.1	Área de estudio.....	27
8.2	Tipo de investigación	27
8.3	Medio de cultivo Guillar F/2.....	28
8.4	Cultivo en medio sólido	29
8.5	Cultivo en medio líquido	29
8.6	Parámetros de crecimiento	31
8.6.1	Densidad celular	31
8.6.2	Tasa de crecimiento	31
8.6.3	Productividad de la biomasa	32
8.7	Fase estrés lumínico en <i>Dunaliella sp.</i>	33
8.7.1	Conversión de lux a $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones	33

8.7.2	Inducción a estrés	34
8.8	Cuantificación de carotenos.....	35
8.9	Cuantificación de proteínas	37
8.10	Análisis estadísticos	39
9.	RESULTADOS	40
9.1	Densidad celular	40
9.2	Tasa de crecimiento celular.....	41
9.3	Productividad de biomasa.....	41
9.4	Determinación de compuestos bioquímicos	43
9.4.1	Clorofila <i>a</i>	43
9.4.2	Clorofila <i>b</i>	44
9.4.3	Carotenos totales.....	46
9.4.4	Proteínas	48
9.5	Evaluación de compuestos bioquímicos.....	50
9.5.1	Análisis comparativo de la fase vegetativa y de estrés	50
9.5.2	Análisis comparativo de la fase vegetativa y el grupo control.....	53
9.5.3	Análisis comparativo de los efectos de la luz en la concentración de carotenos, proteínas y productividad.....	54
10.	DISCUSIÓN	57
11.	CONCLUSIONES	63
12.	RECOMENDACIONES	65

13. BIBLIOGRAFÍA	66
14. ANEXOS	81

INDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. <i>Diseño experimental de la fase de estrés para Dunaliella sp.</i>	34
Figura 2. <i>Curva de crecimiento de Dunaliella sp.</i>	41
Figura 3. <i>Influencia de la luz en la productividad de biomasa de Dunaliella sp.</i>	42
Figura 4. <i>Concentraciones de clorofila a en Dunaliella sp., según las diferentes intensidades lumínicas</i>	44
Figura 5. <i>Concentraciones de clorofila b en Dunaliella sp., según las diferentes intensidades lumínicas</i>	46
Figura 6. <i>Concentraciones de carotenos en Dunaliella sp., en diferentes intensidades lumínicas</i>	48
Figura 7. <i>Concentraciones de proteínas en Dunaliella sp., en diferentes intensidades lumínicas</i>	49
Figura 8. <i>Concentración de compuestos bioquímicos en la fase vegetativa y de estrés</i>	52
Figura 9. <i>Concentración de compuestos bioquímicos en la fase vegetativa y el grupo control</i>	54
Figura 10. <i>Relación de la productividad con las concentraciones de carotenos y proteínas</i>	56

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. <i>Soluciones químicas del Medio de cultivo Guillard F/2</i>	28
Tabla 2. <i>Concentración de compuestos bioquímicos ($\mu\text{g/ml}$) en la fase vegetativa. SD = Desviación estándar</i>	52

ANEXOS

Anexo 1. <i>Curva de calibración (BSA) de 1.25-25 $\mu\text{g/ml}$</i>	81
Anexo 2. <i>Curva de calibración (BSA) de 10-60 $\mu\text{g/ml}$</i>	81
Anexo 3. <i>Replicas para la realizar la curva de crecimiento celular</i>	82
Anexo 4. <i>Cultivos en un volumen de 150 ml</i>	82
Anexo 5. <i>Escalamiento de cultivos a un volumen de 600 ml</i>	83
Anexo 6. <i>Escalamientos de cultivos a un volumen de 3 L</i>	83
Anexo 7. <i>Control de parámetros físicos</i>	84
Anexo 8. <i>Inducción a estrés lumínico</i>	84
Anexo 9. <i>Células en fase vegetativa</i>	85
Anexo 10. <i>Células en fase de estrés</i>	85
Anexo 11. <i>Cosecha de biomasa de <i>Dunaliella sp.</i></i>	86

Anexo 12. <i>Colocación de acetona y realización de vortex para extracción de carotenos</i>	86
Anexo 13. <i>Reposo de las muestras en hielo y obtención del extracto de carotenos</i> ..	87
Anexo 14. <i>Cuantificación de carotenos por espectrofometría</i>	87
Anexo 15. <i>Inducción a la ruptura celular por temperatura y obtención del extracto de proteínas</i>	88
Anexo 16. <i>Cuantificación de proteínas por espectrofometría</i>	88
Anexo 17. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de densidad celular</i>	89
Anexo 18. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de productividad de biomasa en diferentes intensidades de luz</i>	89
Anexo 19. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de clorofila a en diferentes intensidades de luz</i>	90
Anexo 20. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de clorofila b en diferentes intensidades de luz</i>	90
Anexo 21. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de carotenos en diferentes intensidades de luz</i>	91
Anexo 22. <i>Prueba Kruskal-Wallis para análisis de proteínas en diferentes intensidades de luz</i>	91

GLOSARIO

Microalga: Microorganismo unicelular o colonial que habita en ambientes marinos, acuáticos o terrestres.

Carotenos: Metabolito secundario de color amarillo, anaranjado o rojo producidos por la microalga en condiciones estresantes.

Proteínas: Metabolito primario formada por aminoácidos producidas por microalgas en condiciones óptimas.

Estrés: Cambios en las condiciones ambientales que alteran el crecimiento celular de las microalgas.

Clorofila: Pigmento fotosintético presente en los cloroplastos de la célula.

Fotoinhibición: Exceso del nivel de luz causa daño al sistema fotosintético de la microalga reduciendo la capacidad de realizar la fotosíntesis

Productividad: Tasa de producción de biomasa o metabolitos por unidad de tiempo o superficie del área.

Lux: Unidad de mediada de la irradiancia, que indica la cantidad de luz que recibe la superficie.

$\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones: Unidad de mediada que, evalúa la cantidad de flujo de fotones que contribuyen a la fotosíntesis en un área determinada.

ABREVIATURAS

TV: tratamiento vegetativo

TC: tratamiento control

T1: tratamiento 1

T2: tratamiento 2

T3: tratamiento 3

R1: replica 1

R2: replica 2

R3: replica 3

μg: microgramo

cel: células

ml: mililitro

μMol: micromoles

g: gramos

μl: microlitro

L: litros

μ: tasa de crecimiento

mg: miligramo

N: nitrógeno

P: fósforo

M: molar

rpm: revoluciones por minuto

ln: logaritmo natural

°C: grados celcius

ppt: partes por mil

nm: nanometros

BSA: albúmina de suero bovino

1. RESUMEN

Dunaliella sp., es una de las microalgas más estudiadas en el campo biotecnológico, que al ser sometida a condiciones de estrés presentan un alto contenido de carotenos. Sin embargo, también acumula gran cantidad de proteínas. El objetivo del trabajo de investigación consistió en comparar la concentración de carotenos y proteínas en la microalga *Dunaliella sp.* bajo condiciones estresantes para maximizar la producción de estos compuestos. Las microalgas fueron mantenidas a estrés lumínico bajo tres intensidades de luz de 100, 150 y 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, con parámetros físicos-químicos constantes a 25 ± 2 °C, 35 ppt y 7.8 pH. Para la extracción de carotenos se utilizó acetona al 90%, y la cuantificación de proteínas se realizó mediante espectrofotometría, aplicando el método de Bradford con la utilización BSA para la curva estándar. Como resultados se obtuvo mayor productividad en el tratamiento 2 con 0.141 g/L/día, el contenido de clorofila *a* y *b* fue mayor en el tratamiento control con 115.61 y 73.69 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, para carotenos alcanzó una concentración de 49.84 $\mu\text{g/ml}$ y proteínas acumuló mayor concentración en el tratamiento vegetativo con 397.56 $\mu\text{g/ml}$. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento control, indicando que los rangos de luz utilizados para inducción de estrés no son favorables para la producción de estos compuestos.

Palabras clave: *Dunaliella sp.*, carotenos, proteínas, estrés.

ABSTRACT

Dunaliella sp. is one of the most studied microalgae in the biotechnological field. When subjected to stress conditions, it exhibits a high carotene content. However, it also accumulates large amounts of protein. The objective of this research was to compare the concentration of carotenes and proteins in the microalgae *Dunaliella sp.* under stressful conditions to maximize the production of these compounds. The microalgae were maintained under light stress at three light intensities of 100, 150, and 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ of photons, with constant physical-chemical parameters at 25 ± 2 °C, 35 ppt, and 7.8 pH. 90% acetone was used for carotene extraction, and protein quantification was performed spectrophotometrically, applying the Bradford method and using bovine serum albumin for the standard curve. The highest productivity was obtained in treatment 2 with 0.141 g/L/day. Chlorophyll a and b contents were higher in the control treatment with 115.61 and 73.69 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Likewise, carotenoids reached a concentration of 49.84 $\mu\text{g/ml}$, and protein concentrations were higher in the vegetative treatment with 397.56 $\mu\text{g/ml}$. Treatment 1 accumulated similar carotenoid and protein concentrations, with 41.97 and 46.95 $\mu\text{g/ml}$, respectively, making it the optimal treatment for carotenoid and protein production in *Dunaliella sp.*

Keywords: *Dunaliella sp.*, carotenoids, proteins, stress.

2. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo de organismos microscópicos autótrofos que se encuentran en entornos marítimos, acuáticos y terrestres, capaces de generar compuestos orgánicos a través del proceso de fotosíntesis (Dolganyuk et al., 2020). Es por esto, que en los últimos años han tomado un gran valor biotecnológico por su capacidad para producir una variedad de compuestos bioactivos como enzimas, pigmentos, lípidos, azúcares, vitaminas y esteroides, además que puede transformar el dióxido de carbono (CO₂) en productos como lípidos, carbohidratos, metabolitos y proteínas (Rahman, 2020).

Una de las especies de microalgas más utilizadas son las del género *Dunaliella*, de característica hipersalina verde, unicelular y biflagelada, con una forma ovoide de tamaño de unos 5 a 25 µm de largo y 3 a 13 µm de ancho y se identifica por la falta de una pared celular rígida (Sui et al. 2019a). Los organismos de este género contienen entre 50 y 60% de proteína en células verdes en base al peso seco y alrededor de 30% para células rojas con un alto contenido de carotenoides (Fimbres et al., 2010). Ciertas especies de *Dunaliella* almacenan grandes cantidades de carotenoides particulares, incluyendo el β-caroteno y la zeaxantina, así como otros en menor concentración como la luteína, la astaxantina y el licopeno específicamente, como una reacción al estrés ambiental (Emeish & Al-Muhteseb, 2015; Jin & Polle, 2019).

Las condiciones ambientales que influyen en la producción de estos metabolitos son la temperatura, el pH, la luz, la salinidad y los nutrientes, por tanto, bajo determinadas condiciones, pueden aumentar la síntesis de determinadas moléculas y reducir o impedir la expresión de otras moléculas (Agudelo-Rivera, 2020; Wang et al., 2021).

El estudio realizado por Guevara et al. (2016) evaluó la influencia de la salinidad e irradiancia obteniendo como resultado que las concentraciones de proteínas y carotenos aumentaban al incrementar las condiciones de estrés. Por otro lado, en otro estudio de Sui et al. (2019b) los factores de estrés fueron la salinidad, pH y fase de crecimiento sobre la productividad proteica de *Dunaliella salina*, dando como resultado que la mayor productividad de proteína (43.5 mg/L/d) se logró con una salinidad de 2 M y un pH de 7.5 durante la fase exponencial, que superó a otras en un 16-97%, donde las salinidades probadas fueron 1-3 M y pH de 7.5 - 9.5. Por el contrario Serpa-Ibáñez et al. (2005) obtuvo como resultado que a salinidades superiores a 2.5 M se observó las concentraciones de proteínas fueron siempre menores a la concentración de carotenoides alcanzados a esa salinidad.

No obstante, varios de estos estudios tienen como condición de estrés el aumento de salinidad en el medio u otro parámetro, mas no se evalúa directamente la influencia de la luz en la microalga, aunque se conoce que las altas intensidades de luz promueven la formación de carotenoides pero se ha sugerido que pueden reducir

las concentraciones de proteínas debido al estrés oxidativo. Además, debido a su característica única de carotenogénesis la mayoría de las investigaciones realizadas se enfocan en la producción de carotenos en lugar de la producción de proteínas (Sui et al. 2019a). A nivel local, no se ha difundido suficiente información sobre las investigaciones en biotecnología con microalga *Dunaliella sp.* por lo que, al evaluar las concentraciones de estos dos compuestos bioquímicos, se busca una propuesta alternativa que maximice la producción tanto de carotenos como de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se utilizará el método de Bradford, en el cual se comparan las lecturas de absorbancias de las muestras con una curva estándar de proteínas de albúmina sérica bovina como referencia (Amorim et al., 2021), para la cuantificación de carotenos se realizará por espectrofotometría, se tomará 0.06 g de biomasa húmeda de *Dunaliella sp.* y se agrega 10 ml de acetona al 90% (Vega-Arredondo et al., 2017).

En base a lo anterior, este trabajo busca evaluar cómo la intensidad de la luz afecta la producción de proteínas en relación con los carotenoides en *Dunaliella sp.* al ser sometida a tres condiciones lumínicas diferentes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La microalga *Dunaliella sp.* es una especie que tiene una alta relevancia en el campo de la biotecnología, debido a su capacidad para producir valiosos compuestos bioactivos como carotenos, y un alto contenido de proteínas, esenciales para su metabolismo, sin embargo, aunque esta microalga, puede ser utilizada en una variedad de aplicaciones industriales, el enfoque en su cultivo sigue siendo limitado, debido a la falta de investigaciones sobre cómo optimizar su producción en condiciones controladas.

Habitualmente, se ha estudiado la *Dunaliella sp.* centrándose en la producción de carotenoides, pigmentos de gran valor comercial para ser implementados en dietas de camarón, dejando de lado su potencial para la producción de proteínas, lo cual podría ser igualmente valioso en industrias que buscan fuentes de proteínas sostenibles. Se conoce que para que *Dunaliella sp.* produzca más cantidad de carotenos se debe someter a condiciones de estrés, las cuales pueden ser, altas salinidades, temperatura, luz y deficiencia de nutrientes, debido a que estos pigmentos la ayudan a protegerse ante condiciones ambientales extremas, sin embargo, hay pocos trabajos que evalúan como estas condiciones estresantes afectan la producción de proteínas.

A intensidades de luz óptimas, las microalgas pueden crecer de manera eficiente, acumulando biomasa, lo que incluye un mayor contenido de proteínas, pero cuando

las microalgas se exponen a intensidades de luz muy altas, experimentan estrés lumínico, lo que puede conducir a una disminución en la producción de proteínas, ya que la energía y los precursores metabólicos se desvían hacia los mecanismos de defensa. No obstante, existen pocos estudios en microalgas que evalúen específicamente la influencia de intensidades de luz en la producción de proteínas, no así, con la salinidad que la mayoría de información científica revisada direcciona hacia este parámetro como condición de estrés.

En Ecuador, en la Península de Santa Elena, no se ha difundido suficiente información sobre las investigaciones en biotecnología con la microalga *Dunaliella sp.* En la Universidad Estatal Península de Santa Elena existen pocas investigaciones, además estas están enfocadas a la producción de carotenos más no en proteínas. Esto ha llevado a que no se reconozca el potencial de *Dunaliella sp.*, para el desarrollo industrial y biotecnológico local, limitando la inversión y el interés en su explotación comercial.

Dado el contexto, es importante realizar este estudio para evaluar como la intensidad de la luz afecta la producción simultánea de carotenos y proteínas, puesto que la *Dunaliella sp.* es una microalga con alto contenido proteico que en la actualidad no se aprovecha al máximo por la falta de información disponible sobre la producción de carotenos y proteínas en conjunto.

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio del efecto de la luz sobre producción de carotenoides y proteínas en el alga *Dunaliella sp.* es de gran importancia debido a que esta microalga es altamente valorada por su capacidad para producir carotenoides como el β -caroteno, que tienen propiedades antioxidantes y es precursor de vitamina A, por lo que abre posibilidades para su uso farmacéutico y en cosméticos, además de tener aplicaciones en la industria alimentaria. También produce proteínas que son esenciales para el crecimiento celular y que pueden ser utilizadas como suplementos dietéticos para peces, moluscos y crustáceos, dada su excelente digestibilidad por carecer de una pared celular rígida.

A medida que la demanda global de compuestos bioactivos continúa aumentando, es fundamental evaluar condiciones de estrés a través de la iluminación en *Dunaliella sp.* para maximizar la producción de proteínas y carotenoides juntos a la vez. Por lo que al evaluar los efectos de como la luz afecta a la productividad de estas moléculas, ayudará a mejorar los procesos de producción en un ambiente controlado, lo cual es imprescindible para garantizar la sostenibilidad y eficiencia de la biotecnología de las microalgas.

Adicionalmente, este conocimiento contribuirá a proponer una alternativa que maximice la producción de los metabolitos, tanto carotenos como proteínas, a través de del estrés bajo la intensidad de luz. Por lo tanto, la comparación de las

concentraciones de proteínas y carotenos permitirá comprender mejor el papel de la luz en la regulación del metabolismo de esta microalga y aportará valor para la optimización de su cultivo en condiciones controladas.

El hecho de que estos estudios sean escasos tanto en Ecuador como a nivel global aumenta la importancia de realizar esta investigación para obtener datos aplicables a cultivos comerciales y avanzar en el desarrollo tecnológico en el campo de la biotecnología.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar la producción de carotenos y proteínas en *Dunaliella sp.* sometida a tres intensidades de luz, determinando la influencia de estas condiciones en la concentración de estos compuestos bioquímicos.

5.2 Objetivos específicos

- Aplicar tres intensidades lumínicas a los cultivos de *Dunaliella sp.* para inducirla a estrés.
- Cuantificar la concentración de carotenos y proteínas producidas por *Dunaliella sp.* bajo condiciones de estrés por alta intensidad lumínica.
- Evaluar la concentración de carotenos y de proteínas producidas por *Dunaliella sp.* estresada.

6. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis alterna (H1):

La alta intensidad de luz ($200 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones) como parámetro de estrés provocará una disminución en la concentración tanto de carotenos como de proteínas en la microalga *Dunaliella sp.*

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Importancia de las microalgas

Las microalgas son microorganismos que pueden encontrarse en diferentes formas sea unicelulares, multicelulares, filamentosos o sifonáceo y se clasifican en eucariotas y procariotas (Balasubramaniam et al., 2021). Son la base de las cadenas tróficas acuáticas y pueden crecer en medios de agua dulce, salada, ambientes hipersalinos, suelos húmedos y rocas (Camacho et al., 2019). Presentan distintos tamaños, dependiendo de la especie, pueden medir desde pocos micrómetros hasta cientos de ellos, son organismos autótrofos fotosintéticos capaces de sintetizar compuestos complejos a partir de materiales sencillos que se encuentran en su medio ambiente. Se cree que existen entre 200000 y 800000 tipos de microalgas, donde aproximadamente 50000 han sido documentadas (Mobin et al., 2019).

Las microalgas viven en medios con condiciones ambientales cambiantes donde compiten por espacio y nutrientes, los que las ha llevado a desarrollar mecanismos de defensa como la producción de metabolitos secundarios para adaptarse a estos entornos. La producción de estos compuestos puede variar dependiendo de la especie de microalga y de las condiciones ambientales en las que se encuentra (Mobin et al., 2019). Varios de estos compuestos se han encontrado en forma de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados pigmentos, vitaminas, minerales y oligosacáridos (Camacho et al., 2019).

Actualmente, tienen una amplia gama de aplicaciones industriales que incluyen productos farmacéuticos, nutracéuticos, cosmeceúticos, biocombustibles, biofertilizantes, tratamientos de aguas residuales, alimentos y proteómica. (Balasubramaniam et al., 2021). Se ha estudiado también su uso como suplementos nutricionales en balaceados principalmente en la acuicultura, con el fin de fortalecer la respuesta inmune de los organismos, sin embargo, su implementación en la industria enfrenta complicaciones debido a los altos costos de producción asociados al procesamiento del producto (Camacho et al., 2019).

Una de las microalgas que ha despertado gran interés en la industria biotecnológica son las especies del género *Dunaliella*, debido a que son capaces de sobrevivir a altas salinidades, así como su rápido crecimiento y la producción de diversos metabolitos como el β -caroteno, lípidos, glicerol, vitaminas y proteínas. *D. salina* es una de las más utilizadas por su capacidad para acumular gran cantidad de β -caroteno y hasta el 25 % de su peso seco en lípidos, *D. bardawil* es cultivada principalmente para producir ácidos grasos y *D. tertiolecta* es utilizada por acumular lípidos, glicerol y almidón (Barbosa et al., 2023; Slocombe et al., 2015).

7.2 Características generales del género *Dunaliella*

Las células de fueron identificadas por Michel F. Dunal y el género *Dunaliella* fue descrito por primera vez por Teodoresco (1905), se han reportado 20 especies pertenecientes a este género, habitando medios de agua dulce, océanos e incluso

aguas ácidas como *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bioculata*, *Dunaliella acidophila*, *Dunaliella parva* y *Dunaliella media* (Silva et al., 2021).

Las células de estas microalgas pueden producir metabolitos como proteínas, ácidos grasos y sustancias químicas finas como xantofilas (zeaxantina, luteína, α - y β criptoxantina, violaxantina y equinenona) y carotenos (α -caroteno, β -caroteno all-trans, 9-cis β -caroteno, 15-cis β -caroteno y licopeno) (Silva et al., 2021).

7.3 Taxonomía del género *Dunaliella*

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Dunaliellaceae

Género: *Dunaliella* (Teodoresco, 1905)

7.4 Morfología en fase vegetativa

Las células pueden presentar diferentes formas ya sea elipsoides, ovoides o casi esféricas, piriformes o fusiformes, inclusive ser esféricas tras someterse a un choque osmótico y luego volver a su forma natural, su tamaño puede medir entre 5 a 25 μm de longitud y 3 a 13 μm de ancho (Barbosa et al., 2023; Borowitzka & Siva, 2007). Por lo general, son radialmente simétricas, bilaterales o ligeramente asimétricas y no presentan una pared celular rígida, pero están rodeadas por una cubierta delgada y elástica (Barbosa et al., 2023; Ben-Amotz & Avron, 1990).

Las células móviles durante su fase vegetativa son biflageladas, es decir presentan dos flagelos, los cuales están ubicados en la parte frontal de la célula, y su tamaño difiere entre las distintas especies, a menudo se puede notar una pequeña protrusión en la parte final del flagelo, sobre todo en las células más jóvenes. Tienen un solo cloroplasto que está ubicado en la parte posterior con forma de campana y presenta un pirenoide en la zona más baja a excepción de ciertas especies de agua dulce (Borowitzka & Siva, 2007). Generalmente, en esta fase el color suele ser de un verde intenso, la pared celular se encuentra apretada y el pirenoide es completamente visible (Borovkov et al., 2019).

7.5 Morfología en fase de estrés

En condiciones de estrés, por reducción o un aumento de la salinidad, las células entran en una fase de palmela, en la que las células pierden sus flagelos, por ende,

pierden su movilidad, su mancha ocular desaparece, suelen volverse más redondeadas y excretan una capa viscosa (Borowitzka & Siva, 2007).

En un estudio realizado por Borovkov et al., (2019) en *Dunaliella salina* la longitud de las células no varió durante el tiempo de estrés, su forma cambio a un tipo de esfera achatada, su coloración cambió a un naranja o rojo y algunas células desarrollaron estructuras que se asemejan a pseudópodos. En otro estudio realizado en *Dunaliella tertiolecta*, la mayoría de las células perdieron sus flagelos y se volvieron más redondas, se formó una capa de actina muy gruesa alrededor y aproximadamente el 66 % de las células no presentaban movimiento u oscilaban alrededor de un centro (Novosel et al., 2022).

7.6 Luz como factor ambiental en el cultivo de microalgas

7.6.1 Importancia de la luz en la fotosíntesis

La fotosíntesis es una reacción redox que se activa mediante la energía luminosa, en donde el dióxido de carbono y el agua se transforman en compuestos orgánicos y oxígeno. Se la describe en dos fases, la fase luminosa y la fase oscura, la primera fase necesita de energía lumínica, dado que la luz va a intervenir en la clorofila a y a través de una secuencia de reacciones, la energía se transforma en ATP y NADPH, después el agua se divide en este proceso, liberando oxígeno como un producto de la reacción (Sydney et al., 2018).

En la fase oscura, involucran el NADPH_2 y el ATP producidos en la fase luminosa de la fotosíntesis, el dióxido de carbono presente en la atmósfera o en el agua es capturado y transformado mediante la adición de hidrógeno en carbohidratos ($[\text{CHO}]_n$), proceso que recibe el nombre de fijación de carbono (Masojídek et al., 2021; Sydney et al., 2018). En las microalgas la cantidad de la luz influye directamente en el nivel de fotosíntesis, es decir, cuando la cantidad de luz es baja, un aumento en la intensidad lumínica resulta en un incremento casi lineal de la tasa de fotosíntesis, sin embargo, cuando la intensidad de luz llega a su punto más alto, aunque se incremente la luz no habrá un incremento en la tasa de fotosíntesis y por el contrario puede causar fotoinhibición lo que resultaría perjudicial (Maltsev et al., 2021).

7.6.2 Efecto de la intensidad luminosa en el crecimiento microalgal.

Las microalgas requieren la fotosíntesis para adquirir energía, es por esto, que la intensidad, la calidad de la luz y la duración del periodo de iluminación son factores importantes para el desarrollo de las microalgas. Por lo que, la exposición de microalgas a una luz excesiva puede dar lugar a daños fotooxidativos en el sistema fotosintético, así como a una reducción en la eficiencia y la tasa de fotosíntesis, lo que se conoce como fotoinhibición y, por otro lado, las intensidades de luz muy bajas limitan la tasa de crecimiento (Bialevich et al., 2022; Kwan et al., 2021).

La intensidad lumínica no afecta solo a la tasa de crecimiento, sino también en su composición bioquímica, ya que tiene una función reguladora en varios procesos biológicos. En estudios realizados se ha demostrado que, al aumentar la intensidad lumínica, la microalga produce una mayor acumulación de lípidos, además influye en la reestructuración de la composición de ácidos grasos. En investigaciones anteriores, se ha indicado que los ácidos grasos pueden influir en las características de las membranas que participan en la fotosíntesis y, por ende, en la adaptación bioquímica de las microalgas frente a alteraciones en las condiciones de luz (Maltsev et al., 2021).

Otro de los metabolitos que producen las microalgas al elevar la cantidad de luz son los carotenoides, estos cumplen una función importante en los procesos de fotosíntesis y están involucrados en los mecanismos de fotoprotección. Uno de los factores clave de fotoprotección radica en la habilidad de ciertas xantofilas para involucrarse en procesos luminosos reversibles, en los cuales la energía sobrante de las clorofilas se disipa como calor (Maltsev et al., 2021).

7.7 Producción de proteínas en microalgas

En los últimos años, se ha experimentado un aumento en el crecimiento poblacional y una mayor demanda en dietas ricas en proteínas y menos carbohidratos y grasas, por lo que, para hacer frente a la rápida transformación en el sector alimentario y la elevada necesidad de productos ricos en proteínas, la agricultura, la acuicultura y el

sector de alimentos han buscado alternativas para mejorar la producción de estos productos, tanto en su elaboración como en su transformación (Wang et al., 2021).

El cultivo de microalgas representa una opción prometedora para reducir el impacto de las actividades agroindustriales y al mismo tiempo producir alimentos y piensos que satisfagan la demanda de productos proteicos. Ciertas microalgas contienen un nivel alto de proteínas (doble) en comparación con las fuentes de proteínas tradicionales. La utilización de esta biomasa como un recurso proteico es fácil y ampliamente aceptado. Para la elaboración de productos las microalgas pasan por una serie de procesos que incluyen la producción, separación, aislamiento, cuantificación y posterior aplicación en alimentos y piensos (Amorim et al., 2021).

El porcentaje de proteínas crudas reportado en la biomasa de microalgas fluctúa entre el 30 y el 80% en peso. Entre las especies con alto contenido de proteínas se encuentran *Chlorella vulgaris*, 51-58 %; *Arthrospira (Spirulina) platensis*, 60-71 %; *Tetraselmis chui*, 31-46 %; *Nannochloropsis oceanica*, 35-44 %; *Dunaliella salina*, 50-80 %. Su utilización inmediata de la biomasa de microalgas como proteína unicelular presenta restricciones debido a su capacidad de digestión, siendo en este aspecto las especies del género *Dunaliella* ventajosas por carecer de una pared celular rígida.(Janssen et al., 2022).

7.8 Producción de carotenos en microalgas

Los carotenoides comprenden un extenso conjunto de isoprenoides lipofílicos, producidos por todos los seres vivos que realizan fotosíntesis, así como por ciertas bacterias y hongos que no llevan a cabo este proceso (Varela et al., 2015). Están formados por una cadena principal C40 que consiste en ocho moléculas de isopreno, el cual crea una estructura de polieno con enlaces dobles alternos y establece un sistema amplio de electrones- π (Grossman et al., 2004).

Los carotenos participan durante la fotosíntesis en la captación de luz y transferencia de energía, gran parte de estos se encuentran enlazados a proteínas integrales de membrana, vinculadas a los complejos que recogen luz (LHC), en los cuales absorben luz en un espectro más amplio y transfieren la energía a la clorofila, dando origen a los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis y además cumplen un rol fundamental en protección del aparato fotosintético contra el daño fotooxidativo (Li et al., 2009; Polívka & Frank, 2010).

Entre las microalgas más estudiadas se encuentran la *Dunaliella salina* que puede acumular carotenoides hasta un 14 % de su peso seco, entre los factores que intervienen en la producción de carotenos en esta microalga se encuentran principalmente la intensidad de luz y la salinidad (Varela et al., 2015). Al presente, se estudian estos pigmentos para la implementación en aditivos alimentarios, productos farmacéuticos y cosméticos, especialmente la astaxantina, el β -caroteno

y la luteína, y otros menos estudiados como la fucoxantina y la zeaxantina (Ren et al., 2021).

7.9 Parámetros de estrés

7.9.1 Temperatura

Uno de los parámetros más importantes para el crecimiento de microalgas y la acumulación de compuestos bioactivos es la temperatura, dado su influencia en las reacciones enzimáticas. En el caso de las microalgas mesófilas la temperatura adecuada para su crecimiento es de 20 °C a 25 °C rangos por debajo de 16 °C provocaría una reducción en su crecimiento y por el contrario temperaturas demasiado altas pueden causar la muerte (Bermejo et al., 2021).

En el estudio realizado por Sánchez et al. (2008) se demostró que al someter a altas temperaturas a microalgas como *Scenedesmus almeriensis* provocan un aumento en la producción de luteína. Sin embargo, al someter a *H. pluvialis* a temperaturas más bajas provoca una mayor acumulación de astaxantina y mayor crecimiento celular (Wan et al., 2014). En el caso de *Dunaliella viridis*, Arena et al. (2021) reportaron una mayor producción de lípidos (20.41 ± 2.63 %) en cultivos con altas temperatura que alcanzan los 34 °C, por otro lado, Elisabeth et al. (2021) rescata de varios autores que *Dunaliella* produce mayor contenido de β -caroteno y menor contenido de clorofila disminuyendo la temperatura por debajo de los 25 °C.

Por lo tanto, los parámetros óptimos de temperatura para estrés en microalgas pueden variar dependiendo de la especie debido a la sensibilidad localizada a los nutrientes, y las concentraciones óptimas de nutrientes para una cepa pueden inhibir el crecimiento de otras (Shi et al., 2020).

7.9.2 Salinidad

La salinidad es otro de los parámetros físicos que causan un estrés ambiental complicado de enfrentar para los organismos, las microalgas fotosintéticas unicelulares son particularmente susceptibles, ya que deben afrontar no solo el desajuste de iones y el estrés osmótico, sino también las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas que afectan la fotosíntesis, por lo que generan una serie de compuestos como respuesta al estrés (Shetty et al., 2019).

En el estudio de El-Sheekh et al. (2024) se evaluaron las concentraciones celulares y el contenido de pigmentos en cultivos de *Dunaliella salina* a distintas salinidades (0.5, 1, 2, 2.5 y 3.5 M) obteniendo como resultado una disminución significativa de clorofila total, a altas como a bajas salinidades, excepto a 2 M donde fue tan significativa.

Por su parte, Sedjati et al. (2019) en su estudio tuvieron resultados parecidos en *Dunaliella parva*, el contenido de clorofilas a y b aumento a una baja salinidad de

20%, mientras que el mayor contenido de carotenoides también se obtuvo en una salinidad relativamente baja a un 25% y el mayor crecimiento celular se dio a salinidades más altas de 30 y 40%.

7.9.3 Luz

La luz debido a la fotosíntesis es un parámetro que interviene en la producción de compuestos bioquímicos en las microalgas, en varios estudios se ha observado alteraciones significativas en la composición de biomasa y biomoléculas de las microalgas cuando las células se exponen a diferentes niveles y tipos de luz (Bermejo et al., 2021).

Shi et al. (2020) señala que estudios indican que a mayor intensidad de luz hay un aumento en la concentración de lípidos neutros y un menor contenido de lípidos polares, mientras que a menor intensidad de luz hay un aumento en los contenidos de PUFA. Por su parte, Tran-Nguyen et al., (2023) encontraron mayor contenido de β -caroteno en cultivos bajo la luz led azul a una intensidad baja de $13 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, mientras que, Sui & Harvey, (2021) reportan un aumento en la concentración de proteínas del 74 % del peso seco sin cenizas con 100 W en cultivos bajo luz led blancas y una disminución bajo luces led azules y rojas con 4 intensidades de luz (100, 200, 400 y 600 W).

7.9.4 Nutrientes

En las microalgas los elementos nutritivos son vistos como los componentes clave para lograr el mayor rendimiento de biomasa ya sea en experimentos de laboratorio o en producción a gran escala, requieren nutrientes inorgánicos, que abarcan macronutrientes (principalmente N y P con una proporción de 16 N:1P), vitaminas (como B6, B12 y otras) y oligoelementos (como hierro, níquel, cobalto, manganeso, zinc y selenio) para su crecimiento celular (Hossain & Mahlia, 2019). Por lo que, la falta de alguno de estos nutrientes afecta a la composición de la microalga provocando una disminución en el contenido celular, en pigmentos fotosintéticos y proteínas, debido a que el flujo del carbono se ocupa para la producción de carbohidratos y lípidos y no en la síntesis de proteínas (Bermejo et al., 2021).

Por ejemplo, en *Chlorella vulgaris* en cultivos con limitación de nitrógeno se redujo la densidad celular y hubo un aumento en la concentración de lípidos entre un 20% y un 53% (Yeh & Chang, 2012). En *Dunaliella salina* se obtuvo mayores concentraciones de aceites con un 24.86%, 22.85% y 5.88% en los tratamientos con ausencia total de fósforo (0.0 P) y con ausencia total de nitrógeno y fósforo (0.0N/0.0P) (Almutairi, 2020). En otro estudio realizado en *D. tertiolecta* se observó una reducción en la concentración de clorofila en el tratamiento con N: P de 4:1, por el contrario, en el mismo tratamiento se obtuvo la concentración máxima de lípidos, indicando que proporciones más altas de nitrógeno a fósforo tienen un efecto positivo en el crecimiento celular, mientras que proporciones más bajas

afectan la producción de clorofilas y potencian la producción de lípidos (Song et al., 2016).

7.9.5 pH

Otro factor indispensable para la producción de biomasa microalgal es el pH, este debe mantenerse estable durante todo el ciclo del cultivo. Cuando el pH aumenta, por consecuencia también lo hace la concentración de carbonato y de bicarbonato, y la de CO₂ disminuye, no obstante, en niveles de pH neutro, el dióxido de carbono utilizado en la fotosíntesis puede ser reemplazado desde una reserva de bicarbonato, dado que esta constituye la principal fuente de carbono en condiciones neutras de pH (Bermejo et al., 2021). Debe situarse entre 7.0 y 9.0 para que las condiciones de desarrollo sean adecuadas, y el nivel ideal se estima que está entre 8.2 y 8.7, además el pH interviene en la regulación de la cantidad de proteínas y pigmentos en las microalgas (Hossain & Mahlia, 2019).

Pal Singh & Dhaka, (2018) obtuvieron mayor crecimiento celular a pH de 8, mientras que, el contenido total de clorofila muestra una disminución conforme se aumenta el nivel de pH y aumenta el contenido de carotenoides, respecto a su morfología *Dunaliella salina* tuvo un cambio de color de verde a naranja intenso. Por otro lado, Khalil et al., (2010) obtuvo una mayor concentración celular a pH 7.5 y disminuyó a pH de 4 y 10, al igual el contenido de proteínas, carbohidratos, clorofilas y carotenoides totales fue mayor en pH de 7.5 (grupo control) y hubo una

disminución considerablemente en niveles de pH ácidos y alcalinos, a diferencia de la acumulación de b-caroteno que aumentó 1.7 veces el valor del control a pH 6 y más del cuádruple a pH 9.

7.10 Métodos de cuantificación de carotenoides y proteínas

7.10.1 Técnicas de extracción de carotenos y proteínas

Por lo general, para realizar la extracción de biomoléculas se utilizan disolventes orgánicos, un método ampliamente reconocido y a menudo, este tipo de proceso de extracción está vinculado a un paso anterior que es la ruptura celular que permite que el solvente acceda a los elementos internos de la célula, lo que incrementa la eficacia de la extracción. Estas técnicas pueden ser molienda de perlas, homogeneización de alta velocidad o presión, ultrasonificación, termólisis, hidrólisis, entre otras (Corrêa et al., 2020).

Para la extracción de carotenos los solventes más utilizados son el metanol, hexano, etanol y acetona, o sistemas de extracción binaria como la combinación de diclorometanol/metanol, cloroformo/metanol y acetona/éter de petróleo (Soares et al., 2016). En el caso de proteínas se utilizan métodos acuosos ácidos y alcalinos, seguidos de múltiples ciclos de centrifugación y recolección mediante técnicas tales como la ultrafiltración, la precipitación o la cromatografía (Bleakley & Hayes, 2017).

7.10.2 Métodos espectrofotométricos para cuantificación de carotenos y proteínas

La técnica espectrofotométrica es el procedimiento común empleado para la cuantificación de carotenoides, siendo fundamental que los pigmentos posean pureza analítica. Para calcular la concentración se toma en cuenta el volumen de la solución, absorbancia a la que será leída según la especie de microalga y la cantidad de muestra (Butnariu, 2016). Para proteínas es utilizado el método de Lowry, consiste en la modificación de la reacción de biuret, añadiendo ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (reactivo de Folin-Ciocalteu), que tiñe las proteínas de color azul-verdoso y se lee a absorbancias entre 650 y 750 nm (Lowry et al., 1951). El más utilizado es el método de Bradford, el cual consiste en teñir a las proteínas con el colorante Azul de Coomassie G-250 permitiendo lecturas en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm (Bradford, 1976).

8. METODOLOGÍA

8.1 Área de estudio

Este trabajo se desarrolló bajo el marco del proyecto: I+D+I-XVII-2023-4-Carotenoides en microalgas financiado por La RED CEDIA, con la microalga *Dunaliella sp.*, registrada con el código PM018 de la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas y Prácticas Académicas-CIBPA. Tiene el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264. El componente experimental se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencias del Mar.

8.2 Tipo de investigación

El presente trabajo corresponde a una investigación de tipo cuantitativa, debido a que analiza y compara datos estadísticos midiendo las concentraciones de carotenos y proteínas en diferentes condiciones lumínicas, es de tipo experimental, dado que se manipula variables independientes (la luz) y el efecto que causa en variables dependientes (concentración de carotenos y proteínas) en cultivos con condiciones controladas, por último, es una investigación de tipo aplicada, porque tiene como finalidad, optimizar las condiciones de cultivo para la producción de dos metabolitos de interés comercial.

8.3 Medio de cultivo Guillar F/2

Para la preparación de cada solución se utilizó 100 ml de agua destilada y se agregaron los nutrientes necesarios de acuerdo con la tabla 1. Posteriormente se esterilizaron en el autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para fertilizar el medio se colocó 100 uL por cada 100 ml.

Tabla 1.

Soluciones químicas del Medio de cultivo Guillard F/2

MEDIO GUILLARD F/2	
Solución 1:	g/100ml
Nitrato de Sodio (NaNO_3)	7.5
Fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.5
Solución 3:	g/100ml
Cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.32
EDTA disódico ($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$)	0.44
Solución traza	0.10ml
Sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.49
Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnCl}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.1
Cloruro de zinc (ZnCl)	0.53
Cloruro de cobalto (III) hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5
Cloruro de manganeso (III) tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	9.0
Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.32
Solución 4	mg
Tiamina B1	0.1
Cyanocobalamina B12	0.5

Nota: Tabla obtenida de Guillard (1975).

8.4 Cultivo en medio sólido

Para realizar la inoculación de cepa en cajas Petri se preparó 100 ml de agua de mar fertilizada con medio de cultivo Guillard F/2, luego se agregó 1.5 g de Aga-Agar y se esteriliza. En las cajas Petri se colocaron 20 ml del medio agar y se dejaron al ambiente hasta que se solidifiquen, aproximadamente por 1 h. Posteriormente con un asa bacteriológica, se tomó la muestra de microalga, y se realizó el rayado en zig-zag, esta se selló con Parafilm y se la colocó de forma invertida hacia la luz.

El crecimiento de las colonias se observó aproximadamente a los 7 días de sembrado, manteniendo los siguientes parámetros de crecimiento: luz a 60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, temperatura a 25 ± 2 °C, pH 8, salinidad a 35 ppt.

8.5 Cultivo en medio líquido

Para la inoculación en tubos de ensayo, con la ayuda de una pipeta Pasteur se agarró una colonia de las placas Petri y se colocó en un medio de 10 ml previamente fertilizado. Se realizaron 5 tubos, estos se sellaron con Parafilm y se los colocó en una gradilla del cepario, hacia la luz monitoreando su crecimiento por aproximadamente 7 días.

Una vez pasado el periodo de 7 días el contenido de los tubos es pasado a matraces de 150 ml para realizar la curva de crecimiento y un cultivo madre, posteriormente del cultivo madre se realizaron las réplicas para cada tratamiento por triplicado empezando con un inóculo de 2.9×10^5 cel/ml, seguido se realizaron repiques a 600 ml y finalmente alcanzaron un volumen de 3 L.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ utilizando un termómetro de mercurio, el pH osciló entre 7.8 a 8; se mantuvo un fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad) a $60 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones utilizando un luxómetro, la salinidad a 35 ppt, se realizó aireación manual cuatro veces al día y se colocaron aireadores para los cultivos a 3L.

Cabe mencionar que, una vez que alcancen la fase exponencial, los cultivos pasaran a fase de estrés, a excepción de 3 réplicas que se cosecharan antes de esta fase, debido a que corresponde al tratamiento vegetativo o fase vegetativa, en donde las células se encuentran activamente creciendo, dividiéndose y realizando fotosíntesis, bajo condiciones favorables, esta etapa dura hasta la fase exponencial, antes que las células empiecen a morir, se incluye este tratamiento para poder comparar la producción de metabolitos en condiciones óptimas y como varía su producción en condiciones de estrés.

8.6 Parámetros de crecimiento

8.6.1 Densidad celular

Para determinar la densidad del cultivo se realizaron conteos celulares, cada 24 horas, para esto se tomaron 1ml de muestra, se la fijó con 20 μ l de lugol y se realizó el recuento celular con una cámara de Neubauer de 0.1 mm y un área de 0.0025 mm², en un microscopio OMAX a 10x.

Para la evaluación de la densidad celular y realizar la curva de crecimiento se utilizó la siguiente formula (Vega Arredondo et al., 2017).

$$DC \text{ Inóculo} = N \times 10^4 \times FD$$

Donde:

DC= densidad celular (cel/ml)

N= promedio del conteo celular de los cuadrantes (A, B, C, D),

10^4 = factor de conversión de 0.1 μ l - 1ml

FD= factor de dilución

8.6.2 Tasa de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento se utilizó la fórmula propuesta por (Vega Arredondo et al., 2017).

$$\mu = \frac{\ln(N1) - \ln(N2)}{t1 - t2}$$

Donde;

N1 y N2 Indican la concentración celular en los tiempos t1 y t2

8.6.3 Productividad de la biomasa

Para saber la capacidad del cultivo para generar biomasa y la eficiencia de la microalga en convertir nutrientes y condiciones ambientales en crecimiento y producción de carotenos y proteínas se calculó la productividad de la biomasa.

Para esto se colocó a secar biomasa en la estufa a 37°C por 24 h, para luego ser macerada con un mortero y se pesó en una balanza analítica. Posteriormente se empleó la siguiente fórmula para calcular el peso seco:

$$PS = (Pf - Po) / Vf$$

Donde:

PS: Es el peso seco de la biomasa en g L⁻¹

Pf: El peso final de los filtros con la biomasa seca,

Po: El peso inicial del filtro seco

Vf: El volumen de muestra filtrada

Por último, para calcular la productividad de la biomasa se empleó la siguiente fórmula (Mohd-Apandi et al., 2021).

$$Pb = \frac{X2 - X1}{t2 - t1}$$

Donde:

Pb: La productividad (g L⁻¹)

X1 y X2: Representa la concentración de biomasa (g L⁻¹) en el lapso del tiempo

8.7 Fase estrés lumínico en *Dunaliella sp.*

8.7.1 Conversión de lux a $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones

Para obtener el dato en $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones se multiplica la cantidad de luz en lux por el factor de conversión dado, sin embargo, no existe un factor de conversión general para PPF, por lo que el factor de conversión de lux a PPF ($\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) va a variar según las distintas fuentes de luz (Osram, 2000).

En este caso para inducir al estrés a las microalgas se utilizaron lámparas led de luz blanca, para esto se utilizó un factor de conversión de 0.0149 recomendado por Lu et al., (2024) para este tipo de luz. Se colocó las lámparas a 6666 lux para el tratamiento 1 ($100 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), el tratamiento 2 ($150 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) a 10000 lux y para

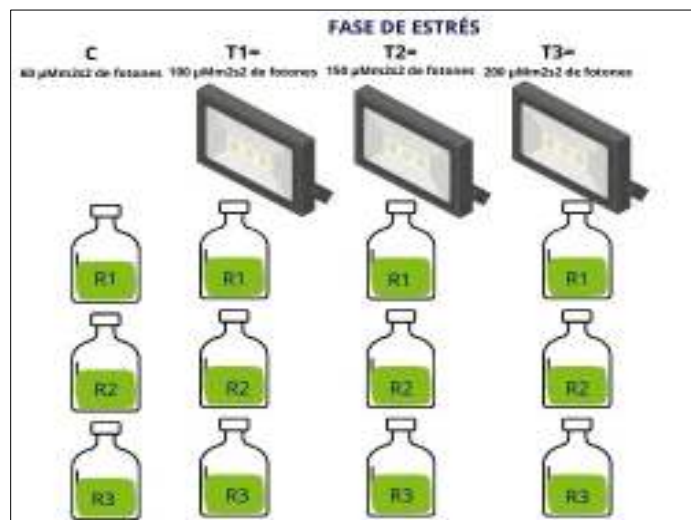
el tratamiento 3 ($200 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) a 13000 lux y el tratamiento control se mantuvo en ($60 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) a 4000 lux.

8.7.2 Inducción a estrés

Cuando los cultivos de 3 L alcanzaron la fase exponencial, estos pasaron a la fase de estrés lumínico durante 10 días, se realizó cada tratamiento por triplicado, teniendo un grupo control a $60 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones y tres tratamientos a 100, 150 y $200 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones. Los demás parámetros y nutrientes se mantuvieron igual durante toda la etapa de cultivo y para llevar el control del estrés en la microalga se tomaron muestras cada 2 día para observación microscópica y evaluar el estado de las células.

Figura 1.

Diseño experimental de la fase de estrés para Dunaliella sp.



8.8 Cuantificación de carotenos

Preparación de muestras

A los 10 días de estrés se cosecha la biomasa de la microalga *Dunaliella sp.* de cada uno de los cultivos, para esto se la coloca en tubos falcón de 250ml, utilizando una centrífuga HERMELE Z30 a 3500 rpm por 5 minutos, luego se lava con NaCl al 1%, se elimina el sobrenadante y las muestras se almacenan en un congelador en el laboratorio 5 de la Facultad.

Se pesó 60 mg de biomasa húmeda de *Dunaliella sp.* por triplicado de cada uno de los cultivos y se coloca en tubos falcon, a continuación, se añade 1ml de suero fisiológico y se realiza vórtex a 2500 rpm durante 5 minutos, seguido se centrifuga a 3500 rpm para lavar correctamente la muestra

Extracción

Para extraer se resuspende la pastilla celular agregando 3ml de acetona fría al 90% y se realiza vórtex a 2800 rpm por 5 minutos, luego se coloca la muestra en tubos de ensayo y se deja reposar por 24 h sobre hielo en oscuridad y dentro de un congelador a 4° C.

Pasado el tiempo se coloca la muestra en tubos falcón y se lleva al vórtex a 3500 rpm x 3 minutos, se transfiere el extracto a un matraz de 100 ml, se realiza este proceso 2 veces hasta que la pastilla celular este incolora.

Lectura de absorbancias

Se ubican en celdas de vidrio de 3 ml de capacidad sacando una media de cada muestra, y se realiza la lectura en el espectrofotómetro de Thermo Scientific™ a varias longitudes de onda de luz de 664, 647, 480, 510 nm y de acuerdo con la fórmula aplicada se procede a registrar la lectura de valores de carotenos totales.

La fórmula utilizada para la determinación de clorofila fue la propuesta por (Humphrey, 1979) y para carotenos se utilizó la de (Strickland & Parsons, 1972) respectivamente. Debidos a que se utilizó biomasa húmeda es necesario eliminar la humedad de la muestra, para esto se secó 60 mg de biomasa, obteniendo el total de peso seco de la muestra.

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6 (A_{480} - 1.49 A_{510})$$

8.9 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford, (1976) el cual consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino (BSA)).

Curva estándar (BSA)

Se preparó una solución madre de 1 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA), usando la solución de dilución (agua destilada), luego se realizó diluciones seriadas de la solución estándar para obtener varias concentraciones de un rango de 1.25-25 y de 10-60 ug/ml. En un tubo se agregó 300 uL del estándar de proteína y se agregó 2 ml del reactivo de Bradford se homogenizó y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595nm. Posteriormente, se realiza las curvas patrón relacionando las absorbancias obtenidas frente a la cantidad de proteínas.

Preparación de las muestras de *Dunaliella sp.*

A los 10 días de estrés se cosecha la biomasa de la microalga *Dunaliella sp.* de cada uno de los cultivos, para esto se la coloca en tubos falcón de 250 ml, utilizando una centrífuga HERMELE Z30 a 3500 rpm por 5 minutos, luego se lava con NaCl al

1%, se bota el sobrenadante y las muestras se almacenan en un congelador en el laboratorio 5 de la Facultad.

Se pesó 200 mg de biomasa húmeda de *Dunaliella sp.*, se colocó en tubos eppendorf y se lavó la muestra con 1 ml de suero fisiológico, realizando vórtex y centrifugando a 1000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante, este proceso fue realizado dos veces para eliminar las sales.

Extracción

Para la extracción se agregó 500 μ L de agua destilada y se llevó la muestra a baño maría a 37 °C durante 15 min, luego se induce a la ruptura celular agregando 300 μ L del tampón de lisis desnaturalizante y se realizando vórtex a 2500 rpm durante 2 minutos, posteriormente se deja en reposo a temperatura ambiente por 5 minutos, pasado el tiempo se centrifugó las muestras a 10000 rpm durante 8 minutos, se toma con una pipeta el extracto y se coloca en tubos eppendorf.

Lectura de absorbancias

Se colocó en un tubo 300 μ L de la muestra y se añade 2 ml de reactivo de Bradford, se homogeniza y se lee en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm. Posteriormente para estimar la concentración de proteínas se utilizó la fórmula de la recta de la curva estándar. Debido a que se utilizó biomasa húmeda es necesario

eliminar la humedad de la muestra, para esto se secó 200 mg de biomasa, obteniendo el total de peso seco de la muestra.

$$x = \frac{y - b}{m}$$

8.10 Análisis estadísticos

Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Anderson-Darling y para realizar la comparación entre todos los tratamientos se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney para datos no paramétricos con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$). Los análisis estadísticos y graficas se realizaron en el programa MINITAB 19.

9. RESULTADOS

9.1 Densidad celular

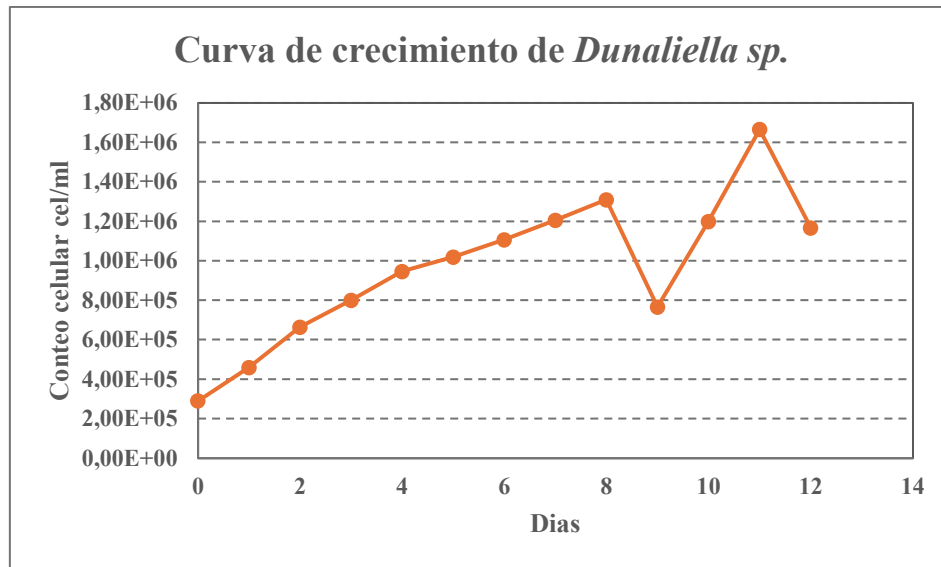
Se realizaron cultivos de 150 ml por triplicado y durante la fase vegetativa se realizó el conteo celular obteniendo los siguientes resultados:

El día uno o fase de adaptación se reportó una densidad celular media de 2.9×10^5 cel/ml y se alcanzó la fase exponencial hasta el octavo día, con una densidad celular media de 1.5×10^6 cel/ml. Estadísticamente, la prueba de Kruskal Wallis muestra como resultado que no existe una diferencia significativa entre las tres réplicas con un valor de $p = (0.459)$ expresando que existen pequeñas variaciones en las densidades celulares entre las réplicas; sin embargo, el patrón de las curvas es muy similar.

En la Figura 2 se muestra que *Dunaliella sp.* mantiene un crecimiento constante y acelerado en las tres réplicas desde el día uno hasta el ocho, representando su fase exponencial, empezando su transición a la fase estacionaria notándose un declive en el conteo celular.

Figura 2.

Curva de crecimiento de Dunaliella sp.



9.2 Tasa de crecimiento celular

Se obtuvo una tasa de crecimiento celular promedio de 0.22 día^{-1} , con una desviación estándar de 0.015 día^{-1} lo que muestra una baja variación entre los datos. Esto indica que el tratamiento evaluado promueve un crecimiento celular constante y reproducible.

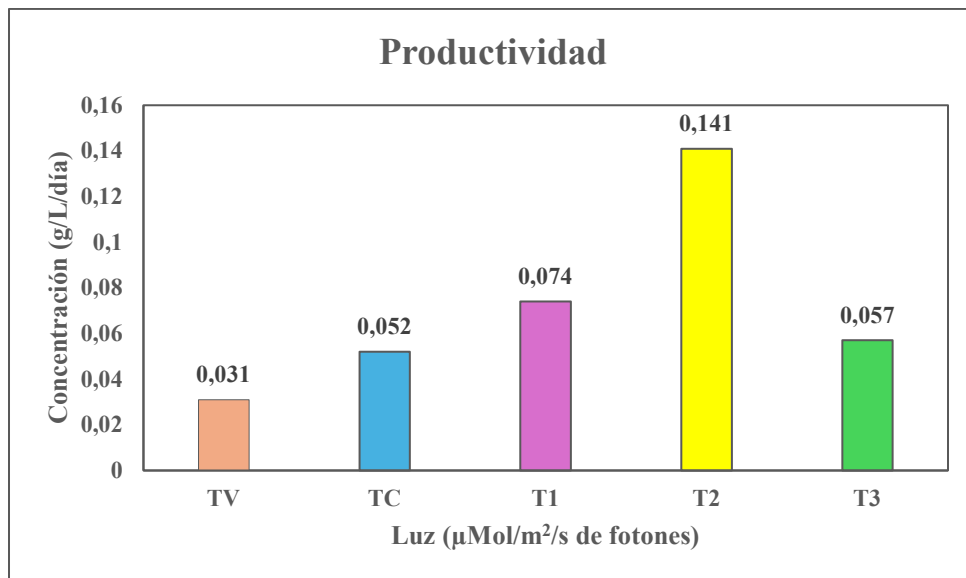
9.3 Productividad de biomasa

De acuerdo con la Figura 3 indica que la productividad más alta con un valor de 0.141 g/L/día se logró en los cultivos del tratamiento 2 ($150 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), demostrando que la cantidad de luz fue óptima para maximizar la productividad. Al incrementar la luz en el tratamiento 3 ($200 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), se observó una disminución

significativa a comparación del valor máximo con una productividad de 0.057 g/L/día; sin embargo, la productividad más baja fue de 0.031 g/L/día que se obtuvo en el tratamiento vegetativo sometido al nivel más bajo de luz, y en menor tiempo de cultivo (8 días) incrementando ligeramente a 0.052 g/L/día en el tratamiento control con igual cantidad de luz, pero a mayor tiempo de cultivo. Por ello, el valor de $p = (0.016)$ muestra que existe diferencias significativas con respecto a la productividad entre los tres tratamientos y el grupo control.

Figura 3.

Influencia de la luz en la productividad de biomasa de Dunaliella sp.



Nota: Los tratamientos experimentales fueron TV= 60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, TC= $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

9.4 Determinación de compuestos bioquímicos

9.4.1 Clorofila *a*

La concentración de clorofila *a* fue superior en el grupo control ($60 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$) con una media de $115.68 \mu\text{g}/\text{ml}$, es decir que produce más clorofila *a* en condiciones de baja luminosidad, mientras que, la concentración más baja fue de $25.71 \mu\text{g}/\text{ml}$ al aumentar la cantidad de luz en el tratamiento 2 ($150 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (Figura 4). Sin embargo, la desviación estándar en el grupo control corresponde a $9.59 \mu\text{g}/\text{ml}$, siendo relativamente alta lo que indica una mayor variación en los datos con respecto al tratamiento 2 que es de $1.88 \mu\text{g}/\text{ml}$. Respecto a la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor de $p = (0.0005)$ indicando diferencias significativas entre los tratamientos experimentales.

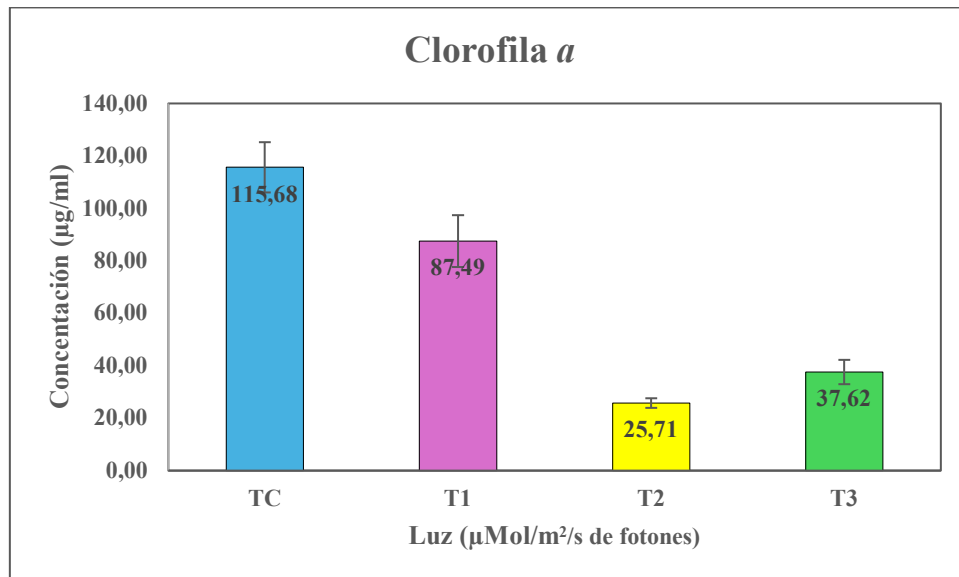
Este comportamiento se debe a que, en condiciones óptimas (TC) la microalga sintetiza más clorofila *a* para captar la máxima luz disponible y producir más energía, mejorando la eficiencia fotosintética y promoviendo el crecimiento celular; mientras que, la morfología de la célula no presentó cambios notables, conservando su forma ovalada, flagelos y el color verdoso.

Por el contrario, conforme se aumentó el nivel de luz se produjo un efecto negativo en la concentración de clorofila siendo esta más baja, lo que demuestra que la microalga empezó a inhibir o degradar la clorofila *a* como respuesta al estrés lumínico y como protección ante el daño oxidativo, lo cual generó cambios en la morfología, como células más pequeñas y menos ovaladas, un color verde menos

intenso y volviéndose un poco más amarillo, confirmando la degradación de clorofila.

Figura 4.

Concentraciones de clorofila a en Dunaliella sp., según las diferentes intensidades lumínicas



Nota: Los tratamientos experimentales fueron TC=60 µMol/m²/s, T1=100 µMol/m²/s, T2=150 µMol/m²/s, T3=200 µMol/m²/s

9.4.2 Clorofila b

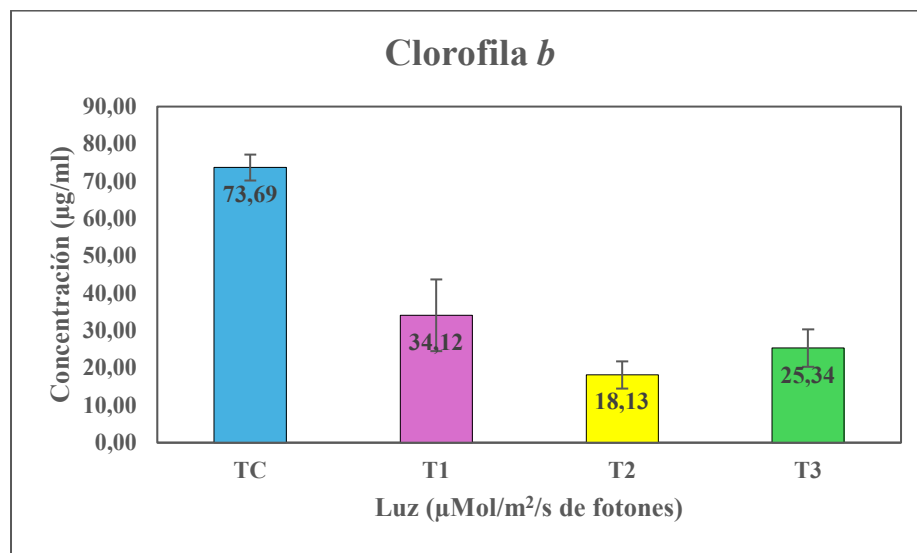
Al igual que la clorofila a, la mayor concentración de clorofila b se logró en el grupo control (60 µMol/m²/s) con una media de 73.69 µg/ml y la concentración más baja se obtuvo en el tratamiento 2 (150 µMol/m²/s) obteniendo una media de 18.13 µg/ml (Figura 5) disminuyendo notablemente, justificando el valor de p = (0.001)

que muestra que existe una distinción significativa entre los tratamientos con respecto a la acumulación de clorofila *b*. Los valores de desviación estándar muestran mayor dispersión en el tratamiento 1 siendo de 9.64 µg/ml, frente a los demás tratamientos con valores más bajos.

Por lo que, se sugiere que *Dunaliella sp.* sintetiza más clorofila *b*, en condiciones de luz óptimas, para aprovechar la captación de luz y transferirla a la clorofila *a* que participa directamente en la reacción fotosintética, esto no influyó en la morfología de las células, dado que no presentaron cambios notables en su estructura. Por otro lado, al incrementar la intensidad de luz, las células actúan para protegerse del daño oxidativo y evitar una sobrecarga energética, generando una degradación en la clorofila *b* para adaptarse a condiciones estresantes. Es decir, que la baja intensidad de luz favorece la producción de clorofila y a mayor intensidad de luz se degrada la clorofila, reduciéndose el pigmento verde en la célula por otro más amarillo, al expresarse otros pigmentos.

Figura 5.

Concentraciones de clorofila *b* en *Dunaliella* sp., según las diferentes intensidades lumínicas



Nota: Los tratamientos experimentales fueron TC=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

9.4.3 Carotenos totales

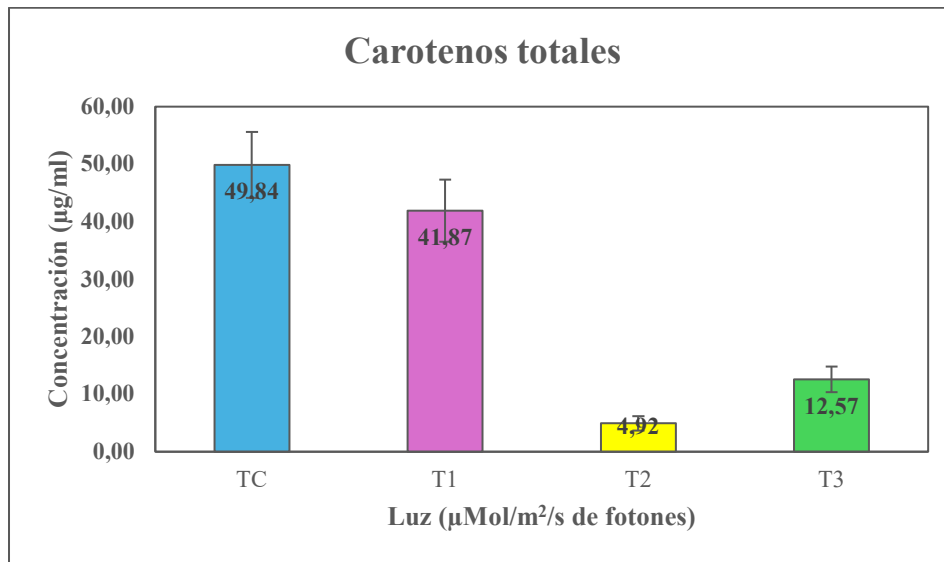
Respecto a los carotenos la concentración más alta al igual que la concentración de clorofila se obtuvo en el tratamiento control (60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) con una media de 49.84 $\mu\text{g/ml}$ y una menor cantidad en el tratamiento 2 (150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) siendo la media de 4.92 $\mu\text{g/ml}$ notándose una disminución bastante significativa entre ambos tratamientos (Figura 6). Por otro lado, la desviación estándar en el grupo control corresponde a 5.75 $\mu\text{g/ml}$ mostrando una mayor variación en los datos con respecto al tratamiento siendo este de 1.25 $\mu\text{g/ml}$. En consecuencia, la prueba de Kruskal-

Wallis indica un valor de $p = (0.001)$ mostrando que existen diferencias notables en la acumulación de carotenos en los diferentes tratamientos.

El comportamiento indica que en intensidades de luz óptimas (TC) permitieron que se produzca una síntesis de pigmentos, aunque no se generó un estrés excesivo en la microalga, sin embargo, al subir el nivel de luz en el tratamiento 1, hubo una reducción, probablemente se dirige la actividad metabólica a la defensa ante el estrés. No obstante, la cantidad de luz no es suficientemente alta para provocar una síntesis de carotenos, en tratamiento 2 una reducción brusca, que probablemente se produjo un daño fotooxidativo en las células causando la degradación de carotenos. Respecto la morfología de las células se observaron cambios como la coloración verde-amarillenta, pérdida de flagelos, modificación de la forma, lo que sugiere que las células recibieron cierto nivel de estrés, sin embargo, no fue suficiente para inducir a la producción de carotenos.

Figura 6.

Concentraciones de carotenos en Dunaliella sp., en diferentes intensidades lumínicas



Nota: Los tratamientos experimentales fueron TC=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

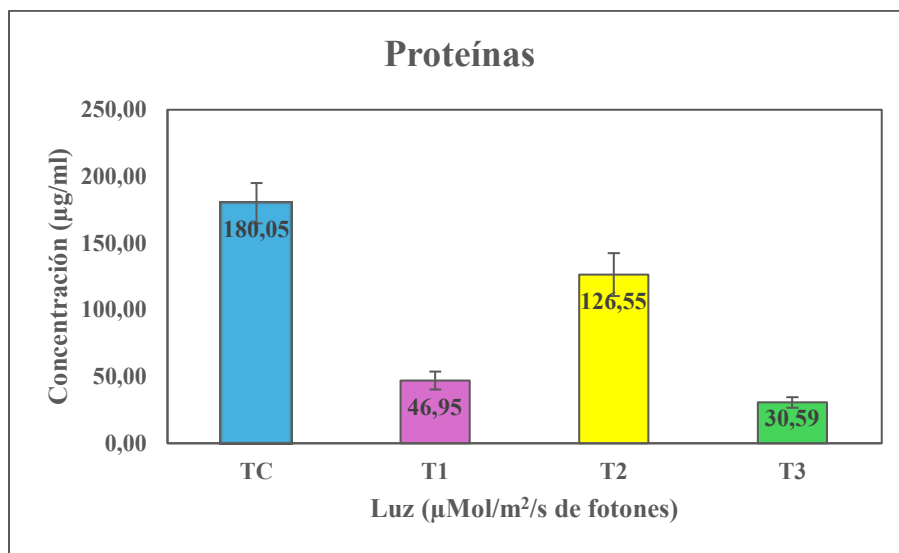
9.4.4 Proteínas

En cuanto a las proteínas se observó mayor concentración en el grupo control (60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) obteniendo una media de 180.05 $\mu\text{g/ml}$, a diferencia de los carotenos la concentración más baja se obtuvo en el tratamiento 3 (200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) con una media de 30.59 $\mu\text{g/ml}$, siendo el nivel más alto de luz, aunque la concentración de proteínas es notablemente mayor a la de carotenos totales (Figura 7). La desviación estándar a diferencia de los carotenos muestra una mayor variación entre los datos siendo la más alta de 16.08 $\mu\text{g/ml}$ en el tratamiento 2 y teniendo un valor menor en el tratamiento 3 con 3.96 $\mu\text{g/ml}$. La prueba Kruskal-Wallis señala un valor de $p = (0.001)$ mostrando diferencias significativas entre los tratamientos experimentales.

El comportamiento se debe a que, a intensidades de luz óptimas la microalga dirige su actividad metabólica a la síntesis de proteínas y al crecimiento celular, por ende, la concentración de proteínas es mayor, al aumentar la cantidad de luz, esta redirige su metabolismo a la supervivencia y se generó un bloqueo en los procesos biosintéticos, por lo que, provocó una reducción en proteínas. Sin embargo, en el tratamiento 2, se observó una activación de proteínas, las que podrían ser, enzimas protectoras.

Figura 7.

Concentraciones de proteínas en Dunaliella sp., en diferentes intensidades lumínicas



Nota: Los tratamientos experimentales fueron TC=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

9.5 Evaluación de compuestos bioquímicos

9.5.1 Análisis comparativo de la fase vegetativa y de estrés

La clorofila *a* y *b* en la fase vegetativa presenta concentraciones regulares siendo de 55.06 y 40.66 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla 2), lo que permite a la microalga realizar una fotosíntesis eficiente, al comparar con el tratamiento 1 (100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), se observa un aumento en la cantidad de clorofila *a* con 87.49 $\mu\text{g/ml}$ lo que puede ser una respuesta compensatoria al aumento de la luz, por otro lado hay una disminución de clorofila *b* a 34.12 $\mu\text{g/ml}$, respecto al tratamiento 2 y 3, tanto la clorofila *a* y *b* continuaron disminuyendo significativamente ya sea por daño o una mala regulación en el sistema fotosintético (Figura 8). Se obtuvo valor de $p = (0.0001)$ en la prueba de Kruskal-Wallis indicando variaciones significativas en las concentraciones.

En el caso de los carotenos totales, en la fase vegetativa se obtuvo una concentración baja de 8.97 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2), ya que la microalga no está siendo sometida a estrés por lo tanto no se estimula su producción, a diferencia del tratamiento 1 (100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), donde se observa un aumento en la concentración llegando a 41.87 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, en el tratamiento 2 (150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), se reduce notablemente a 4.92 $\mu\text{g/ml}$, siendo incluso más baja que en la fase vegetativa a pesar de haber un aumento en la cantidad de luz no se produce un estrés significativo que promueva la producción de carotenos y en el tratamiento 3 (100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), se registró un ligero aumento en la concentración con respecto a la fase vegetativa teniendo 12.57 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 8) como respuesta a un nivel de estrés

mayor. Estas diferencias se muestran en la prueba de Kruskal-Wallis con un valor de $p = (0.0002)$.

En la fase vegetativa se acumuló mayor cantidad de proteínas alcanzando un valor de 397.36 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2), lo que demuestra un metabolismo activo en las microalgas bajo condiciones ambientales óptimas de cultivo, a comparación del tratamiento 1 (100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), donde se reduce considerablemente a 46.95 $\mu\text{g/ml}$ debido a que se mantuvieron en estrés moderado. En el tratamiento 2 (150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) aumenta la cantidad de proteínas respecto al tratamiento 1, sin embargo, la concentración es notablemente baja en comparación con la fase vegetativa siendo de 126.55 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso del tratamiento 3 (200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) se obtuvo 30.59 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas (Figura 8), indicando que existe un nivel de estrés mayor que provoca una reducción de la actividad metabólica de la microalga, representado por un valor de $p = (0.0001)$.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, se demostró que en la fase vegetativa con una cantidad de luz óptima hay una alta producción de proteínas y pigmentos fotosintéticos, no obstante, al no existir un estrés en la microalga la producción de carotenos es baja. Al aumentar la cantidad de luz se induce un estrés moderado por lo que empieza la síntesis de carotenos y clorofila *a*, pero se reduce la síntesis de proteínas como respuesta al inicio del estrés, al aumentar aún más la cantidad de luz causa una reducción en todos los metabolitos a excepción de los carotenos como respuesta al estrés oxidativo.

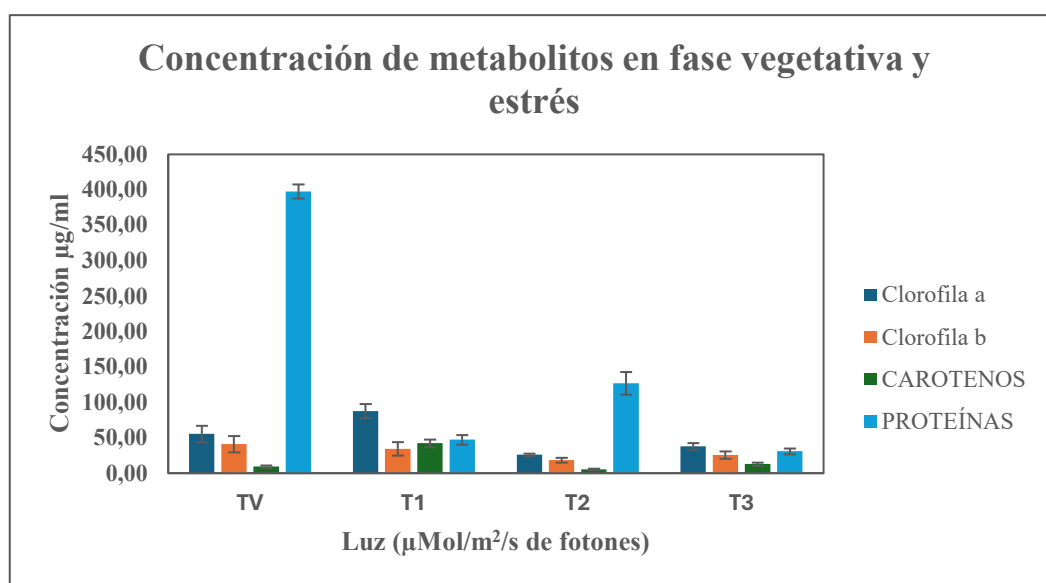
Tabla 2.

Concentración de compuestos bioquímicos ($\mu\text{g/ml}$) en la fase vegetativa. SD = Desviación estándar

Compuestos	Concentración	SD
Clorofila <i>a</i>	55.06	11.66
Clorofila <i>b</i>	40.66	11.63
Carotenos Totales	8.97	1.79
Proteínas	397.36	9.96

Figura 8.

Concentración de compuestos bioquímicos en la fase vegetativa y de estrés



Nota: Los tratamientos fueron TV=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

9.5.2 Análisis comparativo de la fase vegetativa y el grupo control

Hay una mayor producción de clorofila *a* en el grupo control ($60 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) con $115.68 \mu\text{g/ml}$, a diferencia de la vegetativa con $55.06 \mu\text{g/ml}$, tal vez como un método de ajuste o compensación en la fotosíntesis debido al envejecimiento de las células o variaciones en la densidad celular, al igual que la clorofila *b* donde también ocurre una mayor concentración en el grupo control siendo de $73.69 \mu\text{g/ml}$ y en la vegetativa de $40.66 \mu\text{g/ml}$ (figura 9). La prueba de Mann-Whitney señala que existen diferencias notables entre ambos tratamientos con un valor de $p = (0.012)$.

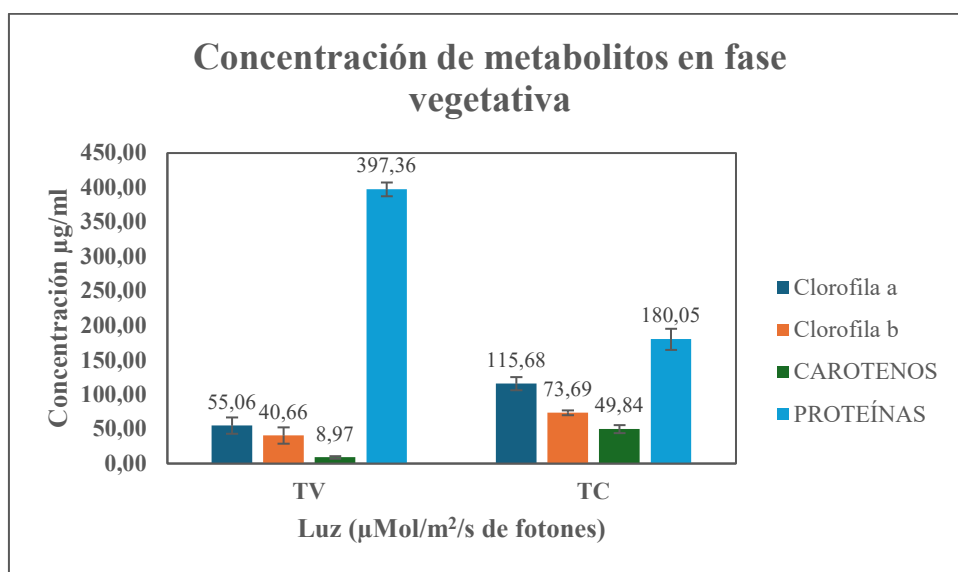
En el caso de los carotenos la diferencia entre los tratamientos es mucho mayor, teniendo una concentración notablemente alta el grupo control de $49.84 \mu\text{g/ml}$ y en la fase vegetativa solo acumuló $8.97 \mu\text{g/ml}$ (Figura 9), justificando el valor de $p = (0.012)$ en la prueba de Mann-Whitney. Esto evidencia que, a mayor tiempo de cultivo, incluso en condiciones de luz óptimas, se puede generar un estrés celular, lo que a su vez provoca la síntesis de carotenos.

Por otro lado, en las proteínas, a diferencia de los otros compuestos, se logró una mayor concentración en la fase vegetativa con $397.36 \mu\text{g/ml}$, mientras que, el grupo control muestra una reducción en la concentración con $180.05 \mu\text{g/ml}$ (Figura 9), mostrando una variación bastante alta entre los dos tratamientos, obteniendo con un valor de $p = (0.012)$ en la prueba de Mann-Whitney. Estos resultados sugieren que, al extenderse el periodo de cultivo, puede haber un agotamiento de nutrientes y

envejecimiento de células lo cual impacta en el metabolismo de las células, por lo que, aunque se mantenga en un ambiente adecuado de iluminación, la cantidad de proteínas disminuye considerablemente.

Figura 9.

Concentración de compuestos bioquímicos en la fase vegetativa y el grupo control



Nota: Los tratamientos fueron TV=60 µMol/m²/s, TC=60 µMol/m²/s

9.5.3 Análisis comparativo de los efectos de la luz en la concentración de carotenos, proteínas y productividad

Durante la fase vegetativa al presentar condiciones óptimas para su crecimiento las microalgas priorizan la producción de proteínas y por lo tanto no sintetizan metabolitos secundarios como los carotenos, teniendo concentraciones de 397.36 y 8.97 µg/ml respectivamente, evidenciando una diferencia significativa entre ambos compuestos con un valor de p = (0.0122), además no se observa una relación directa

de proteínas con la productividad de biomasa, siendo esta la más baja con 0.031 g/L/día (Figura 10), es decir, que aunque acumula proteínas no significa un mayor crecimiento celular. Lo mismo ocurre con el grupo control (60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) teniendo mayor cantidad de proteínas (180.05 $\mu\text{g/ml}$) con respecto a la cantidad de carotenos (49.84 $\mu\text{g/ml}$), pero la concentración es más alta que la vegetativa, al igual que la productividad de 0.052 g/L/día (Figura 10), lo que puede estar relacionado con la prolongación del tiempo de cultivo.

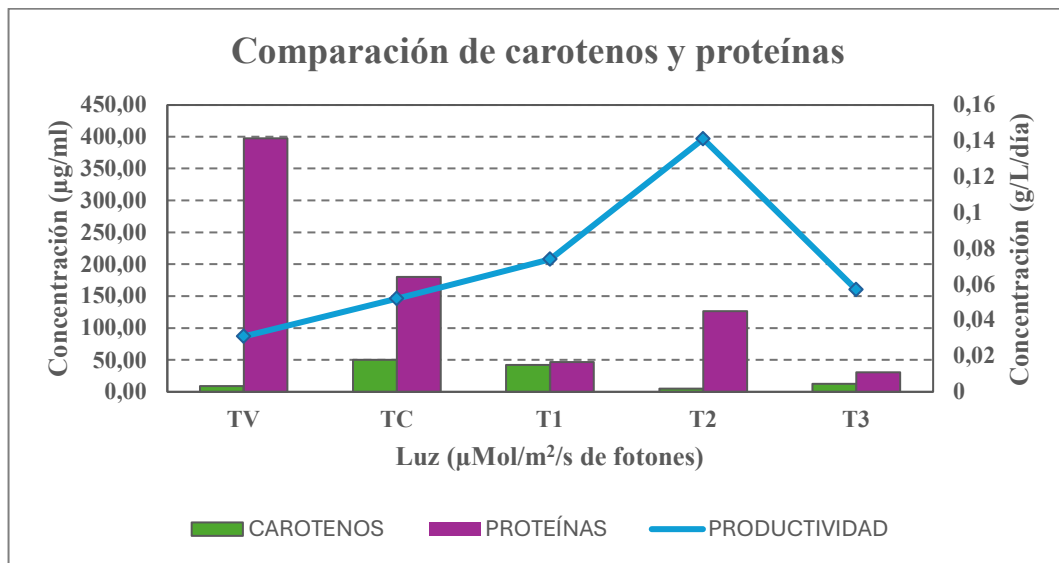
En el tratamiento 2 (150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) la dinámica es similar a mayor cantidad de proteínas (126.55 $\mu\text{g/ml}$) menor cantidad de carotenos (4.92 $\mu\text{g/ml}$), sin embargo, la productividad es más alta a comparación de los grupos anteriores alcanzando 0.141 g/L/día, mostrando una relación inversa, es decir, a mayor productividad se reduce significativamente la cantidad de carotenos. En el caso del tratamiento 3 (200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) al someter a la microalga a un nivel de estrés mayor, se reduce drásticamente la cantidad de ambos compuestos.

Por el contrario, en el tratamiento 1 (100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$), a diferencia de los otros tratamientos experimentales, este grupo presenta una mejor productividad con 0.074 g/L/día y una cantidad de luz moderada que le permite a la microalga acumular tanto carotenos como proteínas con 41.87 y 46.95 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10), obteniendo como resultado un valor de $p = (0.531)$ señalando que es el único

tratamiento donde no existen diferencias significativas entre ambas concentraciones.

Figura 10.

Relación de la productividad con las concentraciones de carotenos y proteínas



Nota: Los tratamientos fueron TV=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, TC=60 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T1=100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T2=150 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, T3=200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$

10. DISCUSIÓN

Durante la fase vegetativa *Dunaliella sp.* alcanzó el mayor crecimiento celular el octavo día con una densidad celular de 1.5×10^6 cel/ml, contrastando con los resultados de Borovkov et al. (2020) donde obtuvieron una densidad celular máxima para *Dunaliella salina* de 1.69×10^6 cel/ml en el día trece, con luz natural y la influencia de condiciones climáticas relacionadas a las estaciones ambientales. Por su parte, Sugiati et al. (2019) reportan haber alcanzado una máxima densidad celular el día 8 con 3.5×10^4 cel/ml, apoyando los resultados obtenidos en la investigación.

Durante la fase de estrés lumínico se evaluaron tres intensidades de luz a 100, 150 y 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, mientras los demás parámetros se mantenían en condiciones normales, durante los diez días de estrés las células experimentaron cambios en su morfología, modificaron la forma de la célula a una más circular, el color cambió ligeramente a un verde-amarillento hasta llegar a la fase de palmela, donde perdieron sus flagelos y, por ende, presentaron menos movilidad. Estas observaciones coinciden con los datos presentados en el estudio de Salehipour-Bavarsad et al. (2022) que observaron cambios en la morfología durante los primeros 10 días de estrés, cambiando su color a uno más amarillento y su forma a una más redondeada. Del mismo modo, Park et al., (2013) indican que en *D. bardawil* bajo 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones presentó un color más amarillento y *D. salina* presentó un color verde-amarillento.

Con respecto a la productividad de biomasa el tratamiento 1 presentó una productividad de 0.074 g/L/día, siendo relativamente baja en comparación con lo reportado por Yuan et al. (2019) el cual obtuvo una concentración de 0.2 g/L/día en cultivos sometidos a una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un periodo de experimentación de 5 días, razón por la que puede darse esta variación. Lo contrario sucede con el tratamiento 2, en el que se obtuvo la productividad más alta siendo de 0.141 g/L/día, mientras que, el estudio de Minhas et al. (2023) exponen un valor significativamente bajo siendo de 40 mg/L/día para *Dunaliella tertiolecta*. Cabe mencionar que, ciertas condiciones de cultivos variaron, la cantidad de luz fue similar a 120 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$, con un periodo de experimentación de 23 días y fotoperiodo de 16:8 luz/oscuridad.

Del mismo modo, para el tratamiento 3, la productividad fue de 0.057 g/L/día, habiendo una reducción respecto al tratamiento anterior, lo cual coincide con lo expuesto por Minhas et al. (2023) que al aumentar la intensidad de lumínica a 250 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la productividad para *Dunaliella tertiolecta* se redujo hasta 30 mg/L/día, lo que muestra que en ambas cepas al aumentar la cantidad de luz \leq a 200 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ se va a generar una reducción en la producción de biomasa.

Por otro lado, en la cuantificación de pigmentos, se acumuló mayor cantidad de clorofila *a* en el tratamiento 1 con 87.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$, teniendo una diferencia significativa con lo expuesto por López-Elías et al. (2013) con resultados de 1.32 ± 0.99 pg/cel

(1.68 $\mu\text{g/ml}$). Respecto al tratamiento 2 existió diferencias significativas, presentando una reducción a 25.71 $\mu\text{g/ml}$, a pesar de que en ambos estudios se aplicaron cantidades de luz similares de $116 \pm 8 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$. Sin embargo Minhas et al., (2023) para clorofila *a* logró una concentración similar al tratamiento 2, con un valor de 32.23 $\mu\text{g/ml}$, a una intensidad de luz de $120 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, aunque se utilizó para los cultivos agua de mar natural. En el estudio también se aumentó la cantidad de luz a $139 \pm 22 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, que provocó la reducción del contenido de clorofila *a* hasta $0.92 \pm 07 \text{ pg/cel}$ (1.18 $\mu\text{g/ml}$), al igual que en la experimentación donde el tratamiento 3 reduce la producción de clorofila *a* hasta 37.62 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, la concentración es mucho mayor a la reportada, lo que demuestra que, a mayor cantidad de luz, menor producción de clorofila *a*. No obstante Belghith et al. (2016) a una intensidad de luz de $265 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ reporta una mayor acumulación de clorofila *a*, alcanzando 52.32 mg/L. Cabe destacar que es un parámetro de estrés adicional colocando 3.4 M de NaCl, lo que probablemente interfiere en la producción del pigmento.

En el caso de la clorofila *b*, en el tratamiento 1 se reportó una acumulación de 34.12 $\mu\text{g/ml}$, y fue la concentración más alta entre los tres tratamientos, siendo mayor en comparación a lo obtenido por López-Elías et al. (2013) donde clorofila *b* acumuló 20.80 $\mu\text{g/ml}$ a rangos de luz que oscilaban $116 \pm 8 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ para *Dunaliella tertiolecta* en un tiempo de experimentación de 10 días, lo que indicaría que la cepa de *Dunaliella sp.* acumula más clorofila *b* a intensidades de luz máximas de $100 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones.

Al elevar la cantidad de luz *Dunaliella sp.*, presentó una reducción en la cantidad de clorofila *b* en el tratamiento 2 alcanzando 18.13 $\mu\text{g/ml}$, siendo este valor similar al obtenido en el trabajo de investigación descrito anteriormente, con una intensidad de luz menor. Al incrementarse la cantidad de luz ocurre un ligero aumento en concentración de clorofila *b* alcanzando 25.34 $\mu\text{g/ml}$ que coincide con el estudio de López-Elías et al. (2013) con 25.68 $\mu\text{g/ml}$ a intensidad lumínica de $139 \pm 22 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones. De igual forma, (Hotos, 2023) muestra datos contradictorios, dado que, al elevar el nivel de luz, aumenta el contenido de clorofila *b* obteniendo concentraciones de 5,997 y 8,290 $\mu\text{g/ml}$ a intensidades lumínicas de 40 y 160 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, siendo significativamente menores a los obtenidos en la experimentación, a pesar de haber evaluado rangos de luz y tiempo de cultivo similar.

En cuanto a los carotenos Nguyen et al. (2016) expone para *D. salina* y *D. bardawil* a una intensidad de luz de 50 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, obteniendo una concentración de aproximadamente 9 $\mu\text{g/ml}$, presentando una diferencia significativa respecto al grupo control, sometido a una cantidad de luz similar con 49.84 $\mu\text{g/ml}$. Al aumentar el nivel de luz a 800 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, se obtuvo 20 $\mu\text{g/ml}$ de carotenos para ambas especies, indicando que a mayor cantidad de luz presenta una mayor acumulación de carotenos. Estos resultados coinciden con Leite-Nepomuceno et al. (2024) donde evaluaron *D. salina* a 100, 500, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones obteniendo como resultado $7.28 \pm 0.26 \text{ mg/g}$ a menor cantidad de luz y alcanzando en el tratamiento con mayor exposición a intensidad luminosa

31.67±1.13 mg/g de carotenos; sin embargo, en la presente investigación, en el tratamiento con mayor cantidad de luz se produjo una reducción en la concentración de carotenos.

Zarandi-Miandoab et al. (2015) evaluaron cultivos de *D. salina* a 200 y 1000 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones obteniendo concentraciones de 63 $\mu\text{g/ml}$ y 80.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas, respectivamente, asegurando que el contenido de proteínas aumenta conforme aumenta el nivel de luz, lo que no concuerda con los resultados obtenidos en esta la experimentación donde se obtuvo menor contenido proteico a mayores niveles de luz reduciéndose a 30.59 $\mu\text{g/ml}$ en 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$. El estudio realizado por Belghith et al. (2016) se obtuvo concentraciones similares reportando 52.4 mg/L en cultivos a 265 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones. No obstante Sui & Harvey, (2021) al evaluar niveles de luz de 100, 200, 400 y 600 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ en cultivos de *D. salina* observaron mayor cantidad de proteínas a 200 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ con 0.9 g/L y se redujo en los tratamientos con mayores niveles de luz, en un tiempo de cultivo de 26 días, apoyando los resultados de la investigación donde se redujo el contenido proteico al elevar la intensidad lumínica.

La finalidad de este trabajo consistió en maximizar el potencial biotecnológico de la microalga *Dunaliella sp.* como fuente de proteínas y de carotenos, el tratamiento 1 sometido a 100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$, obtuvo una productividad de biomasa de 0.074 g/L/día, y acumuló concentraciones de 46.95 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas y 41.87 $\mu\text{g/ml}$ de carotenos,

siendo el único tratamiento que acumuló concentraciones similares para ambos compuestos a una productividad moderada, sin embargo, estas concentraciones fueron menores a las del tratamiento control. Por el contrario, Sui et al. (2019b) indica que a una intensidad de luz de $70 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ *Dunaliella salina* produjo 17 mg/L de proteínas y al aumentarle el nivel de luminosidad a $110 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ y el, aumenta la concentración a 599 mg/L, y respecto a los carotenos acumuló inicialmente 29 mg/L e incrementó a 50 mg/L, teniendo una diferencia significativa entre ambos compuestos contradiciendo los datos obtenidos en la experimentación a un nivel de luz similar.

11. CONCLUSIONES

Los cultivos de *Dunaliella sp.* alcanzaron una densidad celular de 1.5×10^6 cel/ml en su estado vegetativo, posteriormente, al aplicar tres intensidades de luz, se indujo a los cultivos a estrés lumínico, en esta fase las células presentaron cambios en su estructura morfológica, en la coloración y en el crecimiento celular, este último, reflejado en las variaciones de productividad de biomasa obtenidas en cada tratamiento, siendo el nivel de luz óptimo para maximizar la concentración celular el T2 a $150 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, donde los cultivos alcanzaron una productividad de 0.141 g/L/día .

En base a la cuantificación de compuestos bioquímicos se obtuvo mayores concentraciones de clorofila *a* y *b* en el tratamiento control a $60 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fotones, demostrando que intensidades de luz altas se inhibe la producción de clorofila, del mismo modo se alcanzó mayor cantidad de carotenos totales con $49.84 \mu\text{g/ml}$, en el tratamiento control, reportando una reducción en la concentración conforme aumenta la luz. En el caso de proteínas se alcanzó una mayor concentración en el tratamiento vegetativo con $397.36 \mu\text{g/ml}$.

Se evaluaron las concentraciones de carotenos y proteínas para cada tratamiento, obteniendo como resultado que existen diferencias significativas entre ambos compuestos en todos los tratamientos, siendo el metabolito predominante la proteína, sin embargo, las concentraciones más altas se alcanzaron en el

tratamiento control, lo que indicaría que los rangos de luz utilizados para provocar el estrés lumínico en las microalgas no dieron resultados favorables para la producción de carotenos, por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna, en la que se indica que las concentraciones de ambos metabolitos disminuirían al elevar el nivel de luz. Cabe mencionar que esta investigación, tuvo algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta, como la fisiología de la microalga, dado que *Dunaliella sp.* puede reaccionar de manera diferente dependiendo de la variedad de la cepa o de las condiciones del inóculo y que solo se evaluaron tres intensidades de luz lo que restringe la posibilidad de determinar un verdadero punto óptimo para la producción de proteínas y carotenoides.

12. RECOMENDACIONES

Realizar nuevas pruebas implementando otros parámetros de estrés como la salinidad, el pH, la temperatura con el fin de observar el comportamiento de la microalga ante distintos parámetros de estrés.

Cuantificar las concentraciones de otros compuestos de interés, como lípidos, glicerol y carbohidratos que también son macromoléculas importantes en la microalga.

Evaluar rangos de intensidad luminosa más altos, para la determinación de las concentraciones de carotenos y comparar con el incremento o similitud respecto a las proteínas.

13. BIBLIOGRAFÍA

Agudelo-Rivera, E. (2020). *Las microalgas como fuente de nutrientes en vías de desarrollo*. <http://hdl.handle.net/10045/107312>

Almutairi, A. W. (2020). Effects of nitrogen and phosphorus limitations on fatty acid methyl esters and fuel properties of *Dunaliella salina*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26), 32296–32303.
<https://doi.org/10.1007/S11356-020-08531-8/METRICS>

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. dos R., Leite, M. de O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021a). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976–2002.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. dos R., Leite, M. de O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021b). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976–2002.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>

Arena, R., Lima, S., Villanova, V., Moukri, N., Curcuraci, E., Messina, C., Santulli, A., & Scargiali, F. (2021). Cultivation and biochemical characterization of isolated Sicilian microalgal species in salt and temperature stress conditions. *Algal Research*, 59, 102430.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102430>

- Balasubramaniam, V., Gunasegavan, R. D. N., Mustar, S., Lee, J. C., & Noh, M. F. M. (2021). Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 943, 26(4), 943. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26040943>
- Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99–120. <https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2222318>
- Belghith, T., Athmouni, K., Elloumi, J., Guermazi, W., Stoeck, T., & Ayadi, H. (2016). Biochemical Biomarkers in the Halophilic Nanophytoplankton: *Dunaliella salina* Isolated from the Saline of Sfax (Tunisia). *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/S13369-015-1808-5/METRICS>
- Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*, 8(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90152-N](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90152-N)
- Bermejo, E., Filali, R., & Taidi, B. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 4, pp. 457–473). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Bialevich, V., Zachleder, V., & Bišová, K. (2022). The Effect of Variable Light Source and Light Intensity on the Growth of Three Algal Species. *Cells*, 11(8), 1293. <https://doi.org/10.3390/CELLS11081293/S1>

- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 2017, Vol. 6, Page 33, 6(5), 33. <https://doi.org/10.3390/FOODS6050033>
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Avsiyan, A. L., Memetshaeva, O. A., Lelekov, A. S., & Novikova, T. M. (2020). Production characteristics of *Dunaliella salina* at two-phase pilot cultivation (Crimea). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(5), 401–408. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_08
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Memetshaeva, O. A., Avsiyan, A. L., Lelekov, A. S., & Novikova, T. M. (2019). Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (chlamydomonadales, dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode. *Ecologica Montenegrina*, 22, 157–165. <https://doi.org/10.37828/EM.2019.22.12>
- Borowitzka, M. A., & Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567–590. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Butnariu, M. (2016). Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000193>
- Camacho, F., Macedo, A., & Malcata, F. (2019). Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Marine Drugs* 2019, Vol. 17, Page 312, 17(6), 312. <https://doi.org/10.3390/MD17060312>
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2020). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 10, 9(1), 10. <https://doi.org/10.3390/PR9010010>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1153, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/BIOM10081153>
- El-Sheekh, M., Dewidar, S., Hamad, A., Abu-Elsaoud, A. M., Alharbi, M., & Elkelish, A. (2024). Effect of salinity, nitrogen and phosphorus stresses on growth and photosynthetic activity of the marine microalga *Dunaliella parva*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(1), 13426–13426. <https://doi.org/10.15835/NBHA52113426>
- Emeish, S., & Al-Muhteseb, S. I. (2015). Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina*. In *Journal of Natural Sciences Research*

www.iiste.org ISSN (Vol. 5, Issue 10).

<https://www.researchgate.net/publication/286443715>

Fimbres, D., Rufino, L., Castillo, M., Murguía López, Á., Antonio, J., & Elías, L.

(2010). Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *Biotecnia*, 12(3), 58–66.

Grossman, A. R., Lohr, M., & Im, C. S. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annual Review of Genetics*, 38, 119–173.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.38.072902.092328>

Guevara, M., Pinto, R., Villarroel, J., Hernández, E., Díaz, R., Gotera, B., &

Cortez, R. (2016). Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella* salina, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela. *Saber*, 28(3), 494–501. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622016000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine

Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29–60.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Hossain, N., & Mahlia, T. M. I. (2019). Progress in physicochemical parameters

of microalgae cultivation for biofuel production. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 39, Issue 6, pp. 835–859). Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1624945>

- Hotos, G. N. (2023). Quantity and Quality of Light on Growth and Pigment Content of *Dunaliella* sp. and *Anabaena* sp. Cultures and the Use of Their Absorption Spectra as a Proxy Method for Assessment. *Journal of Marine Science and Engineering* 2023, Vol. 11, Page 1673, 11(9), 1673.
<https://doi.org/10.3390/JMSE11091673>
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(79\)90034-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(79)90034-0)
- Ja, L.-E., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L. A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L. R., & Molina-Quijada, D. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(1), 23–30.
https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Janssen, M., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2022). Microalgae based production of single-cell protein. *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102705. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2022.102705>
- Jin, E., & Polle, J. E. W. (2019). Carotenoid Biosynthesis in *Dunaliella* (Chlorophyta). *The Alga Dunaliella*, 147–172.
<https://doi.org/10.1201/9780429061639-6>

- Khalil, Z. I., Asker, M. M. S., El-Sayed, S., & Kobbia, I. A. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1225–1231. <https://doi.org/10.1007/S11274-009-0292-Z/METRICS>
- Kwan, P. P., Banerjee, S., Shariff, M., & Md. Yusoff, F. (2021). Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. In *Aquaculture Research* (Vol. 52, Issue 4, pp. 1337–1347). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/are.15023>
- Leite-Nepomuceno, J., Freitas-Ribeiro, C., & Lapa-Teixeira, C. (2024). *Potential Production of Carotenoids and Other Bioproducts by Brazilian Isolate Dunaliella Salina Using High Irradiance Strategy*. <https://ssrn.com/abstract=4947323>
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 239–260. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.58.032806.103844>
- López-Elías, J., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L. A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L. R., & Molina-Quijada, D. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(1), 23–30. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, H., Wang, J., & Yuan, W. (2024). Illumination Effects on Bacteriorhodopsin Accumulation in Archaeon *Halobacterium Halobium*. *Journal of the ASABE*, 67(3), 525–531. <https://doi.org/10.13031/JA.15349>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology 2021, Vol. 10, Page 1060, 10(10)*, 1060. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10101060>
- Masojídek, J., Ranglová, K., Lakatos, G. E., Benavides, A. M. S., & Torzillo, G. (2021). Variables Governing Photosynthesis and Growth in Microalgae Mass Cultures. *Processes 2021, Vol. 9, Page 820, 9(5)*, 820. <https://doi.org/10.3390/PR9050820>
- Minhas, A. K., Gaur, S., & Adholeya, A. (2023). Influence of light intensity and photoperiod on the pigment and, lipid production of *Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis oculata* under three different culture medium. *Heliyon*, 9(2), e12801. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12801>
- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*, 160, 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>

- Mohd-Apandi, N., Suliza-Muhamad, M., Maya-Saphira, R., Mohamed, R., Mohamed-Sunar, N., Al-Gheethi, A., Gani, P., & Rahman, F. A. (2021). Optimizing of Microalgae *Scenedesmus* sp. Biomass Production in Wet Market Wastewater Using Response Surface Methodology. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 2216, 13(4), 2216. <https://doi.org/10.3390/SU13042216>
- Nguyen, A., Tran, D., Ho, M., Louime, C., Tran, H., & Tran, D. (2016). High Light Stress Regimen on *Dunaliella Salina* Strains For Carotenoids Induction. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 3(4). <https://doi.org/10.15761/ifnm.1000158>
- Novosel, N., Mišić Radić, T., Levak Zorinc, M., Zemla, J., Lekka, M., Vrana, I., Gašparović, B., Horvat, L., Kasum, D., Legović, T., Žutinić, P., Gligora Udovič, M., & Ivošević DeNardis, N. (2022). Salinity-induced chemical, mechanical, and behavioral changes in marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1293–1309. <https://doi.org/10.1007/S10811-022-02734-X/FIGURES/8>
- Osram, S. (2000). Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units. *National Customer Support Center*.
- Pal Singh, G., & Dhaka, P. (2018). Effect of pH on growth and biopigment accumulation of green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(1), 271. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(1\).271-76](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(1).271-76)

- Park, S., Lee, Y., & Jin, E. S. (2013). Comparison of the responses of two Dunaliella strains, Dunaliella salina CCAP 19/18 and Dunaliella bardawil to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *ALGAE*, 28(2), 203–211. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2013.28.2.203>
- Polívka, T., & Frank, H. A. (2010). Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. *Accounts of Chemical Research*, 43(8), 1125–1134. https://doi.org/10.1021/AR100030M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AR-2010-00030M_0006.GIF
- Rahman, K. M. (2020). Food and High Value Products from Microalgae: Market Opportunities and Challenges. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 3–27. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_1
- Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J., & Chen, F. (2021). Carotenoid Production from Microalgae: Biosynthesis, Salinity Responses and Novel Biotechnologies. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 713, 19(12), 713. <https://doi.org/10.3390/MD19120713>
- Salehipour-Bavarsad, F., Riahi, H., Hejazi, M. A., & Shariatmadari, Z. (2022). Optimization of β -carotene production by an indigenous isolate of Dunaliella salina under salinity-gradient stress. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 21(1), 235–246. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2022.125929>

- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Ación, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), 398–405.
<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2008.01.004>
- Sedjati, S., Santosa, G. W., Yudiati, E., Supriyantini, E., Ridlo, A., & Kimberly, F. D. (2019). Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 246(1), 012025. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012025>
- Serpa-Ibáñez, F. R., & Calderón-Rodríguez, A. (2005). Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. *Ecología Aplicada*, 4(1–2), ág. 127-133. <https://doi.org/10.21704/REA.V4I1-2.307>
- Shetty, P., Gitau, M. M., & Maróti, G. (2019). Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1657*, 8(12), 1657. <https://doi.org/10.3390/CELLS8121657>
- Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., & Huang, H. (2020). Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid Production in Microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 537291.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00610/BIBTEX>
- Silva, M. R. O. B. da, Moura, Y. A. S., Converti, A., Porto, A. L. F., Viana Marques, D. de A., & Bezerra, R. P. (2021). Assessment of the potential of

Dunaliella microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. *Algal Research*, 58.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>

Slocombe, S. P., Zhang, Q., Ross, M., Anderson, A., Thomas, N. J., Lapresa, Á., Rad-Menéndez, C., Campbell, C. N., Black, K. D., Stanley, M. S., & Day, J. G. (2015). Unlocking nature's treasure-chest: screening for oleaginous algae. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP09844>

Soares, A. T., Júnior, J. G. M., Lopes, R. G., Derner, R. B., & Filho, N. R. A. (2016). Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from *Desmodesmus* sp. Microalgae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6), 1083–1093. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160004>

Song, D., Xi, B., & Sun, J. (2016). Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Ocean University of China*, 15(1), 124–130. <https://doi.org/10.1007/S11802-016-2797-Z/METRICS>

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, 2nd edition. <https://doi.org/10.25607/OBP-1791>

Sugiati, N., Masithah, E. D., Tjahjaningsih, W., & Abdillah, A. A. (2019). The Increase in β -carotene Content in *Dunaliella salina* from the Application of

Different Light Intensities. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012001>

Sui, Y., & Harvey, P. J. (2021). Effect of Light Intensity and Wavelength on Biomass Growth and Protein and Amino Acid Composition of *Dunaliella salina*. *Foods 2021*, Vol. 10, Page 1018, 10(5), 1018.
<https://doi.org/10.3390/FOODS10051018>

Sui, Y., Muys, M., Van de Waal, D. B., D'Adamo, S., Vermeir, P., Fernandes, T. V., & Vlaeminck, S. E. (2019). Enhancement of co-production of nutritional protein and carotenoids in *Dunaliella salina* using a two-phase cultivation assisted by nitrogen level and light intensity. *Bioresource Technology*, 287, 121398. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121398>

Sui, Y., & Vlaeminck, S. E. (2019). Effects of salinity, pH and growth phase on the protein productivity by *Dunaliella salina*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(4), 1032–1040.
<https://doi.org/10.1002/JCTB.5850>

Sydney, E. B., Sydney, A. C. N., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2018). Potential carbon fixation of industrially important microalgae. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae, Second Edition* (pp. 67–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00004-4>

Teodoresco, C. (1905). Organización y desarrollo de *Dunaliella*, nuevo género de Volvocacée - Polyblepharidée. *Beihefte Zum Botanischen Centralblatt, Erste*

Abteilung: Anatomie, Histologie, Morphologie Und Physiologie Der Pflanzen , 18(2), 215–232.

Tran-Nguyen, Q. A., Tran, T. T. V., & Trinh-Dang, M. (2023). Effects of Light on the Growth and β -carotene Accumulation in the Green Algae *Dunaliella salina*. *Asian Journal of Biology*, 18(1), 1–10.

<https://doi.org/10.9734/ajob/2023/v18i1332>

Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/S11120-015-0149-2/METRICS>

Vega Arredondo, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 2° ed. *México Centro de Investigación Biológicas Del Noroeste, S.C.*, 150.

Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 167, 276–283.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.06.030>

Wang, Y., Tibbetts, S. M., & McGinn, P. J. (2021). Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 3002, 10(12), 3002.

<https://doi.org/10.3390/FOODS10123002>

Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, *105*, 120–127.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.11.103>

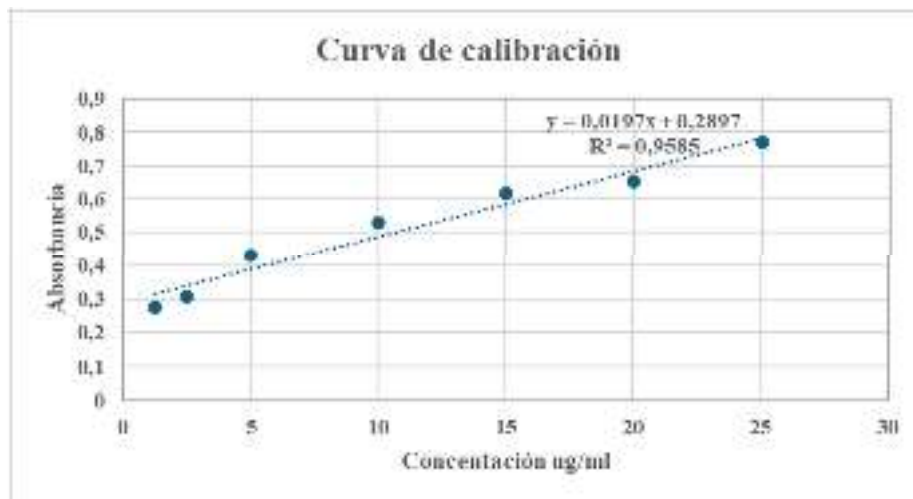
Yuan, Y., Li, X., & Zhao, Q. (2019). Enhancing growth and lipid productivity in *Dunaliella salina* under high light intensity and nitrogen limited conditions. *Bioresource Technology Reports*, *7*.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100211>

Zarandi-Miandoab, L., Hejazi, M.-A., Bagherieh-Najjar, M.-B., & Chaparzadeh, N. (2015). Light intensity effects on some molecular and biochemical characteristics of *Dunaliella salina*. In *Iranian Journal of Plant Physiology* (Vol. 5, Issue 2).

14. ANEXOS

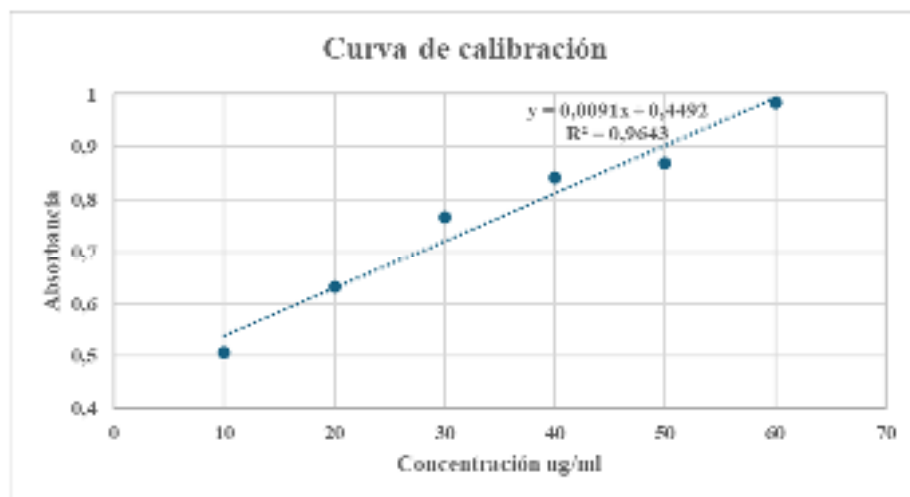
Anexo 1.

Curva de calibración (BSA) de 1.25-25 $\mu\text{g/ml}$



Anexo 2.

Curva de calibración (BSA) de 10-60 $\mu\text{g/ml}$



Anexo 3.

Replicas para la realizar la curva de crecimiento celular



Anexo 4.

Cultivos en un volumen de 150 ml



Anexo 5.

Escalamiento de cultivos a un volumen de 600 ml



Anexo 6.

Escalamientos de cultivos a un volumen de 3 L



Anexo 7.

Control de parámetros físicos



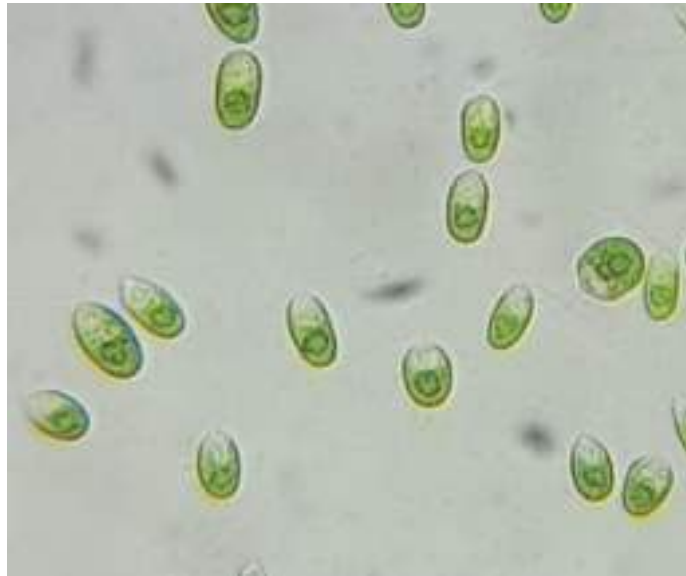
Anexo 8.

Inducción a estrés lumínico



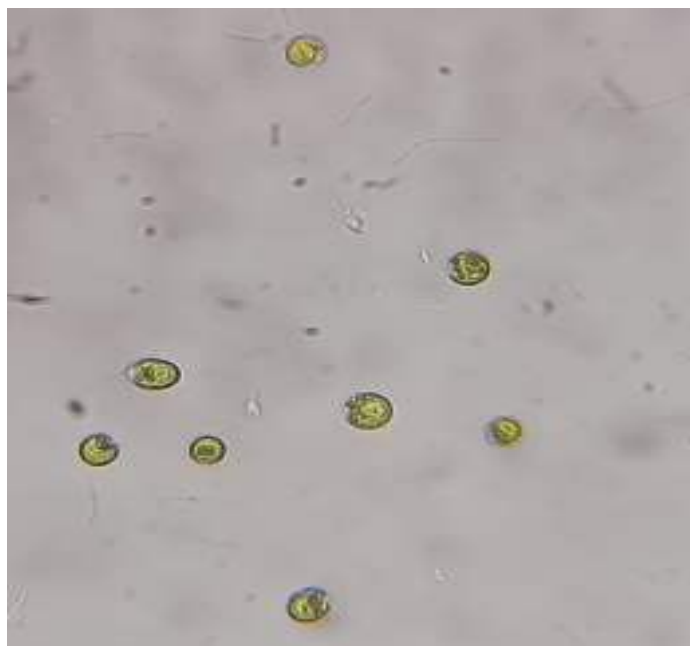
Anexo 9.

Células en fase vegetativa



Anexo 10.

Células en fase de estrés



Anexo 11.

Cosecha de biomasa de Dunaliella sp.



Anexo 12.

Colocación de acetona y realización de vortex para extracción de carotenos



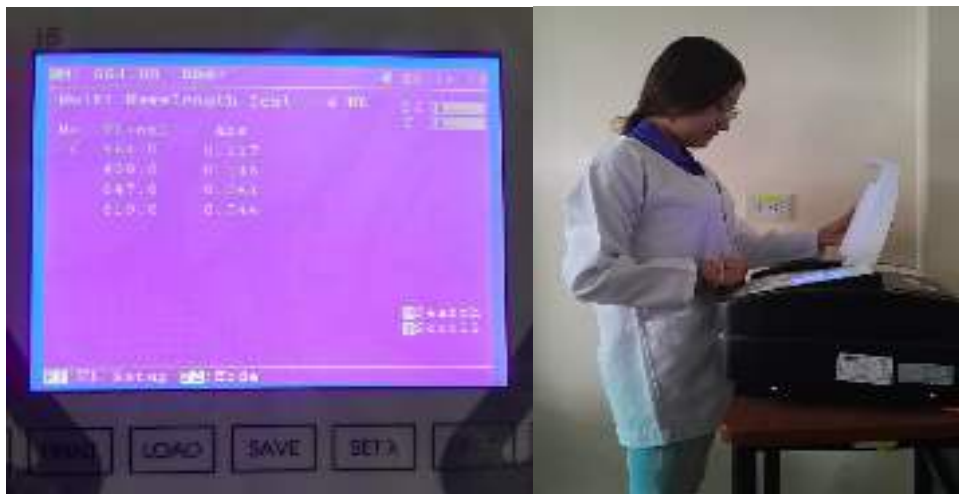
Anexo 13.

Reposo de las muestras en hielo y obtención del extracto de carotenos



Anexo 14.

Cuantificación de carotenos por espectrofotometría



Anexo 15.

Inducción a la ruptura celular por temperatura y obtención del extracto de proteínas



Anexo 16.

Cuantificación de proteínas por espectrofotetría



Anexo 17.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de densidad celular

Estadísticas descriptivas

Replicas	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
1	13	950000		18,0 -0,76
2	13	1120000		23,2 1,24
3	13	920000		18,8 -0,48
General	39			20,0

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	2	1,56	0,459
Ajustado para empates	2	1,56	0,459

Anexo 18.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de productividad de biomasa en diferentes intensidades de luz

Estadísticas descriptivas

Luz2	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
100	3	0,074		8,0 0,83
150	3	0,141		11,0 2,50
200	3	0,057		5,0 -0,83
60	3	0,052		2,0 -2,50
General	12			6,5

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	10,38	0,016
Ajustado para empates	3	10,53	0,015

Anexo 19.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de clorofila a en diferentes intensidades de luz

Estadísticas descriptivas

LUZ 1	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
100	5	88,204	13,0	1,09
150	5	25,814	3,0	-3,27
200	5	36,091	8,0	-1,09
60	5	117,183	18,0	3,27
General	20		10,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

GL Valor H Valor p

3 17,86 0,0005

Anexo 20.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de clorofila b en diferentes intensidades de luz

Estadísticas descriptivas

LUZ 1	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
100	5	32,3356	11,8	0,57
150	5	16,5256	3,6	-3,01
200	5	24,1100	8,6	-0,83
60	5	75,0996	18,0	3,27
General	20		10,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

GL Valor H Valor p

3 15,59 0,001

Anexo 21.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de carotenos en diferentes intensidades de luz

Estadísticas descriptivas

LUZ 1	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
100	5	44,4372	14,2	1,61
150	5	4,7439	3,0	-3,27
200	5	11,9366	8,0	-1,09
60	5	53,7381	16,8	2,75
General	20		10,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

GL Valor H Valor p

3 16,55 0,001

Anexo 22.

Prueba Kruskal-Wallis para análisis de proteínas en diferentes intensidades de luz

Estadísticas descriptivas

LUZ 1	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
100	5	43,275	8,0	-1,09
150	5	132,132	13,2	1,18
200	5	30,967	3,0	-3,27
60	5	174,772	17,8	3,19
General	20		10,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método GL Valor H Valor p

No ajustado para empates 3 17,58 0,001

Ajustado para empates 3 17,60 0,001